



# Alzheimerjeva bolezen: etiološki in rizični dejavniki, patofiziološki mehanizmi in terapevtski pristopi

Alzheimer's disease: etiological and risk factors, pathophysiological mechanisms and therapeutic approaches

Tomaž Trobec,<sup>1</sup> Monika Cecilija Žužek,<sup>1</sup> Katarina Černe,<sup>2</sup> Robert Frangež<sup>1</sup>

## Izvleček

Alzheimerjeva bolezen je kronična progresivna neurodegenerativna bolezen, za katero oboleva vse večje število ljudi po vsem svetu. Je najpogostejši vzrok za demenco (pri 50–80 % vseh primerov) in obenem tudi najhujša oblika demence, za katero so značilne kognitivne in vedenjske motnje pri ljudeh, večinoma starejših od 65 let. Patogeneza bolezni še ni popolnoma pojasnjena. Obstaja več hipotez, ki vključujejo kombinacijo genetskih in okoljskih dejavnikov ter načina življenja. Glede na začetek bolezni lahko bolezen opredelimo kot obliko z zgodnjim začetkom, običajno pred 65. letom starosti, in obliko s poznim začetkom, običajno po 65. letu starosti. Redka oblika bolezni z zgodnjim začetkom je povezana z mutacijami v genu za amiloidni prekursor protein ter v genih za presenilin 1 in 2. Genetski dejavnik tveganja za nastanek bolezni s poznim začetkom je prisotnost alela ε4 za apolipoprotein E. Za nastanek oblike s poznim začetkom obstaja več vzročnih hipotez: a) holinergična hipoteza, b) amiloidna hipoteza, c) hipoteza o hiperfosforilaciji proteina tau, č) hipoteza o mitohondrijski kaskadi, d) vnetna hipoteza, e) nevro-vaskularna hipoteza, f) hipoteza o kovinskih ionih ter g) hipoteza o limfnega sistema. Poleg tega obstajajo tudi presnovni in drugi dejavniki tveganja za nastanek Alzheimerjeve bolezni, med katere sodijo: zvišana raven holesterola v krvi, debelost, zvišan krvni tlak, sladkorna bolezen tipa 2, motnje spanja idr. Kljub velikemu številu raziskav etiopatogeneza do danes še ni dokončno pojasnjena, prav tako ne poznamo zdravila, ki bi preprečilo nastanek bolezni ali ustavilo njeno napredovanje. Zdravljenje Alzheimerjeve bolezni trenutno temelji na farmakološkem zdravljenju, ki poteka na osnovi doslej znane etiologije bolezni. Veliko obeta tudi imunoterapija z antiamiloidnimi protitelesi.

## Abstract

Alzheimer's disease is a chronic progressive neurodegenerative disease that affects an increasing number of people worldwide. It is the most common and severe form of dementia (50–80% of all patients), characterized by cognitive decline and behavioural disorders, mainly in people over 65 years of age. Nowadays, the disease's pathogenesis remains obscure.

<sup>1</sup> Inštitut za predklinične vede, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup> Inštitut za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

**Korespondenca / Correspondence:** Robert Frangež, e: [robert.frangez@vf.uni-lj.si](mailto:robert.frangez@vf.uni-lj.si)

**Ključne besede:** Alzheimerjeva bolezen; patofiziologija; etiologija; terapija z zdravili

**Key words:** Alzheimer's disease; physiopathology; etiology; drug therapy

**Prispelo / Received:** 20. 11. 2020 | **Sprejeto / Accepted:** 5. 4. 2021

**Citirajte kot/Cite as:** Tomaž Trobec T, Žužek MC, Černe K, Frangež R. Alzheimerjeva bolezen: etiološki in rizični dejavniki, patofiziološki mehanizmi in terapevtski pristopi. Zdrav Vestn. 2022;91(7–8):296–308. **DOI:** <https://doi.org/10.6016/ZdravVestn.3193>



Avtorske pravice (c) 2022 Zdravniški Vestnik. To delo je licencirano pod Creative Commons Priznanje avtorstva-Nekomercialno 4.0 mednarodno licenco.

However, several hypotheses involve a combination of genetic and environmental factors and people's lifestyle. Depending on the onset, the disease is divided into an early-onset form and a late-onset form. A rare early-onset form is associated with mutations in the gene for amyloid precursor protein and genes for the presenilin 1 and 2. The genetic risk factor for a late-onset form is the  $\epsilon 4$  allele of the apolipoprotein E gene. Besides, there are several causal hypotheses for the onset of the late-onset form: i) cholinergic hypothesis, ii) amyloid hypothesis, iii) tau hyperphosphorylation and propagation hypothesis, iv) mitochondrial cascade hypothesis, v) inflammatory hypothesis, vi) neurovascular hypothesis, vii) metal ion hypothesis and viii) lymphatic system hypothesis. Also, there are metabolic and other risk factors for Alzheimer's disease, such as hypertension, hypercholesterolemia, obesity, type 2 diabetes mellitus, sleep disorders, and many others. Despite many studies, the cause and mechanism of the disease have not been fully explained. Furthermore, we do not know the medicine to prevent the onset or stop the disease's progression. Alzheimer's disease treatment is primarily pharmacological and is based on the known disease's aetiology. Recently, much attention has been directed to immunotherapy with anti-amyloid antibodies.

## 1 Uvod

Raziskave demografskih sprememb so že pred več kot desetletjem napovedale podaljšanje trajanja povprečne življenjske dobe ter povečanje deleža starejših (nad 65 let) v populaciji. V Sloveniji je leta 2012 delež starih nad 65 let znašal 16,8 %, do leta 2020 pa se je ta povečal na 20,5 %. Leta 2057 naj bi po predvidevanjih ta starostna skupina predstavljala celo 31 % prebivalstva Slovenije. S staranjem prebivalstva so neposredno povezane tudi različne geriatrične bolezni, med katere sodi tudi Alzheimerjeva bolezen (AB) (1-4). AB je kronična nevrodegenerativna bolezen, ki v današnjem času doleti 50 milijonov ljudi po vsem svetu (5). Glede na projekcije bo do leta 2030 število obolelih naraslo na 74,7 milijona, do leta 2050 pa celo na 131,5 milijonov (5,6). Najvišja obolevnost za AB je v Aziji (49 %), sledita ji Evropa (25 %) in Amerika (18 %). Podatki svetovnega poročila o AB kažejo, da je najvišja incidenca bolezni v Evropi in Ameriki med 80. in 89. letom starosti, v Aziji med 75. in 84. letom, v Afriki pa med 65. in 74. letom. AB je najpogostejši vzrok za demenco (pri 50–80 % vseh primerov), ki se kaže v obliki kognitivnih in vedenjskih motenj pri ljudeh, večinoma starejših od 65 let (6), ter obenem tudi najhujša oblika demence (7). Poleg te so znane še druge, manj pogoste oblike demence: žilna demenca, demenca z Lewyjevim telesci, frontotemporalna demenca (FTD), demenca pri Parkinsonovi bolezni ter mešana demenca (8,9). Ocenjeni skupni stroški v letu 2018, ki vključujejo zdravstveno, socialno in neformalno oskrbo bolnikov z AB, so znašali približno 1 bilijon dolarjev, do leta 2030 bodo predvidoma narasli na okoli 2 bilijona (6). Glede na starostno obdobje, njen začetek ter genetsko komponento, se AB deli v dve obliki: a) AB z zgodnjim začetkom oziroma družinska AB, pri kateri se klinični znaki pojavijo pred 65. letom starosti (*angl.* early-onset form, EOAD) in b) AB s poznim začetkom oziroma sporadična AB s pojavom kliničnih znakov po 65. letu starosti

(*angl.* late-onset form, LOAD) (10-13). Približno 95 % bolnikov ima diagnosticirano obliko AB s poznim začetkom, le 5 % pa obliko AB z zgodnjim začetkom (10). K nastanku oblike AB s poznim začetkom prispevajo tako dejavniki okolja kot tudi genetska predispozicija, zaradi česar govorimo o multifaktorski bolezni. Oblika AB z zgodnjim začetkom nastane zaradi mutacij v enem od treh navedenih genov: a) genu za amiloidni prekurzorski protein (APP) na 21. kromosomu, b) genu za presenilin 1 (*PSEN1*) na kromosomu 14 ter c) genu za presenilin 2 (*PSEN2*) na kromosomu 1 (12). AB se pri bolnikih klinično zrcali s postopno izgubo spomina in intelektualnih sposobnosti do te mere, da njihovo vsakdanje življenje hudo ovira (14). Najbolj značilna nevropatološka znaka AB sta odlaganje zunajceličnih senilnih plakov ter tvorba znotrajceličnih neurofibrilarnih pentelj (NFP) (8). Zunajcelični plaki amiloida- $\beta$  ( $A\beta$ ) so posledica povečane tvorbe in odlaganja peptidov  $A\beta$ , ki nastanejo po cepitvi transmembranskega APP z zaporednim delovanjem encimov sekretaze  $\beta$  in  $\gamma$ . NFP nastanejo s hiperfosforilacijo mikrotubulom pridruženega proteina tau. Hiperfosforilacija serinskih in treoninskih aminokislinskih ostankov proteina tau povzroči, da se ta znotraj celic kopiči ter se oblikuje NFP (15). Poleg že navedenega je za bolezen značilna: a) znižana raven acetilholina (ACh), b) v začetku povečana aktivnost encima acetilholinesteraze (AChE), ki začne z napredovanjem AB v možganih upadati (upad 55–67 % glede na normalne vrednosti), takrat pa se poveča aktivnost encima butirilholinesteraze (BChE) (40–90 % nad normalnimi vrednostmi), c) oksidativni stres, č) motnja homeostaze kovinskih ionov, d) motnja v delovanju holineričnih nevronov oziroma njihov propad ter izguba holineričnih sinaps in e) reaktivna gliozna (6,14-16). Ključnega pomena pri spominskih in miselnih procesih je neurotransmitter ACh. Pomembno vlogo igra pri procesih pomnjenja,

razmišljanja in učenja. Ugotovljeno je, da imajo bolniki z AB močno zmanjšano holinergično inervacijo skorje velikih možganov in hipokampusa (14). Iz tega izhaja, da je AB zelo kompleksna multifaktorska bolezen, za nastanek katere je opisanih več vzročnih hipotez o nastanku bolezni. V zadnjem času se, poleg doslej proučevanih možnih vzrokov, tveganj in mehanizmov nastanka te bolezni, velik del raziskav usmerja v proučevanje možne povezave med AB s poznim začetkom in sladkorno boleznijo tipa 2. Zaradi še ne povsem pojasnjene mehanizma nastanka AB in njenega napredovanja poznamo različne, zahtevne in predvsem zelo kompleksne farmakološke pristope k zdravljenju. V naslednjih poglavjih se bomo osredinili na glavne hipoteze, dejavnike tveganja, vzroke, mehanizme in povezave, ki lahko privedejo do nastanka te bolezni, ter na najpomembnejše farmakološke pristope k simptomatskemu zdravljenju.

## 2 Etiološki dejavniki, dejavniki tveganja in patofiziološki mehanizmi Alzheimerjeve bolezni

Patofiziologija bolezni danes še ni popolnoma pojasnjena. Opisanih je več hipotez, dejavnikov tveganja, vzrokov in mehanizmov, ki lahko privedejo do njenega nastanka. Pri značilnosti bolezni in razumevanju njene patofiziologije so nam v pomoč znani makro- in mikroskopski označevalci ter drugi tkivni označevalci. Na makroskopski ravni je opazna atrofija možganske skorje in hipokampusa, med mikroskopskimi spremembami pa je najbolj viden nastanek zunajceličnih senilnih plakov, znotrajceličnih NFP, obsežna selektivna izguba holinergičnih nevronov ter reaktivna gliosa (6). Kot smo že omenili, se AB klinično deli na dve obliki: oblika z zgodnjim začetkom oziroma družinska oblika ter oblika s poznim začetkom oziroma sporadična. Oblika AB z zgodnjim začetkom je povezana z mutacijami v genu za APP, genih *PSEN1* ter *PSEN2*, njena pojavnost pa je, kot že rečeno, v populaciji nizka (5 %). Poleg teh mutacij, ki so povezane z nastankom AB, je kot pomemben genetski dejavnik tveganja za razvoj AB potrebno omeniti tudi alel za apolipoprotein E (ApoE) gena  $\epsilon 4$ . Pri sporadični obliki, oziroma obliki AB s poznim začetkom, je na podlagi domnevnih vzrokov za nastanek bolezni opisanih več hipotez: holinergična hipoteza, amiloidna hipoteza, hipoteza o hiperfosforilaciji in širjenju proteina tau, hipoteza o mitohondrijski kaskadi, vnetna hipoteza, nevro-vaskularna hipoteza, hipoteza o kovinskih ionih ter hipoteza limfnega sistema (17). Obstajajo pa tudi presnovni in negenetski dejavniki tveganja za nastanek AB, med katere sodijo zvišana raven holesterola v

krvi, debelost, zvišan krvni tlak, sladkorna bolezen tipa 2, motnje spanja, oksidativni stres ter številni drugi. V podpoglavjih, ki sledijo, se bomo seznanili z glavnimi hipotezami, dejavniki tveganja, vzroki, mehanizmi in povezavami, ki lahko privedejo do nastanka AB.

### 2.1 Genetski vzroki in dejavniki tveganja za nastanek bolezni

#### 2.1.1 Mutacije presenilinov 1 in 2 ter gena za amiloidni prekursor protein (APP)

Presenilin (PSEN) uravnava proteolitično aktivnost encima  $\gamma$ -sekretaze, saj je katalitična podenota encima z dvema aspartatnima ostankoma, odgovornima za katalizirano cepitev substrata (18). Presenilin 1 (*PSEN1*, gen *PSEN1* – kromosom 14) ter presenilin 2 (*PSEN2*, gen *PSEN2* – kromosom 1) sta homologna proteina s 66-odstotno sekvenčno podobnostjo (5). Mutacije v genih *PSEN* so povezane z obliko AB z zgodnjim začetkom oziroma z družinsko AB in predstavljajo kar 87 % (81 % mutacije gena *PSEN1* in 6 % mutacije gena *PSEN2*) vseh primerov te oblike bolezni. V ostalih primerih (13 %) gre za mutacije gena za APP (17,18). Posledica mutacije v navedenih genih je nepravilno delovanje encima  $\gamma$ -sekretaze pri procesu proteolize APP, ki se zrcali v delni razgradnji peptidov  $A\beta$  in nastanku večjih količin peptidov  $A\beta_{42}$  pri AB z zgodnjim začetkom. Do sedaj je odkritih 121 mutacij *PSEN1*, mutacij *PSEN2* pa le 13. Raziskave kažejo, da delecija genov *PSEN1* in 2 povzroča motnje spomina in učenja ter smrt nevronov zaradi odsotnosti interakcije med *PSEN1* in antiapoptičnimi proteini družine BCL-2 (5).

#### 2.1.2 Genetski dejavnik tveganja alela $\epsilon 4$ za Apolipoprotein E

ApoE, prisoten skupaj z ApoJ in ApoA<sup>1</sup>, je v možganih primarni nosilec holesterola. Nastaja tudi v astrocitih in deluje kot prenašalec lipidov. Poleg tega sodeluje tudi pri procesu popravila poškodb v možganih in prenosu lipoproteinov prek nosilcev, kot je na primer LPR1 (*angl.* lowdensity lipoprotein receptor-related protein 1). LPR1 ima funkcijo tudi pri procesu odstranjevanja peptidov  $A\beta$ . ApoE kodira gen *ApoE*, pri katerem so bili ugotovljeni 3 aleli:  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  in  $\epsilon 4$ . Ugotovljeno je bilo, da imajo nosilci alela  $\epsilon 4$  za ApoE povečano tveganje za razvoj AB, in sicer zaradi povečane tvorbe peptidov  $A\beta_{42}$ , agregacije  $A\beta$  ali zmanjšane čistosti  $A\beta$ . Poleg tega je pri nosilcih alela  $\epsilon 4$  za ApoE, ki kodira ApoE4, ugotovljeno zmanjšano izražanje IDE (*angl.* insulin degrading enzyme) v

možganih, kar vpliva na razgradnjo zunajceličnega A $\beta$  (5). Pri osebah, ki so homozigoti za alel  $\epsilon 4$  ( $\epsilon 4/\epsilon 4$ ), je tveganje za AB tudi do 15-krat večje v primerjavi z osebami, ki imajo le en alel  $\epsilon 4$ , saj je pri njih tveganje za nastanek bolezni le 3-krat povečano. Po drugi strani pa je ugotovljeno, da alel  $\epsilon 2$  deluje zaščitno in je pozitivno povezan s kognicijo pri staranju, saj ga povezujejo z izboljšanjem vnosa glukoze in glikolize v možganih (7). Alel  $\epsilon 4$  za ApoE je bil na podlagi študij obravnavan tudi kot dejavnik tveganja za nastanek oblike AB s poznim začetkom, ki je povezana s sladkorno boleznijo tipa 2. Znano je, da genotip ApoE vpliva na presnovo glukoze in inzulina, saj je bil ugotovljen vpliv ApoE4 na inzulinske receptorje (IR). ApoE4 moti povezavo endosomov, ki vsebujejo IR s plazemsko membrano, kar povzroči ujetje IR v endosomu. V končni fazi to privede do motene signalizacije inzulina in inzulinske rezistence. Povezava med sladkorno boleznijo tipa 2 in obliko AB s poznim začetkom je specifična pri ljudeh, ki imajo alel  $\epsilon 4$  (gena za ApoE) v primerjavi s tistimi, ki imajo alela  $\epsilon 3$  in  $\epsilon 2$  (gena za ApoE). Ti podatki podpirajo presnovno hipotezo, ki sladkorno bolezen tipa 2 kot ključni dejavnik vključuje v nastanek oblike AB s poznim začetkom (10,11).

## 2.2 Hipoteze o nastanku AD

### 2.2.1 Holinergična hipoteza

Holinergična hipoteza je prva teorija, povezana s patogenezo AB. Med mehanizmi nastanka in razvoja AB je tudi ena najbolj preverjenih (6). Odkritja o zmanjšanem privzemu holina, zmanjšanem izločanju ACh ter izgubi holinergičnih nevronov v Meynertovem bazalnem jedru, so potrdila domnevo o presinaptičnem pomanjkanju ACh. Opisane študije so, skupaj z odkritjem vloge ACh v procesu učenja in pomnjenja, pripeljale do holinergične hipoteze AB. Ta predpostavlja, da degeneracija holinergičnih nevronov v bazalnem delu sprednjih možganov in s tem povezana izguba holinergičnih povezav v skorji velikih možganov ter drugih področjih pomembno prispeva k poslabšanju kognitivnih funkcij pri bolnikih z AB (19). Kot je že bilo omenjeno, je pri bolnikih z AB opazna degeneracija oziroma propad holinergičnih nevronov, izguba sinaps ter motnje v prenosu živčnih signalov. V začetni fazi bolezni je izguba nevronov opazna predvsem v Meynertovem bazalnem jedru in entorinalni skorji. Pri napredovalih stadijih pa je izguba holinergičnih nevronov v Meynertovem bazalnem jedru tudi več kot 90-odstotna. Ugotovljeno je tudi zmanjšano izražanje encima holin acetiltransferaze v nevronih skorje, amigdale, hipokampusa ter v Meynertovem bazalnem

jedru. V teh področjih je pri bolnikih moč zaznati znižano koncentracijo ACh v živčnih končičih, saj je encim holin acetiltransferaza ključnega pomena pri sintezi ACh. Izražanje in aktivnosti drugih encimov, ki so ključni pri sintezi ostalih nevrottransmitterjev (gama amino maslena kislina, dopamin, adrenalin, noradrenalin in 5-hidroksi triptamin), so pri bolnikih z AB v okviru fizioloških vrednosti (17). Holinergična hipoteza potrjuje, da izguba holinergičnih nevronov vodi v pomanjkanje ACh (6). Znižanih vrednosti holin acetiltransferaze in ACh niso ugotovili le pri bolnikih z AB, pač pa tudi pri bolnikih s Parkinsonovo boleznijo in depresijo (17).

### 2.2.2 Amiloidna hipoteza

Amiloidno hipotezo sta leta 1991 kot prva omenila Hardy in Allsop (20). Ugotovila sta mutacijo na genu za APP, prisotnem na 21. kromosomu. Predpostavila sta, da je motnja v presnovi in odlaganju A $\beta$  primarni dejavnik pri AB. Temu sledi hiperfosforilacija proteina tau, formacija NFP ter odmiranje nevronov (17). Značilen patološki znak AB je prisotnost zunajceličnih senilnih plakov, ki jih tvorijo peptidi A $\beta$  (21). Peptidi A $\beta$  nastanejo s cepitvijo transmembranskega APP. Slednji ima obsežen glikozilirani zunajcelični N-terminalni del ter kratek znotrajcelični C-terminalni del (5). Poznamo dve poti proteolitične razgradnje APP, in sicer neamiloidogeno (najpogostejša) ter amiloidogeno. Pri neamiloidogeni poti najprej  $\alpha$ -sekretaza cepi APP, pri čemer se odcepi sAPP $\alpha$ . Kompleks  $\gamma$ -sekretaze nato proteolitično odcepi del proteina na notranji strani membrane nevrona. Ta razgradnja ne povzroči nastanka A $\beta$ , ampak se ustvari topni fragment p3 (22). Pri amiloidogeni razgradnji iz APP po delovanju  $\beta$ - in  $\gamma$ -sekretaz, ki sta vezani na membrano, nastane peptid A $\beta$  (5).  $\beta$ -sekretaza se nahaja v dveh oblikah, in sicer kot BACE1 in 2, med katerima je 65-odstotna podobnost. Pri tvorbi A $\beta$  je pomembna BACE1, ki je močno izražena prav v možganih. Njena izraženos v drugih organih je nizka. BACE1 najprej od APP odcepi sAPP $\beta$ . C-terminalni fragment  $\beta$  (CTF $\beta$ ), ki po cepitvi z BACE1 ostane vezan na membrano, nato cepi  $\gamma$ -sekretaza, pri čemer nastane peptid A $\beta$ . Pri cepitvi je  $\gamma$ -sekretaza nenatančna, posledica tega pa je C-terminalna heterogenost peptidov A $\beta$ . Zato obstajajo različne vrste peptidov A $\beta$ , najpogostejša sta A $\beta_{40}$  (~80–90 %) ter A $\beta_{42}$  (~5–10 %) (5,18,21). Daljši peptidi so bolj hidrofobni in fibrilogeni, zato so tudi najpogostejše vrste, ki se odlagajo v možganih (21). V fizioloških pogojih se zelo majhen del cepitve APP odvije po amiloidogeni poti. Majhne količine A $\beta$ , ki pri tem nastane, odstranijo celice imunskega sistema (17). V patoloških

pogojih je razmerje med nastankom in odstranjevanjem peptida A $\beta$  porušeno, kar je razlog za njegovo odlaganje v obliki oligomerov, protofibril, fibril in zunajceličnih senilnih plakov A $\beta$  (5). Za določene mutacije na APP (Lys670asn/Met671Leu in Ala673Val), ki nastopajo v bližini cepitvenega mesta encima BACE1, je značilna nagnjenost APP k cepitvi preko amiloidogene poti, kar se zrcali v povečani tvorbi in odlaganju A $\beta$  (17). V skladu z amiloidno hipotezo plaki A $\beta$  in/ali njihovi predhodniki sprožijo kaskado dogodkov, ki vodijo do sinaptične disfunkcije, mikroglioze in izgube holinergičnih nevronov. Senilni plaki niso dosledno v korelaciji s kognitivno prizadetostjo. Zato nekateri menijo, da so za odmiranje nevronov odgovorni topni oligomeri A $\beta$  (23), drugi pa menijo, da so za to odgovorni senilni plaki (24). Stopnja kognitivne prizadetosti je v korelaciji s količino oligomerov A $\beta$  v možganih in ne s celokupno količino A $\beta$ . Slednje potrjuje, da so topni oligomeri za nevrone najbolj toksični (25). Oligomeri A $\beta_{42}$  povzročijo motnjo homeostaze kalcija v nevronih in sprožijo nastanek oksidativnega stresa. Povečana aktivnost znotrajceličnega Ca<sup>2+</sup> aktivira endogene fosfolipaze, kar vodi v nastanek lizofosfolipidov in poškodbo plazmaleme. Prehod ionov Ca<sup>2+</sup> v mitohondrije zavre respiracijsko verigo in zmanjša nastanek ATP. Številni procesi, vključno z ohranjanjem antioksidativnega potenciala, so odvisni od ATP. Poleg tega oligomeri A $\beta_{42}$  posredno povečajo hiperfosforilacijo proteina tau, kar povzroči širitev oziroma odpiranje prehodnih por v notranji membrani mitohondrijev, sproščanja citokroma C, povečanje ravni reaktivnih kisikovih zvrsti ter kot posledico apoptozo (5).

### 2.2.3 Hiperfosforilacija proteina tau

Poleg senilnih plakov je prav tako značilen patološki znak za AB nastanek NFP. Gre za nitaste znotrajcelične inkluzije hiperfosforiliranega proteina tau v nevronih pri bolnikih z AB (26). Klinične sindrome, ki jih povzroči bolezenka agregacija proteina tau v daljšem obdobju, imenujemo taupatije (8). Te vključujejo različne neurodegenerativne bolezni: FTD, Pikovo bolezen in kortikobazalno degeneracijo (8,26). Protein tau je mikrotubulom pridružen protein. Igra ključno vlogo pri polimerizaciji, stabilizaciji in delovanju mikrotubulov (27). Poleg fosforilacije je podvržen različnim posttranslacijskim spremembam, kot so acetilacija, nitriranje, glifikacija, O-glikozilacija, navzkrižno povezovanje s transglutaminazo, izomerizacija, sprememba konformacije ter proteolitična cepitev. Vse te spremembe lahko vplivajo na funkcijo in umestitev proteina tau, čeprav njihov pomen v procesu neurodegeneracije še

ni povsem poznan (8,15). Po dosedanjih študijah lahko nekatere posttranslacijske spremembe proteina tau zmanjšajo njegovo fosforilacijo ali pa povečajo njegove škodljive učinke. Koristna naj bi bila serinsko-treoninska O-glikozilacija, ki lahko zmanjša obseg fosforilacije (17). V osrednjem živčnem sistemu je raven proteina tau v nevronih visoka. V manjših količinah se nahaja tudi v astrociti in oligodendrociti. Zaradi vključenosti v proces uravnavanja dinamike mikrotubulov sodeluje tudi pri funkcijah signalizacije celic, sinaptične plastičnosti in uravnavanja genomske stabilnosti. Sporočilno RNA za protein tau kodira gen *MAPT*. Zaradi alternativnega spajanja eksonov 2, 3 in 10 pri ljudeh poznamo 6 glavnih izooblik, kar ustvarja proteine tau s 3 ali 4 veznimi domenami za mikrotubule (3R ali 4R). Pri zdravih ljudeh so v možganih prisotne enake količine proteina tau s 3R in 4R, obstajajo pa področne razlike. Pomembno je, da povečanje ekspresije 4R, ki vključuje ekson 10, lahko vodi v povečano agregacijo proteina tau ter tvorbe NFP. Eden najverjetnejših vzrokov hiperfosforilacije proteina tau je porušeno razmerje med aktivnostjo kinaz in fosfat. Ugotovili so, da aktiviranje glikogen sintazne kinaze 3 (GSK-3) vodi v hiperfosforilacijo proteinov tau (5). Hiperfosforiliran protein tau ima zmanjšano afiniteto za vezavo na mikrotubule, kar privede do destabilizacije in porušanja strukture mikrotubulov (8). Ravno nasproten je učinek insulina, ki z uravnavanjem različnih celičnih presnovnih procesov preprečuje hiperfosforilacijo proteina tau in s tem nevrotoksičnost. Znano je, da insulin in IGF-1 zavirata čezmerno hiperfosforilacijo proteina tau preko inaktivacije GSK-3, ki jo povzroči protein kinaza B (PKB) ter tako stabilizirata strukturo mikrotubulov (5). Poleg tega so posttranslacijske modifikacije, zlasti hiperfosforilacija proteina tau, ključni dejavnik pri dimerizaciji monomerov tau in nastanku nepravilno zviti oligomer tau, kar povzroči njihovo odlaganje in agregacijo v parne spiralne filamente. NFP nastanejo z oblikovanjem snopov parnih spiralnih filamentov, ki se kopičijo v citoplazmi nevronov (28). Same NFP verjetno ne povzročijo nevrotoksičnosti, saj nekatere študije nakazujejo, da so oligomeri tau najbolj toksična oblika proteina tau, ki sprožijo motnje v prenosu signala med nevroni pri AB (29). Poleg tega so študije *in vivo* in *in vitro* pokazale prisotnost opisanih sprememb v različnih področjih možganov (30). Obstaja tudi domneva, da se agregati fibril in nepravilno zvitega proteina tau, podobno kot prioni, sčasoma lahko širijo med celicami in se zato razširijo tudi v druga področja možganov pri bolnikih z AB (17). Hiperfosforilacija proteina tau se v končni fazi zrcali z izgubo strukturne integritete mikrotubulov, motenim aksonalnim transportom, mitohondrijsko

disfunkcijo ter spremembo sinaptične strukture in funkcije (23). Ugotovljeno je bilo, da mutacija gena za protein tau lahko privede do nastanka demence, za razliko od mutacije gena za APP, ki pogosteje privede do nastanka AB. Pri razlagi slednjega se uporabljata dva modela. Kaskadni model navaja, da povečana raven peptidov A $\beta$  vodi do hiperfosforilacije tau. Model, ki vključuje dve poti, pa pravi, da tako peptidi A $\beta$  kot tudi hiperfosforilacija proteina tau privedejo do izgube nevronov pri AB (5). Poleg navedenega je bila, na podlagi pred nekaj leti opravljenih študij, ugotovljena povezava med motnjami v prenosu inzulinskega signala in patološkimi spremembami proteina tau. To povezavo podrobneje opisuje poglavje Vpliv inaktiviranja IR na hiperfosforilacijo proteina tau.

## 2.2.4 Nevrovnetni proces in oksidativni stres

### 2.2.4.1 Nevrovnetni proces

Posledica odlaganja A $\beta$  v možganih je vnetni odziv, ki vodi v aktiviranje kaskade komplementa, celic mikroglije ter rekrutiranje astrocitov (31). Na območjih, ki obkrožajo depozite A $\beta$ , so astrociti podvrženi aktiviranju, pri čemer lahko sprostijo številne signalne molekule. Poleg aktiviranja astrocitov je v bližini agregatov A $\beta$  ugotovljeno tudi aktiviranje mikroglije (32). V fizioloških pogojih igra mikroglija ključno vlogo pri ohranjanju homeostaze in plastičnosti osrednjega živčnega sistema. Mikroglija je tudi prva obramba v možganih (33). Aktivirana mikroglija sodeluje pri številnih celičnih procesih. Ključne poti vključujejo celično proliferacijo, migracijo kot odgovor na signalne molekule ter sproščanje citotoksičnih in vnetnih mediatorjev. S sproščanjem snovi, kot so proteaze, kisikove reaktivne zvrsti, dušikov oksid in vnetni citokini, lahko mikroglija deluje enako kot citotoksične efektorske celice. Poleg tega lahko aktivirana mikroglija fagocitira A $\beta$  in manjše agregate A $\beta$ , ni pa še povsem pojasnjeno, ali lahko uspešno odstrani večje agregate in fibrile (32). Ta odziv verjetno pomaga pri odstranjevanju agregatov A $\beta$ , vendar lahko hkrati spodbudi tudi izločanje mediatorjev vnetja, ki pa povzročijo škodo (22). Rezultati raziskav kažejo, da imajo fibrilarne oblike A $\beta$  velik pomen pri aktiviranju mikroglije. Pri bolnikih z AB vezava A $\beta$  na celice mikroglije poteka preko receptorskega kompleksa CD36-TLR4-TLR6 ali preko vnetnega kompleksa NLRP3, kar povzroči izločanje mediatorjev vnetja (na primer TNF $\alpha$ ) in v končni fazi privede do vnetnega odziva. Med vnetnim procesom nastajajo kemokini, kisikove reaktivne zvrsti in vnetni citokini, ki deregulirajo prvotni imunski odziv in v končni fazi privedejo do neurodegeneracije. Pri bolnikih z AB je

povečana raven TNF $\alpha$ , IL1- $\beta$ , TNF $\beta$ , IL12 in IL18 v korelaciji z napredovanjem bolezni in povečano stopnjo poškodb oziroma prizadetosti možganov (17). Poleg tega lahko aktivirana mikroglija moti nastanek sinaps in nevronske plastičnost v vnetnem okolju (22). Večje število raziskav je pokazalo, da se patologije tau drastično poslabšajo med pojavom akutnih in kroničnih vnetnih procesov (6). Aktiviranja vnetne kaskade lahko vključujejo spremembe v fosforilaciji tau hkrati z oksidativno poškodbo nevronov (22). Glede na vse te vplive igra odlaganje A $\beta$  v možganih pomembno vlogo pri patogenezi AB. Rezultat tega je kronični vnetni odziv, ki prispeva k neurodegeneraciji.

### 2.2.4.2 Oksidativni stres

Oksidativni stres je porušeno razmerje med prooksidanti in antioksidanti ter s tem povezanim nastankom redoksnih motenj in makromolekulskih poškodb. Do nastanka oksidativnega stresa privede povečana tvorba kisikovih/dušikovih reaktivnih zvrsti in/ali zmanjšana tvorba antioksidantov (17). Predpostavlja se, da je razvoj AB neposredna posledica povečanega oksidativnega stresa v možganih (22). Oksidativni stres je vpleten v različna patofiziološka stanja, vključno z neurodegenerativnimi motnjami. Dokazano je, da z oksidativnim stresom povzročeno vnetje aktivno sovпада z etiopatologijo AB. Vnetni proces je povezan s tvorbo kisikovih reaktivnih zvrsti, ki delujejo kot signali za aktiviranje vnetnih genov. Kisikove reaktivne zvrsti so v celici fiziološko prisotne v minimalni koncentraciji kot stranski produkti aerobne presnove, pa tudi kot sekundarne sporočilne molekule v številnih signalnih poteh. V normalnih pogojih obstaja dinamično ravnovesje med prooksidanti in antioksidanti (31). Do nastanka oksidativnega stresa lahko privede: a) povečano odlaganje živega srebra, železa in aluminija v možganih ter njihove lastnosti, da lahko spodbudijo nastajanje prostih radikalov preko Fentonovih in Haber-Weissovih reakcij, b) povečana peroksidacija lipidov, c) povečana oksidacija beljakovin in DNK, č) zmanjšanje presnove energije in d) zmanjšane aktivnosti citokrom c-oksidge. Senilni plaki in NFP prispevajo k nastanku oksidativnega stresa preko tvorbe končnih produktov glikacije, malondialdehidov, karbonilov, peroksinitritov, hemoksigenaze 1 in superoksid dismutaze 1 ter nena zadnje sposobnosti ustvarjanja prostih radikalov preko A $\beta$  (22,34). Glavni vir proizvodnje kisikovih reaktivnih zvrsti je moteno delovanje mitohondrijske elektronske prenosne verige, vnetni odziv ter aktivirana mikroglija (31). A $\beta$  povzroči oksidativni stres, saj sproži tvorbo superoksidnih anionov, vodikovega peroksida ter nena zadnje hidroksilnih anionov. Preko Haber-Weissove in

Fentonove reakcije nastanejo zelo reaktivni hidroksilni anioni, ki so ključne kisikove reaktivne zvrsti, ki poškodujejo membranske lipide, proteine in druge biološke molekule. Oksidativni stres, povzročen z  $A\beta$ , tako nastane ob povečani sintezi prostih radikalov ob prisotnosti železa, bakra ter cinka, ki se koncentrirajo znotraj jedra in na periferiji agregatov  $A\beta$  (22).  $A\beta$  je tudi ekscitotoksičen. Povečana ekscitacija vodi do vdora in v povečano znotrajcelično aktivnost  $Ca^{2+}$ . Posledica je lahko prehod  $Ca^{2+}$  v mitohondrije in blokiranje respiracijske verige, aktiviranje fosfolipaze  $A_2$  in poškodba plazme membrane, povečano delovanje  $3Na^+/Ca^{2+}$  izmenjevalca in aktiviranje znotrajceličnih proteaz. Poleg tega  $A\beta$  aktivira tudi z oksidativnim stresom povezane signalne poti preko oksidativnega stresa oziroma motenj v energijski presnovi (17). Nenazadnje tudi same reaktivne kisikove zvrsti povečajo tvorbo in agregacijo  $A\beta$  ter hiperfosforilacijo proteina tau, kar pomeni začetek destruktivnega cikla (5,22). Pomembno vlogo pri preprečevanju in obvladovanju AB igrajo antioksidativni sistemi v možganih. Celični sistem, ki ščiti pred nastankom oksidativnega stresa, je sistem tioredoksina. Proteini tega sistema s svojimi redoksnimi lastnostmi modulirajo delovanje in izražanje drugih beljakovin, vključno z različnimi transkripcijskimi dejavniki, ki so ključni za razvoj in nadzor preživetja celic ali njihove smrti (22). Poleg tega so pri bolnikih z AB ugotovili značilno povečano raven mitohondrijske DNA ter encima citokrom c-oksidade, zmanjšana pa je bila količina intaktnih oziroma nepoškodovanih mitohondrijev ter raven nekaterih ključnih encimov oksidativne presnove (17).

### 2.2.5 Povezava med sladkorno boleznijo tipa 2 in Alzheimerjevo boleznijo

Hoyer je že v prejšnjem stoletju predstavil teorijo o nefunkcionalni signalizaciji inzulina pri obliki AB s poznim začetkom in nastankom t.i. centralne inzulinske rezistence (35). Sprva so obstajale le teorije o možni povezavi med sladkorno boleznijo tipa 2 in obliko AB s poznim začetkom, ki so jih kasneje potrdili na podlagi epideomioloških in kliničnih študij. Te so pokazale, da sta hiperglikemija in hiperinzulinemija v korelaciji z nastankom oblike AB s poznim začetkom (11). Pri ljudeh je bila pomembnost signalizacije inzulina pri AB potrjena z intracerebroventrikularnim vnosom streptozotocina (diabetogena učinkovina), kajti po vnosu so se pri njih pojavili različni patološki znaki, zelo podobni tistim, ki se pojavijo pri ljudeh z obliko AB s poznim začetkom. Poleg tega je bilo ugotovljeno, da inzulin in glukoza bolnikom z AB izboljša njihovo sposobnost za

učenje in pomnjenje (17). Presnovna hipoteza v povezavi z obliko AB s poznim začetkom temelji na dejstvu, da so IR razširjeni povsod v možganih, visoka raven njihovega izražanja je predvsem v vohalnem betiču, hipotalamusu, hipokampusu, možganski skorji, striatumu in malih možganih (11,36). Dosedanje študije so pokazale: a) značilno zmanjšanje IR v možganih pri bolnikih z obliko AB s poznim začetkom, b) značilno zmanjšanje IR in IGF1R v hipokampusu, hipotalamusu in frontalnem delu skorje velikih možganov pri bolnikih z obliko AB s poznim začetkom, c) da inzulinska rezistenca v hipokampusu preprečuje pravilno strukturiranje spomina (povzroča kognitivne motnje) in č) da vezava oligomerov  $A\beta$  na IR povzroči internalizacijo IR ter inzulinsko rezistenco pri obliki AB s poznim začetkom (11).

#### 2.2.5.1 Vpliv oligomerov $A\beta$ na centralno inzulinsko rezistenco

Z napredovanjem sladkorne bolezni tipa 2 se poveča tako tvorba  $A\beta$ , kot tudi hiperfosforilacija proteina tau. Sladkorna bolezen tipa 2 in  $A\beta$  sodelujeta pri nastanku neurodegenerativnih motenj pri obliki AB s poznim začetkom. Predvideva se, da topni oligomeri  $A\beta$  delujejo kot sinaptotoksini. Poleg tega sta tako  $A\beta$  kot tudi inzulin amiloidogena peptida z enako vezavno sekvenco za IR. Zato obstaja verjetnost, da se  $A\beta$ , tako kot inzulin, lahko veže na IR. Na podlagi tega je mogoče sklepati, da vezava  $A\beta$  na IR zaradi antagonističnega vpliva povzroči nastanek inzulinske rezistence, ki vodi v aktiviranje GSK3- $\beta$  in hiperfosforilacijo proteina tau. Oba procesa, tvorba  $A\beta$  in hiperfosforilacija proteina tau, imata sinergistični učinek, ki vodi v disfunkcijo nevronov. Raziskave so pokazale, da tvorba  $A\beta_{42}$  povzroči inzulinsko rezistenco v jetrih preko aktiviranja Janusove kinaze 2 (JAK2). Poleg tega peptidi  $A\beta$ , ki nastajajo v možganih, dosežejo hipotalamus, ki deluje kot nadzorni center presnovnih procesov v telesu. Tam preko nevrovnetnih mehanizmov povzročijo motnje presnovnih procesov ter s tem spremenijo energetske bilanco, ki še dodatno spodbuja napredovanje sladkorne bolezni tipa 2. Znano je tudi, da oligomeri  $A\beta$  v hipokampusu privedejo do aktiviranja astrocitov, kar se zrcali v povečanem izločanju citokinov, predvsem TNF $\alpha$ , ki aktivira JNK1 (*angl.* c-Jun N-terminal kinase 1). Ta pa privede do inzulinske rezistence ter hiperfosforilacije proteina tau (11).

#### 2.2.5.2 Vpliv inaktivacije IR na hiperfosforilacijo proteina tau

Nedavno opravljene študije so ugotovile povezavo med motnjami v prenosu inzulinskega signala in patološkimi spremembami proteina tau. Vežava inzulina

aktivira IR, kar vodi v aktiviranje IRS-1 in 2 (*angl.* insulin receptor substrate 1/2), ki vzpostavi številne signalne poti. Fosfatidilinozitol 3-kinaza (PIK) pretvori fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat (PIP<sub>2</sub>) v fosfatidilinozitol-3,4,5-fosfat (PIP<sub>3</sub>), ki sodeluje pri aktiviranju PKB. To vodi do translokacije glukoznega prenašalca tipa 4 (GLUT4) na plazemsko membrano (11). Sočasno pa aktiviranje PKB, ki povzroči fosforilacijo številnih znotrajceličnih proteinov (mTOR, FOXO, GSK3, CREB, filamin A, sintaza NO), vpliva na različne celične odzive, vključno na fosforilacijo proteina tau (11,36). V fizioloških pogojih številne kinaze in fosfataze uravnavajo ravnovesje med fosforilacijo in defosforilacijo substratov, da ohranjajo ravnovesje v nevronih. V proces fosforilacije proteina tau so vključene številne kinaze (GSK3-β, CDK5, MARK, PKA, PKB, ERK1/2, JNK). Pomembna je zlasti glikogen sintazna kinaza 3-β (GSK3-β) (10). Njeno aktiviranje zavira fosforilacijo, spodbujena s PKB. Ob pojavu inzulinske rezistence pa njeno aktiviranje poveča fosforilacijo proteina tau in znotrajcelični nastanek NFP, kar so dokazale tudi genetsko spremenjene linije miši NIRKO, ki imajo zmanjšano aktivnost PKB. Pri njih so ugotovili povečano aktivnost GSK3-β in hiperfosforilacijo proteina tau v regijah, ki so povezane z nastankom oblike AB s poznim začetkom. Poleg tega je bilo dokazano, da fosforilacija serinskih ostankov IRS-1 inaktivira IRS-1 in povzroči inzulinsko rezistenco v hipokampusu. Zato nastanek inzulinske rezistence privede do sprememb v proteinu tau (hiperfosforilacija) ter do oblike AB s poznim začetkom (11). Poleg dejstva, da inzulinska rezistenca stimulira hiperfosforilacijo in agregacijo proteina tau, kar se zrcali v tvorbi NFP, nedavne študije dokazujejo tudi, da hiperfosforilirani protein tau in njegovi agregati akumulirajo inzulin (10).

### 3 Farmakološki pristopi zdravljenja Alzheimerjeve bolezni

Kljub prizadevanjem pa do danes še ni pojasnjen mehanizem nastanka in napredovanja AB. Prav tako tudi še niso odkrili učinkovine, ki bi preprečila razvoj oziroma popolnoma ustavila napredovanje bolezni. Znane so predvsem učinkovine, ki ublažijo simptome AB.

#### 3.1 Zaviralci holinesteraz

Pri bolnikih z AB so, v skladu s holinergično hipotezo, v določenih možganskih regijah ugotovili zmanjšano aktivnost encima holin acetiltransferaze in zato tudi nižjo raven ACh. Za povečanje razpoložljivosti ACh v sinaptični špranji, ter s tem za izboljšanje holinergične

funkcije v sinapsah, se klinično za simptomatsko zdravljenje AB zelo pogosto uporabljajo zaviralci holinesteraz, ki za krajše obdobje zmanjšajo simptome motenj kognitivnih funkcij pri AB. Ti zavirajo delovanje encimov AChE in/ali BChE, ki sta odgovorna za razgradnjo nevrottransmitterja ACh (6). Spojine, ki zavirajo delovanje teh encimov, so lahko naravnega ali sintetičnega izvora. V Laboratoriju za fiziologijo Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani smo v okviru predkliničnih raziskav proučili vplive različnih, tako naravnih kot tudi sintetičnih, zaviralcev holinesteraz na delovanje perifernega živčno-mišičnega sistema (37-42). Kljub ogromnemu številu raziskav po vsem svetu, katerih namen je bilo odkritje novih zdravil s takšnim načinom delovanja, je organizacija EMA (*angl.* European medicines agency) do danes odobrila le 4 učinkovine: takrin (1995), donepezil (1998), rivastigmin (1998) in galantamin (2000) (43). Takrin je nekompetitivni, neselektivni, reverzibilni zaviralec AChE s kratkim razpolovnim časom. Zaradi slabe biološke razpoložljivosti in neželenih učinkov (zlasti hepatotoksičnosti) so ga leta 2012 umaknili s trga (44). Donepezil, piperidinski derivat, je nekompetitivni, selektivni, reverzibilni zaviralec AChE (s slabo zaviralno močjo proti BChE). Zlahka prehaja krvno-možgansko pregrado, deluje zaviralno že pri nanomolarnih koncentracijah in bistveno izboljša kognitivne funkcije. Zaradi vključenosti citohroma P450 lahko v procesu njegove presnove pride do interakcij z drugimi zdravili, zato je tu potrebna previdnost (6,45-47). Rivastigmin zavira tako AChE kot tudi BChE (48). Gre za močnega in počasi reverzibilnega zaviralca (psevdoireverzibilni zaviralec) AChE (49). Od odobrenih učinkovin je tu še galantamin, naravni alkaloid, izoliran iz zvončka (*Galanthus woronowii*). Je kompetitivni, selektivni, hitro reverzibilni zaviralec AChE (46,50,51). Veže se tudi na nikotinske acetilholinske receptorje (nAChR - α4β2, α3, α6β4, in α7) in deluje kot senzibilizator oziroma pozitivni alosterični modulator nAChR (vezava na druga vezavna mesta kot ACh ter drugi nikotinski agonisti in antagonisti) (45,52,53). Z alosterično vezavo na nAChR lahko galantamin potencira delovanje agonistov (npr. ACh) teh receptorjev (45). Potrebno je poudariti, da donepezil, rivastigmin in galantamin izboljšajo kognitivne funkcije pri bolnikih z blago in zmerno stopnjo AB, ne preprečujejo pa pojava oziroma napredovanja te bolezni (17).

#### 3.2 Antagonisti receptorjev N-metil-D aspartata

Za simptomatsko zdravljenje AB se uporabljajo tudi antagonisti receptorjev N-metil-D aspartata (NMDA).



**Tabela 1:** Skupine zaviralcev, ki zavirajo  $\beta$ -sekretazo - BACE1 in njihovi predstavniki.

Skupine zaviralcev BACE1	Predstavniki
Naravni zaviralci BACE1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2,2',4' trihidroksikalkon; sladki koren (<i>Glycyrrhiza glabra</i>) (59),</li> <li>• ginenozid Rg1; <i>Panax notoginseng</i> (59),</li> <li>• polimetoksiflavoni (5,7-dimetoksiflavon, 5,7,4'-trimetoksiflavon, 3,5,7,3'4'-pentametoksiflavon); črni ingver (58),</li> <li>• derivati triflavonoidov; <i>Selaginella doederleinii</i> (58),</li> <li>• ursolna kislina in lupeol; <i>Leea indica</i> (58).</li> </ul>
Peptidomimetični zaviralci BACE1	Spojine na osnovi: <ul style="list-style-type: none"> <li>• izoftalamida,</li> <li>• hidroksietilamina,</li> <li>• hidroksietilaminizoster (58).</li> </ul>
Nepeptidomimetične zaviralci BACE1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Spojine na osnovi:</li> <li>• acilgvanidina,</li> <li>• 2-aminopiridina,</li> <li>• aminoimidazola,</li> <li>• amino/iminohidantoina,</li> <li>• aminotiazolina,</li> <li>• aminoksazolina,</li> <li>• dihidrokinazolina,</li> <li>• aminokinolina,</li> <li>• aminopirolidina (58).</li> </ul>
Zaviralci BACE1, vključeni v klinična testiranja	<ul style="list-style-type: none"> <li>• MK-8931 (verubecestat),</li> <li>• E2609 (elenbecestat),</li> <li>• AZD3293 (lanabecestat),</li> <li>• JNJ-54861911 (atabecestat),</li> <li>• umibecestat (17).</li> </ul>
BACE1 zaviralca, vključena v III. fazo kliničnih testiranj	<ul style="list-style-type: none"> <li>• MK-8931 (verubecestat),</li> <li>• E2609 (elenbecestat) (17,58).</li> </ul>

Memantin (1-amino-3,5-dimetil adamantan) je nekompetitivni antagonist NMDA receptorjev, ki ga je EMA odobrila leta 2002 (54). Uporablja se za zdravljenje AB tako v začetnih kot tudi napredovalnih stadijih bolezni. Zmanjšuje ekscitotoksičnost in nevrodegeneracijo, ki jo povzroča glutamatom. S preprečevanjem vezave glutamata na receptorje NMDA lahko zmanjša hiperfosforilacijo proteina tau in ščiti pred toksičnim učinkom peptidov A $\beta$  (55,56). Raziskave dokazujejo, da zdravilo zmanjša nevropsihiatrične simptome AB v primerjavi s placebom. Ugotovljeno je bilo tudi, da uporaba memantina bistveno ne blaži simptomov vznemirjenosti pri ljudeh z zmerno do hudo AB (57).

### 3.3 Farmakološke učinkovine, ki preprečujejo nastajanje in agregacijo netopnih peptidov A $\beta$ ali pospešujejo njegovo odstranjevanje

Trenutne glavne strategije zdravljenja, ki temeljijo na amiloidni hipotezi so: a) zaviralci  $\beta$ - (BACE1) in  $\gamma$ -sekretaze, b) snovi, ki preprečujejo agregacijo A $\beta$ , c) snovi, ki uravnavajo aktivnosti proteaz (povečajo odstranjevanje

A $\beta$ ) ter č) imunoterapija. V tem poglavju se bomo osredinili predvsem na snovi, ki delujejo zaviralno na encim  $\beta$ -sekretazo - BACE1 ter na pripravke monoklonskih protiteles, katerih tarča je A $\beta$  (imunoterapija AB) (17). Glavna encima, ki sodelujeta v amiloidogeni poti cepitve APP, sta BACE1 in  $\gamma$ -sekretaza. Zaviralci sekretaz zavrejo delovanje teh encimov v amiloidogeni poti cepitve APP in s tem preprečijo tvorbo netopnih peptidov A $\beta$  ter nastanek senilnih plakov (6). Zaradi resnih neželenih učinkov zaviralcev  $\gamma$ -sekretaze se večja pozornost namenja razvoju zaviralcev BACE1. Te delimo v tri skupine, in sicer peptidomimetične, nepeptidomimetične in naravne (Tabela 1) (58).

Pri skupini BACE1 zaviralcev velja posebej omeniti spojine, ki so bile vključene v klinična testiranja: MK-8931 (verubecestat), E2609 (elenbecestat), AZD3293 (lanabecestat), JNJ-54861911 (atabecestat) in umibecestat (17). Nobena od navedenih spojin ni bila vključena v IV. fazo kliničnih testiranj. Omeniti pa je treba dve spojini, ki sta dosegli III. fazo kliničnih testiranj, to sta MK-8931 in E2609. Nobena od navedenih spojin pa do sedaj ni uspešno zaključila III. fazo kliničnih testiranj (58). Poleg

zaviralcev BACE1, ki preprečujejo nastajanje netopnih peptidov A $\beta$ , poznamo tudi monoklonska protitelesa proti že nastalim peptidom A $\beta$ . Solanezumab, gentenerumab, crenezumab ter adukanumab so pripravki monoklonskih protiteles, katerih tarča je A $\beta$ . Bili so vključeni v klinična testiranja. Solanezumab se lahko veže na monomere in topne peptide A $\beta$ . Gentenerumab se veže na oligomere in fibrile A $\beta$ , poleg tega pa lahko sproži fagocitozo plakov preko mikroglije. Tu sta še crenezumab in adukanumab; tarča prvega so monomeri, oligomeri in fibrile A $\beta$ , tarča drugega pa agregati A $\beta$ . Za adukanumab je bilo ugotovljeno tudi, da zmanjšuje odlaganje A $\beta$ . Klinična testiranja prvih treh pripravkov so se končala najpozneje v III. fazi (17), pri adukanumabu pa je neodvisni odbor za spremljanje podatkov marca 2019 ugotovil, da je premalo dokazov, ki bi podpirali njegovo učinkovitost pri zdravljenju AB. Farmacevtski proizvajalec Biogen je zato ustavil vsa klinična testiranja. Kasnejše dodatne analize podatkov so pokazale, da adukanumab v najvišjih odmerkih zmanjša napredovanje kognitivnih in funkcionalnih motenj pri bolnikih v začetnem stadiju AB. Na podlagi te ugotovitve je ameriški Urad za hrano in zdravila (*angl.* Food and drug administration, FDA) avgusta 2020 sprejel vlogo za pridobitev dovoljenja za promet z zdravilom adakanumab in ga uvrstil na prednostni seznam. Adukanumab je pripravek človeških monoklonskih protiteles IgG1 z visoko afiniteto, ki so usmerjena proti konformacijskemu epitopu, prisotnemu na oligomerih A $\beta$ . Pridobljena so iz avtoimunskih limfocitov B od starejših, kognitivno normalnih posameznikov. Izkazalo se je, da zdravljenje bolnikov z adukanumabom v začetnem stadiju bolezni zmanjšuje odlaganje A $\beta$  v možganih in upočasni upad kognitivnih funkcij v odvisnosti od odmerka. Raziskave nakazujejo, da je adukanumab zelo verjetno enako učinkovit tudi pri odstranjevanju A $\beta$ , ne glede na genotip ApoE. Monoklonska protitelesa drugih pripravkov so se v večji meri usmerila proti N-terminalni regiji A $\beta$  in so prepoznavala samo monomere. Pripravki monoklonskih protiteles, ki so bili usmerjeni proti N-terminalni regiji A $\beta$ , so bili zelo učinkoviti pri zdravljenju transgenih mišjih modelov z AB, vendar pa, za razliko od adukanumaba, niso pokazali terapevtskega učinka pri ljudeh (60,61). Če bo adakanumab odobren, bo to prvo zdravilo, ki bo pokazalo, da je odstranjevanje A $\beta$  povezano z boljšim kliničnim izidom AB.

### 3.4 Farmakološke učinkovine, katerih tarča je protein tau

Pri nastanku AB je hipoteza o hiperfosforilaciji in

širjenju proteina tau ena od pomembnejših. Farmakološke učinkovine, katerih tarča delovanja je protein tau, lahko razdelimo v več kategorij: a) zaviralce agregacije proteina tau, b) taukinazne zaviralce, c) zaviralce O-GlcNAc, č) stabilizatorje mikrotubulov ter d) imunoterapijo. Na tem mestu bi bilo potrebno poudariti, da so zaviralci GSK3- $\beta$  zelo pomembna terapevtska učinkovina (17). GSK-3 je serinska/treoninska protein kinaza. Obstajata dve izoobliki: GSK-3 $\alpha$  in GSK-3 $\beta$ . Slednja se deli na dva podtipa, in sicer na GSK-3 $\beta$ 1 in 2. GSK-3 $\beta$ 1 je prisotna v številnih organih, medtem ko se GSK-3 $\beta$ 2 nahaja le v osrednjem živčnem sistemu (6). GSK-3 je odgovorna za fosforilacijo in zato inaktiviranje glikogen sintaze, nadzor presnove glikogena, uravnavanje proliferacije celic in celičnega cikla. Pri AB aktiviranje GSK-3 $\beta$  sproži hiperfosforilacijo proteina tau, kar povzroči njegovo odlaganje, agregacijo v parne spiralne filamente, tvorbo NFP in motnjo v fizioloških procesih znotraj nevronov (23,28). Ta proces je mogoče zavreti z uporabo zaviralcev. Ti lahko delujejo posredno z uravnavanjem fosfatov ali primarnih kinaz, ki vplivajo na substrate GSK3. Aktivnost GSK3 tako uravnavajo kinaze (PKB, PKC, PKA, p38) ali fosfataze (PP2A, PP1). Neposredno pa na zmanjšanje aktivnosti GSK3 vplivamo z uporabo majhnih molekul kot visoko specifičnih zaviralcev (62). Glede na izvor delimo zaviralce iz te skupine na izolirane iz naravnih virov, katione in majhne sintetične molekule. Glede na mehanizem zaviranja pa ločimo kompetitivne in nekompetitivne ATP zaviralce ter substratno kompetitivne zaviralce (Tabela 2).

Rezultati poskusnega 24-tedenskega zdravljenja so pri spojini NP031112 (tideglusib) pokazali izboljšanje kognitivnih sposobnosti pri bolnikih z blago oziroma zmerno AB (63). Poleg zaviralcev GSK-3 $\beta$  je potrebno omeniti tudi zaviralce agregacije proteina tau, zaviralce t.i. pfoleinov »heat-shock« (hsp 90) ter cepiva, katerih tarča je hiperfosforiliran protein tau. Nekateri od zaviralcev agregacije proteina tau, na primer učinkovina TRx0237, so dosegli klinično fazo testiranja. Rezultati III. faze kliničnega testiranja so pokazali, da ta učinkovina zmanjša atrofijo možganov pri bolnikih z AB. V klinični fazi testiranja sta tudi dve cepivi, ACI-35 in AADvac1, katerih tarča je hiperfosforiliran protein tau (17).

### 3.5 Učinkovine za zmanjševanje nevrovnetnega procesa

Nevrovnetni proces, ki ga je moč ugotoviti pri bolnikih z AB, ima poleg mnogih negativnih vplivov tudi nekatere pozitivne učinke, tj. npr. odstranjevanje

**Tabela 2:** Skupine zaviralcev glikogen sintazne kinaze 3 (GSK3) in njihovi predstavniki.

Skupine zaviralcev GSK3	Predstavniki
Kationski zaviralci GSK3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• litij (6,63),</li> <li>• berilij (63),</li> <li>• cink (63),</li> <li>• živo srebro (63),</li> <li>• baker (63).</li> </ul>
ATP - kompetitivni naravni zaviralci GSK3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• bis-indolindirubin,</li> <li>• indorubin analogi,</li> <li>• debromohimendizin,</li> <li>• himendizin,</li> <li>• meridianini (6,63).</li> </ul>
ATP - kompetitivni sintetični zaviralci GSK3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• aminopiridini, ki jih je sintetiziral Chironi – CHIR98014, CHIR98023, CHIR99021,</li> <li>• arilindolmalemida – SB-216763 in SB-415286,</li> <li>• aminotiazol – AR-A014418,</li> <li>• paulona – kenpaulon in alsterpaulon (63).</li> </ul>
ATP - nekompetitivni naravni zaviralci GSK3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• menzamin A,</li> <li>• spojine, izolirane iz morskih organizmov <i>Ircinia sp</i> (63).</li> </ul>
ATP - nekompetitivni sintetični zaviralci GSK3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• tiadiazolidinoni – NP00111, NP031112, NP031115,</li> <li>• halometilketonski derivati (6,63).</li> </ul>
Zaviralec GSK3, ki je dosegel II. fazo kliničnih testiranj	<ul style="list-style-type: none"> <li>• NP031112 (tideglusib) (63).</li> </ul>

Legenda: GSK3 – glikogen sintazne kinaze 3; ATP – adenzin trifosfat.

agregatov A $\beta$ . Negativni učinki vnetja so povezani z nastajanjem snovi v času vnetnega procesa: kemokinov, kisikovih reaktivnih zvrsti in vnetnih citokinov, ki deregulirajo prvotni imunski odziv in v končni fazi privedejo do degeneracije nevronov (22). Rezultati številnih raziskav kažejo na možno pomembnost pri uporabi učinkovin s protivnetnim delovanjem pri bolnikih z AB, zato so protivnetne učinkovine celekoksib, naproksen in lornoksikam preizkušali v kliničnih testiranjih. Analiza terapevtske učinkovitosti je pokazala, da pri naproksenu in celekoksibu ni večjih koristi v primerjavi s placebom, poleg tega pa so se pojavili tudi neželeni učinki, zaradi česar so preizkušanje ustavili v III. fazi (17). Prav tako so zaradi neučinkovitosti pri bolnikih z AB ustavili klinično preizkušanje učinkovine lornoksikam. Vsa ta dejstva kažejo potrebo po dodatnih raziskavah o klinični uporabi protivnetnih učinkovin pri AB.

Velikega pomena je tudi preprečevanje, odkrivanje in zdravljenje metabolnih in genetskih dejavnikov tveganja za nastanek AB, med katere sodijo sladkorna bolezen tipa 2, zvišana raven holesterola v krvi in zvišan krvni tlak. Razvidno je, da obstajajo povezave med temi boleznimi in AB, ki lahko vplivajo na razvoj oziroma napredovanje AB.

## 4 Zaključek

Alois Alzheimer je pred več kot 100 leti prvi poročal o bolezni, ki se sedaj poimenuje po njem. Kljub ogromnemu številu raziskav AB v zadnjih desetletjih in velikim finančnim vložkom vanje ostaja še veliko vprašanj v zvezi z etiologijo, patogenezo ter zdravljenjem te bolezni nepojasnjenih. V zadnjem obdobju nam izvedba različnih genskih, molekularskih in celičnih študij z napredno tehnologijo omogoča nove možnosti za vpogled, ki bi lahko pomagal razjasniti koncept patogeneze. To bi prispevalo k odkrivanju novih terapevtskih tarč in učinkovin oziroma terapevtskih pristopov, s katerimi ne bi le upočasnili, ampak tudi uspešno preprečili nastanek bolezni oziroma njeno napredovanje.

### Izjava o navzkrižju interesov

Avtorji nimamo navzkrižja interesov.

### Zahvala

To delo je podprto s sredstvi ARRS raziskovalnega programa P4-0053, P3-067 in sredstvi ARRS za mlade raziskovalce Tomaža Trobca. Barbara Burjak pa je pomagala pri jezikovnem urejanju besedila, za kar se ji prav lepo zahvaljujemo.

## Literatura

- Kogoj A. Etiologija Alzheimerjeve bolezni in drugih najpogostejših demenc. *Farm Vestn.* 2008;59(2):55-8.
- Kobentar R, Kogoj A, Zorc-Maver D, Skela-Savič B. Ocena samostojnosti stanovančev, obolelih z demenco, pri zadovoljevanju temeljnih življenjskih potreb v domovih starejših v Ljubljani. *Zdrav Vestn.* 2015;84:544-53.
- Statistični urad Republike Slovenije. Projekcije prebivalstva za Slovenijo 2015. Ljubljana: Statistični urad RS; 2017.
- Statistični urad Republike Slovenije. Število in sestava prebivalstva. Ljubljana: Statistični urad RS; 2020.
- Dubey SK, Lakshmi KK, Krishna KV, Agrawal M, Singhvi G, Saha RN, et al. Insulin mediated novel therapies for the treatment of Alzheimer's disease. *Life Sci.* 2020;249:117540. DOI: [10.1016/j.lfs.2020.117540](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117540) PMID: [32165212](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32165212/)
- Dos Santos Picanco LC, Ozela PF, de Fatima de Brito Brito M, Pinheiro AA, Padilha EC, Braga FS, et al. Alzheimer's disease: a review from the pathophysiology to diagnosis, new perspectives for pharmacological treatment. *Curr Med Chem.* 2018;25(26):3141-59. DOI: [10.2174/0929867323666161213101126](https://doi.org/10.2174/0929867323666161213101126) PMID: [30191777](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30191777/)
- Di Resta C, Ferrari M. New molecular approaches to Alzheimer's disease. *Clin Biochem.* 2019;72:81-6. DOI: [10.1016/j.clinbiochem.2019.04.010](https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2019.04.010) PMID: [31018113](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31018113/)
- Hoskin JL, Sabbagh MN, Al-Hasan Y, Decourt B. Tau immunotherapies for Alzheimer's disease. *Expert Opin Investig Drugs.* 2019;28(6):545-54. DOI: [10.1080/13543784.2019.1619694](https://doi.org/10.1080/13543784.2019.1619694) PMID: [31094578](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31094578/)
- Toepper M, Falkenstein M. Driving fitness in different forms of dementia: an update. *J Am Geriatr Soc.* 2019;67(10):2186-92. DOI: [10.1111/jgs.16077](https://doi.org/10.1111/jgs.16077) PMID: [31386780](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31386780/)
- Chatterjee S, Mudher A. Alzheimer's disease and type 2 diabetes: a critical assessment of the shared pathological traits. *Front Neurosci.* 2018;12:383. DOI: [10.3389/fnins.2018.00383](https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00383) PMID: [29950970](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29950970/)
- Folch J, Ettcheto M, Busquets O, Sánchez-López E, Castro-Torres RD, Verdagué E, et al. The Implication of the brain insulin receptor in late onset Alzheimer's disease dementia. *Pharmaceuticals (Basel).* 2018;11(1):11. DOI: [10.3390/ph11010011](https://doi.org/10.3390/ph11010011) PMID: [29382127](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29382127/)
- Mendiola-Precoma J, Berumen LC, Padilla K, Garcia-Alcocer G. Therapies for prevention and treatment of Alzheimer's disease. *BioMed Res Int.* 2016;2016:2589276. DOI: [10.1155/2016/2589276](https://doi.org/10.1155/2016/2589276) PMID: [27547756](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27547756/)
- Swerdlow RH, Burns JM, Khan SM. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: progress and perspectives. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1842(8):1219-31. DOI: [10.1016/j.bbadis.2013.09.010](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.09.010) PMID: [24071439](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24071439/)
- Volpato D, Holzgrave U. Designing hybrids targeting the cholinergic system by modulating the muscarinic and nicotinic receptors: a concept to treat Alzheimer's disease. *Molecules.* 2018;23(12):3230. DOI: [10.3390/molecules23123230](https://doi.org/10.3390/molecules23123230) PMID: [30544533](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30544533/)
- Saha P, Sen N. Tauopathy: A common mechanism for neurodegeneration and brain aging. *Mech Ageing Dev.* 2019;178:72-9. DOI: [10.1016/j.mad.2019.01.007](https://doi.org/10.1016/j.mad.2019.01.007) PMID: [30668956](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30668956/)
- Mushtaq G, Greig NH, Khan JA, Kamal MA. Status of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2014;13(8):1432-9. DOI: [10.2174/1871527313666141023141545](https://doi.org/10.2174/1871527313666141023141545) PMID: [25345511](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25345511/)
- Liu PP, Xie Y, Meng XY, Kang JS. History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. *Signal Transduct Target Ther.* 2019;4(1):29. DOI: [10.1038/s41392-019-0063-8](https://doi.org/10.1038/s41392-019-0063-8) PMID: [31637009](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31637009/)
- Escamilla-Ayala A, Wouters R, Sannerud R, Annaert W. Contribution of the Presenilins in the cell biology, structure and function of  $\gamma$ -secretase. *Semin Cell Dev Biol.* 2020;105:12-26. DOI: [10.1016/j.semcdb.2020.02.005](https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.02.005) PMID: [32146031](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32146031/)
- 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(2):137-47. DOI: [10.1136/jnnp.66.2.137](https://doi.org/10.1136/jnnp.66.2.137) PMID: [10071091](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10071091/)
- Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci.* 1991;12(10):383-8. DOI: [10.1016/0165-6147\(91\)90609-V](https://doi.org/10.1016/0165-6147(91)90609-V) PMID: [1763432](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1763432/)
- Levine H, Walker LC. Molecular polymorphism of Abeta in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2010;31(4):542-8. DOI: [10.1016/j.neurobiolaging.2008.05.026](https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.05.026) PMID: [18619711](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18619711/)
- Rojas-Gutierrez E, Muñoz-Arenas G, Treviño S, Espinosa B, Chavez R, Rojas K, et al. Alzheimer's disease and metabolic syndrome: A link from oxidative stress and inflammation to neurodegeneration. *Synapse.* 2017;71(10):e21990. DOI: [10.1002/syn.21990](https://doi.org/10.1002/syn.21990) PMID: [28650104](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28650104/)
- Hayne DJ, Lim S, Donnelly PS. Metal complexes designed to bind to amyloid- $\beta$  for the diagnosis and treatment of Alzheimer's disease. *Chem Soc Rev.* 2014;43(19):6701-15. DOI: [10.1039/C4CS00026A](https://doi.org/10.1039/C4CS00026A) PMID: [24671229](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24671229/)
- Vyas NA, Bhat SS, Kumbhar AS, Sonawane UB, Jani V, Joshi RR, et al. Ruthenium(II) polypyridyl complex as inhibitor of acetylcholinesterase and A $\beta$  aggregation. *Eur J Med Chem.* 2014;75:375-81. DOI: [10.1016/j.ejmech.2014.01.052](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.01.052) PMID: [24556150](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24556150/)
- Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2010;362(4):329-44. DOI: [10.1056/NEJMra0909142](https://doi.org/10.1056/NEJMra0909142) PMID: [20107219](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20107219/)
- LaFerla FM, Oddo S. Alzheimer's disease: Abeta, tau and synaptic dysfunction. *Trends Mol Med.* 2005;11(4):170-6. DOI: [10.1016/j.molmed.2005.02.009](https://doi.org/10.1016/j.molmed.2005.02.009) PMID: [15823755](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15823755/)
- Duan AR, Jonasson EM, Alberico EO, Li C, Scripture JP, Miller RA, et al. Interactions between tau and different conformations of tubulin: implications for tau function and mechanism. *J Mol Biol.* 2017;429(9):1424-38. DOI: [10.1016/j.jmb.2017.03.018](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.03.018) PMID: [28322917](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28322917/)
- Chong FP, Ng KY, Koh RY, Chye SM. Tau proteins and tauopathies in Alzheimer's disease. *Cell Mol Neurobiol.* 2018;38(5):965-80. DOI: [10.1007/s10571-017-0574-1](https://doi.org/10.1007/s10571-017-0574-1) PMID: [29299792](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29299792/)
- Fá M, Puzzo D, Piacentini R, Staniszewski A, Zhang H, Baltrons MA, et al. Extracellular tau oligomers produce an immediate impairment of LTP and memory. *Sci Rep.* 2016;6(1):19393. DOI: [10.1038/srep19393](https://doi.org/10.1038/srep19393) PMID: [26786552](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26786552/)
- Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, Abramowski D, Frank S, Probst A, et al. Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol.* 2009;11(7):909-13. DOI: [10.1038/ncb1901](https://doi.org/10.1038/ncb1901) PMID: [19503072](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19503072/)
- Di Bona D, Scapagnini G, Candore G, Castiglia L, Colonna-Romano G, Duro G, et al. Immune-inflammatory responses and oxidative stress in Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Curr Pharm Des.* 2010;16(6):684-91. DOI: [10.2174/138161210790883769](https://doi.org/10.2174/138161210790883769) PMID: [20388078](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20388078/)
- Galasko D, Montine TJ. Biomarkers of oxidative damage and inflammation in Alzheimer's disease. *Biomarkers Med.* 2010;4(1):27-36. DOI: [10.2217/bmm.09.89](https://doi.org/10.2217/bmm.09.89) PMID: [20383271](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20383271/)
- Dansokho C, Heneka MT. Neuroinflammatory responses in Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna).* 2018;125(5):771-9. DOI: [10.1007/s00702-017-1831-7](https://doi.org/10.1007/s00702-017-1831-7) PMID: [29273951](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29273951/)
- Verri M, Pastoris O, Dossena M, Aquilani R, Guerriero F, Cuzzoni G, et al. Mitochondrial alterations, oxidative stress and neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2012;25(2):345-53. DOI: [10.1177/039463201202500204](https://doi.org/10.1177/039463201202500204) PMID: [22697066](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22697066/)
- Hoyer S. Neurodegeneration, Alzheimer's disease, and beta-amyloid toxicity. *Life Sci.* 1994;55(25-26):1977-83. DOI: [10.1016/0024-3205\(94\)00377-7](https://doi.org/10.1016/0024-3205(94)00377-7) PMID: [7997056](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7997056/)
- Arnold SE, Arvanitakis Z, Macauley-Rambach SL, Koenig AM, Wang HY, Ahima RS, et al. Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer disease: concepts and conundrums. *Nat Rev Neurol.* 2018;14(3):168-81. DOI: [10.1038/nrneurol.2017.185](https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.185) PMID: [29377010](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29377010/)
- Botić T, Defant A, Zanini P, Žužek MC, Frangež R, Janussen D, et al. Discorhabdin alkaloids from Antarctic *Latrunculia* spp. sponges as a new class of cholinesterase inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2017;136:294-304. DOI: [10.1016/j.ejmech.2017.05.019](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.05.019) PMID: [28505534](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28505534/)

38. Grandič M, Araújo R, Molgó J, Turk T, Sepčić K, Benoit E, et al. The non-competitive acetylcholinesterase inhibitor APS12-2 is a potent antagonist of skeletal muscle nicotinic acetylcholine receptors. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012;265(2):221-8. DOI: [10.1016/j.taap.2012.09.024](https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.09.024) PMID: 23046821
39. Moodie LW, Žužek MC, Frangež R, Andersen JH, Hansen E, Olsen EK, et al. Synthetic analogs of stryphnusin isolated from the marine sponge *Stryphnus fortis* inhibit acetylcholinesterase with no effect on muscle function or neuromuscular transmission. *Org Biomol Chem.* 2016;14(47):11220-9. DOI: [10.1039/C6OB02120D](https://doi.org/10.1039/C6OB02120D) PMID: 27841892
40. Ristovski S, Uzelac M, Kljun J, Lipec T, Uršič M, Zemljič Jokhadar Š, et al. Organoruthenium prodrugs as a new class of cholinesterase and glutathione-S-transferase inhibitors. *ChemMedChem.* 2018;13(20):2166-76. DOI: [10.1002/cmdc.201800432](https://doi.org/10.1002/cmdc.201800432) PMID: 30126080
41. Trobec T, Žužek MC, Sepčić K, Kladnik J, Kljun J, Turel I, et al. Structural and functional characterization of an organometallic ruthenium complex as a potential myorelaxant drug. *Biomed Pharmacother.* 2020;127:110161. DOI: [10.1016/j.biopha.2020.110161](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110161) PMID: 32380389
42. Žužek MC, Grandič M, Benoit E, Frangež R. Natural polymeric 3-alkylpyridinium salt affects vertebrate skeletal muscle contractility by preferentially blocking neuromuscular transmission. *Toxicol Lett.* 2017;281:95-101. DOI: [10.1016/j.toxlet.2017.09.007](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.09.007) PMID: 28939337
43. Maia MA, Sousa E. BACE-1 and gamma-secretase as therapeutic targets for Alzheimer's disease. *Pharmaceuticals (Basel).* 2019;12(1):41. DOI: [10.3390/ph12010041](https://doi.org/10.3390/ph12010041) PMID: 30893882
44. Moodie LW, Sepčić K, Turk T, Frangež R, Svenson J. Natural cholinesterase inhibitors from marine organisms. *Nat Prod Rep.* 2019;36(8):1053-92. DOI: [10.1039/C9NP00010K](https://doi.org/10.1039/C9NP00010K) PMID: 30924818
45. Colović MB, Krstić DZ, Lazarević-Pašti TD, Bondžić AM, Vasić VM. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Curr Neuroparmacol.* 2013;11(3):315-35. DOI: [10.2174/1570159X11311030006](https://doi.org/10.2174/1570159X11311030006) PMID: 24179466
46. Pohanka M. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2011;155(3):219-29. DOI: [10.5507/bp.2011.036](https://doi.org/10.5507/bp.2011.036) PMID: 22286807
47. Wilkinson DG. The pharmacology of donepezil: a new treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opin Pharmacother.* 1999;1(1):121-35. DOI: [10.1517/14656566.1.1.121](https://doi.org/10.1517/14656566.1.1.121) PMID: 11249555
48. Desai AK, Grossberg GT. Rivastigmine for Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother.* 2005;5(5):563-80. DOI: [10.1586/14737175.5.5.563](https://doi.org/10.1586/14737175.5.5.563) PMID: 16162080
49. Polinsky RJ. Clinical pharmacology of rivastigmine: a new-generation acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Clin Ther.* 1998;20(4):634-47. DOI: [10.1016/S0149-2918\(98\)80127-6](https://doi.org/10.1016/S0149-2918(98)80127-6) PMID: 9737824
50. Kitisripanya N, Saparpakorn P, Wolschann P, Hannongbua S. Binding of huperzine A and galanthamine to acetylcholinesterase, based on ONIOM method. *Nanomedicine.* 2011;7(1):60-8. DOI: [10.1016/j.nano.2010.08.004](https://doi.org/10.1016/j.nano.2010.08.004) PMID: 20851778
51. Pilger C, Bartolucci C, Lamba D, Tropsha A, Fels G. Accurate prediction of the bound conformation of galanthamine in the active site of Torpedo californica acetylcholinesterase using molecular docking. *J Mol Graph Model.* 2001;19(3-4):288-96. DOI: [10.1016/S1093-3263\(00\)00056-5](https://doi.org/10.1016/S1093-3263(00)00056-5) PMID: 11449566
52. Hahn B, Shrieves ME, Olmstead CK, Yuille MB, Chiappelli JJ, Pereira EF, et al. Evidence for positive allosteric modulation of cognitive-enhancing effects of nicotine in healthy human subjects. *Psychopharmacology (Berl).* 2020;237(1):219-30. DOI: [10.1007/s00213-019-05363-4](https://doi.org/10.1007/s00213-019-05363-4) PMID: 31686175
53. Maelicke A, Samochocki M, Jostock R, Fehrenbacher A, Ludwig J, Albuquerque EX, et al. Allosteric sensitization of nicotinic receptors by galantamine, a new treatment strategy for Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry.* 2001;49(3):279-88. DOI: [10.1016/S0006-3223\(00\)01109-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(00)01109-4) PMID: 11230879
54. Bullock R. Efficacy and safety of memantine in moderate-to-severe Alzheimer disease: the evidence to date. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2006;20(1):23-9. DOI: [10.1097/01.wad.0000201847.29836.a5](https://doi.org/10.1097/01.wad.0000201847.29836.a5) PMID: 16493232
55. Gordon ML, Kingsley PB, Goldberg TE, Koppel J, Christen E, Keehlisen L, et al. An open-label exploratory study with memantine: correlation between proton magnetic resonance spectroscopy and cognition in patients with mild to moderate Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord Extra.* 2012;2(1):312-20. DOI: [10.1159/000341604](https://doi.org/10.1159/000341604) PMID: 22962555
56. Miguel-Hidalgo JJ, Alvarez XA, Cacabelos R, Quack G. Neuroprotection by memantine against neurodegeneration induced by beta-amyloid(1-40). *Brain Res.* 2002;958(1):210-21. DOI: [10.1016/S0006-8993\(02\)03731-9](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)03731-9) PMID: 12468047
57. Maidment ID, Fox CG, Boustani M, Rodriguez J, Brown RC, Katona CL. Efficacy of memantine on behavioral and psychological symptoms related to dementia: a systematic meta-analysis. *Ann Pharmacother.* 2008;42(1):32-8. DOI: [10.1345/aph.1K372](https://doi.org/10.1345/aph.1K372) PMID: 18056833
58. Moussa-Pacha NM, Abdin SM, Omar HA, Alniss H, Al-Tel TH. BACE1 inhibitors: current status and future directions in treating Alzheimer's disease. *Med Res Rev.* 2020;40(1):339-84. DOI: [10.1002/med.21622](https://doi.org/10.1002/med.21622) PMID: 31347728
59. Zhang C. Natural compounds that modulate BACE1-processing of amyloid-beta precursor protein in Alzheimer's disease. *Discov Med.* 2012;14(76):189-97. PMID: 23021373
60. Crehan H, Lemere CA. Anti-amyloid- $\beta$  immunotherapy for Alzheimer's disease. In: Wolf MS, ed. *Developing therapeutics for alzheimer's disease.* London: Academic Press; 2016. pp. 193-226. DOI: [10.1016/B978-0-12-802173-6.00007-1](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802173-6.00007-1)
61. Marciani DJ. Development of an effective Alzheimer's vaccine. In: Hayat MA, ed. *Immunology.* London: Academic Press; 2018. pp. 149-69.
62. Hernández F, Nido JD, Avila J, Villanueva N. GSK3 inhibitors and disease. *Mini Rev Med Chem.* 2009;9(9):1024-9. DOI: [10.2174/138955709788922647](https://doi.org/10.2174/138955709788922647) PMID: 19689399
63. Eldar-Finkelman H, Martinez A. GSK-3 Inhibitors: Preclinical and Clinical Focus on CNS. *Front Mol Neurosci.* 2011;4:32. DOI: [10.3389/fnmol.2011.00032](https://doi.org/10.3389/fnmol.2011.00032) PMID: 22065134