



Δράση «Εμβληματικές δράσεις σε διαθεματικές επιστημονικές περιοχές με ειδικό ενδιαφέρον για την σύνδεση με τον παραγωγικό ιστό» ID 16618

Εθνικό δίκτυο έρευνας για την ανάδειξη της γενετικής βάσης των νευροεκφυλιστικών νόσων Alzheimer και Parkinson, την ανίχνευση αξιόπιστων βιοδεικτών και την ανάπτυξη καινοτόμων υπολογιστικών τεχνολογιών και θεραπευτικών στρατηγικών στη βάση της ιατρικής ακριβείας (BRAIN PRECISION, TAEDR-0535850)

ΤΙΤΛΟΣ ΠΑΡΑΔΟΤΕΟΥ: Έλεγχος της συσχέτισης γενετικών παραγόντων με την ευαισθησία χολινεργικών νευρώνων στο κυτταρικό στρες και την απόπτωση

ΕΝΟΤΗΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ 4: Ανάπτυξη κυτταρικών και ζωικών μοντέλων, καθώς και νέων βιοδεικτών για τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες Alzheimer και Parkinson.

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ (ΦΟΡΕΑΣ): ΙΩΑΝΝΗΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΠΟΥΛΟΣ (ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ)

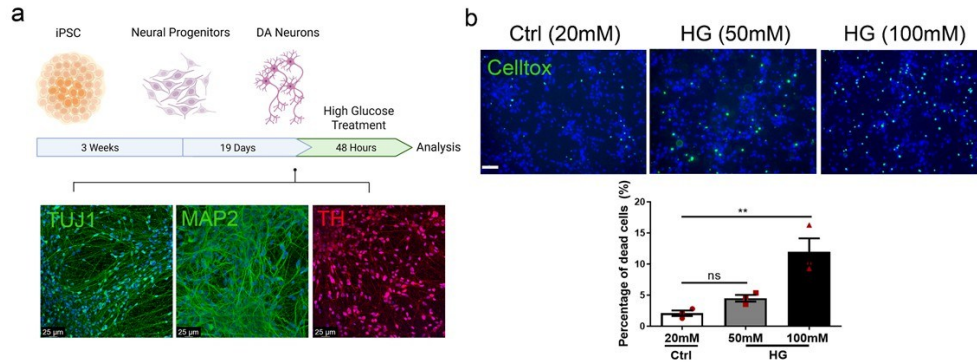
Έλεγχος της συσχέτισης γενετικών παραγόντων με την ευαισθησία χολινεργικών νευρώνων στο κυτταρικό στρες και την απόπτωση

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

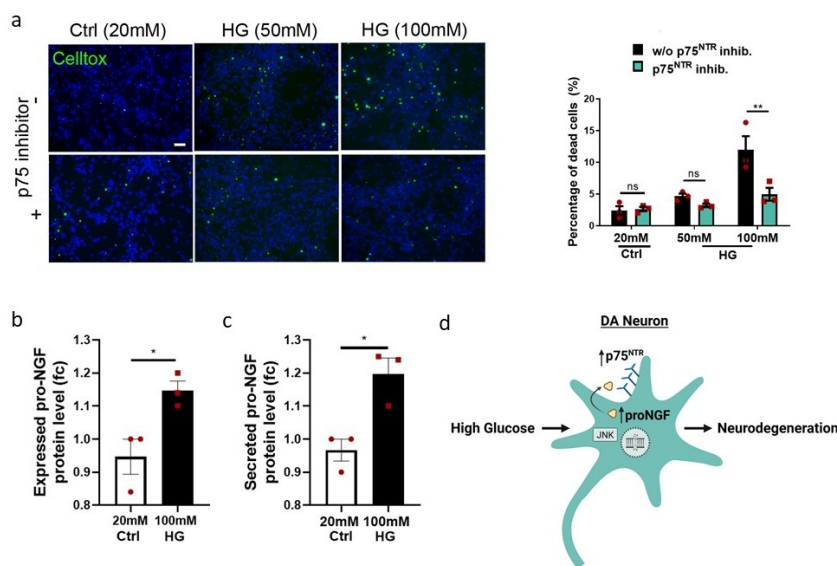
Η ερευνητική ομάδα του **Καθ. Ιωάννη Χαραλαμπόπουλου** συμμετείχε στην υλοποίηση της ανάπτυξης καινοτόμων προκλινικών παρεμβάσεων καθώς και κυτταρικών και ζωικών μοντέλων της Νόσου Αλτςχάιμερ. Στην πρώτη φάση του έργου η ομάδα ανέπτυξε λειτουργικά μοντέλα ανθρώπινων βλαστικών κι ώριμων νευρικών και γλοιακών (αστροκυττάρων και μικρογλοίας) κυττάρων, προερχόμενων από υγιείς δότες αλλά κι ασθενείς με Νόσο Αλτςχάιμερ (NA), στοχεύοντας στον έλεγχο της θεραπευτικής δράσης και του μηχανισμού νέων φαρμακολογικών μορίων.

Στην δεύτερη φάση του έργου η ερευνητική ομάδα, με την καθοδήγηση της μεταδιδάκτορος Δρ Κωνσταντίνης Χανουμίδου και την συμμετοχή των υποψηφίων διδασκτόρων κας Ιωάννας Ζώτα (ολοκλήρωσε επιτυχώς την διδακτορική της διατριβή) και κας Χρυστάλλας Κωνσταντίνου, χρησιμοποιώντας τα προαναφερθέντα ανθρώπινα μοντέλα νευρικών κυττάρων, μελέτησε ειδικά την επίδραση μεταβολικών διαταραχών στη νευροεκφύλιση ντοπαμινεργικών νευρώνων, παθολογία που σχετίζεται με νευροεκφυλιστικές νόσους όπως η Νόσος Αλτςχάιμερ αλλά και η Νόσος Πάρκινσον. Η υπεργλυκαιμία, χαρακτηριστικό γνώρισμα του Σακχαρώδη Διαβήτη, αποτελεί μια μεταβολική κατάσταση που επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό το νευρικό σύστημα. Επιδημιολογικές και πειραματικές μελέτες σε ζωικά μοντέλα συνδέουν τον Διαβήτη με δυσλειτουργία του ντοπαμινεργικού συστήματος και αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης των νευροεκφυλιστικών νόσων Αλτςχάιμερ και Πάρκινσον. Ωστόσο, οι υποκείμενοι μοριακοί μηχανισμοί παραμένουν ασαφείς. Σε αυτό το πλαίσιο διερευνήσαμε την επίδραση της υψηλής γλυκόζης σε ανθρώπινους ντοπαμινεργικούς νευρώνες προερχόμενους από ανθρώπινα επαγόμενα πολυδύναμα κύτταρα (iPSC) με έμφαση στον ρόλο του υποδοχέα νευροτροφινών p75 (p75NTR).

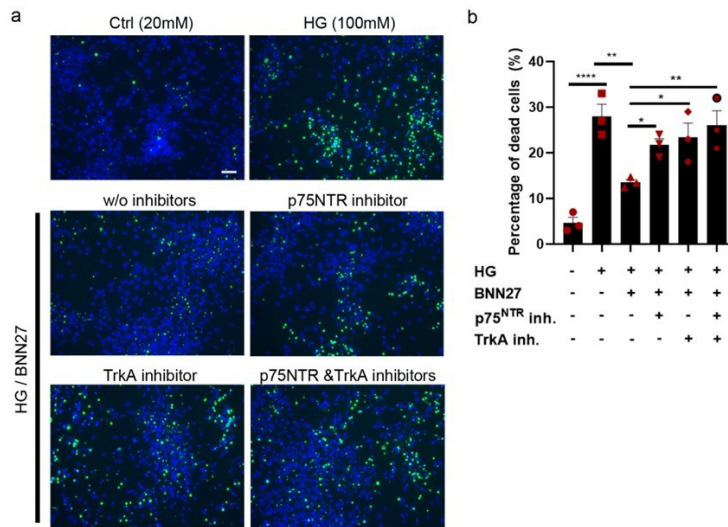
Η έκθεση των νευρώνων σε υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης προκάλεσε ενεργοποίηση του προ-αποπτωτικού άξονα pro-NGF/p75NTR και κυτταρικό θάνατο (**Εικόνες 1 & 2**). Η αναστολή της λειτουργίας του p75NTR παρεμπόδισε τον κυτταρικό θάνατο, αναδεικνύοντας τον p75NTR ως σημαντικό μεσολαβητή της νευροτοξικότητας (**Εικόνα 2**). Η χρήση BNN27, ενός συνθετικού αναλόγου του NGF, απέτρεψε το θάνατο των νευρώνων δρώντας μέσω των υποδοχέων p75NTR και TrkA (**Εικόνα 3**) υποδεικνύοντας τη σημασία της σηματοδότησης των νευροτροφινών ως δυνητικού θεραπευτικού στόχου για την αντιμετώπιση της νευρικής βλάβης που προκαλείται από την υψηλή γλυκόζη. Τα παραπάνω ευρήματά υποδηλώνουν ότι η υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης διαταράσσει τη βιωσιμότητα των ντοπαμινεργικών νευρώνων μέσω της ενεργοποίησης του άξονα pro-NGF/p75NTR. Τα αποτελέσματα της μελέτης προτείνουν ότι η στόχευση της σηματοδότησης του p75NTR ενδέχεται να προσφέρει νευροπροστατευτικά οφέλη στη νευροεκφύλιση που σχετίζεται με τον Διαβήτη, ιδιαίτερα σε ασθενείς με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου Πάρκινσον.



Εικόνα 1. Η υψηλή γλυκόζη έχει προ-αποπτωτική δράση σε ανθρώπινους ντοπαμινεργικούς νευρώνες. **α)** Σχηματική απεικόνιση της διαφοροποίησης των κυττάρων και των διαδικασιών χορήγησης γλυκόζης. Την Ημέρα 19 της διαφοροποίησης, οι νευρώνες εκτέθηκαν σε υψηλή γλυκόζη (HG, 50 mM ή 100 mM) για 48 ώρες. Η ταυτότητα των κυττάρων επιβεβαιώθηκε με ανοσοχρώση για τους νευρωνικούς δείκτες TUJ1 (πράσινο), MAP2 (πράσινο) και τον ντοπαμινεργικό δείκτη TH (κόκκινο). Κλίμακα: 25 μ m. **β)** Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας CellTox. Αντιπροσωπευτικές εικόνες και ποσοτικοποίηση των νεκρών νευρώνων (πράσινο) μετά από έκθεση των κυττάρων σε HG για 48 ώρες. Κλίμακα: 50 μ m.



Εικόνα 2. Ο άξονας pro-NGF/p75NTR συμβάλλει στη νευροτοξικότητα που προκαλείται από υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες. **α)** Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας CellTox. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες και ποσοτικοποίηση των νεκρών νευρώνων (πράσινο) μετά από αγωγή με υψηλή γλυκόζη (HG, 50 mM, 100 mM) και/ή αναστολέα του p75NTR (2,5 ng/ml, αντίσωμα κατά του υποδοχέα p75, anti-p75 Receptor antibody (MC-192), Abcam) για 48 ώρες. Κλίμακα: 50 μ m. **β,γ)** Ποσοτικοποίηση με ELISA των επιπέδων της πρωτεΐνης pro-NGF (β) στο εσωτερικό των κυττάρων και (γ) των εκκρινόμενων επιπέδων της πρωτεΐνης στο υπερκείμενο των ντοπαμινεργικών νευρώνων που υποβλήθηκαν σε αγωγή με υψηλή γλυκόζη (HG, 100 mM) για 48 ώρες. **δ)** Σχηματική απεικόνιση της επαγόμενης οδού pro-NGF/p75NTR στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες μετά την έκθεση σε υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης.



Εικόνα 3. Η ένωση BNN27 καταστέλλει τη νευροτοξική δράση της υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης μέσω των υποδοχών p75NTR και TrkA. Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας CellTox. **(α)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες και **(β)** ποσοτικοποίηση των νεκρών νευρώνων (πράσινο) μετά από αγωγή με υψηλή γλυκόζη (HG, 100 mM), BNN27 (1 μM), αναστολέα p75NTR (2,5 ng/ml, αντίσωμα anti-p75 Receptor (MC-192)) και/ή αναστολέα TrkA (20 μM, GW441756,) για 48 ώρες. Κλίμακα: 50 μm.

Η μελέτη αυτή έχει υποβληθεί προς δημοσίευση στο ιατρικό περιοδικό *Stem Cell Research and Therapy* (IF: 7.2), έχει αξιολογηθεί κι έχει επανυποβληθεί προς τελική αξιολόγηση (Chanoumidou K., Zota I., Papadopoulou MA., Konstantinou C., Tsimpolis A., Tsagliotis E., Tziortziou M., Ntarntani K., Grünwald A., Lavigne MD., Gravanis A., Charalampopoulos I. [Targeting p75NTR activity alleviates the neurotoxic effect of high glucose on iPSC-derived dopaminergic neurons.](#)), όπου υπάρχει αναφορά στην υποστήριξη από το συγκεκριμένο έργο.

Επιπροσθέτως των πειραμάτων σε ανθρώπινα νευρικά και γλοιακά κύτταρα, η ερευνητική ομάδα του Καθ. Χαραλαμπόπουλου, προχώρησε στην ανάπτυξη κυτταρικών μοντέλων από ζωικά μοντέλα. Συγκεκριμένα, απομονώσαμε και συλλέξαμε εγκεφαλικό φλοιό (cerebral cortices) από μύες του στελέχους C57BL/6, ηλικίας P1-P3, και παρασκευάσαμε μικτές γλοιακές καλλιέργειες. Αφού απομονώσαμε τον εγκεφαλικό ιστό από τους μύες, διαχωρίσαμε τον εγκεφαλικό φλοιό σε τρυβλίο που περιείχε διάλυμα HBSS 1x υπό στείρες συνθήκες στους 4°C. Διαχωρίσαμε τον εγκεφαλικό φλοιό σε δύο ημισφαίρια και αφαιρέσαμε προσεκτικά τις μήνιγγες. Ακολουθώντας, τεμαχίσαμε σε μικρότερα τμήματα τον ιστό και τον μεταφέραμε σε 20ml HBSS 1x, στο οποίο προσθέσαμε 2,5% τρυψίνη και επώασαμε τα δείγματα για 10 λεπτά στους 37°C. Μετά το πέρας της επώασης απομακρύνουμε το διάλυμα τρυψίνης και προχωρήσαμε σε δυο πλύσεις με διάλυμα HBSS 1x που περιείχε 20% FBS, όπου φυγοκεντρήσαμε τα δείγματα για 5 λεπτά και απομακρύνουμε το υπερκείμενο μετά από κάθε φυγοκέντρηση. Επαναδιαλυτοποιήσαμε το κυτταρικό ίζημα σε DMEM High glucose 1x, 10% FBS h/a, 2% P/S (cortex medium) και συνεχίσαμε με μηχανική ομογενοποίηση των κυττάρων με διαδοχικά στάδια φυγοκεντρήσεων. Στο τελικό κυτταρικό εναιώρημα συμπληρώσαμε κατάλληλο μέσο έως τον επιθυμητό όγκο και μεταφέραμε τα κύτταρα σε πιάτα στα οποία είχαμε προετοιμάσει με laminin. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν στους 37°C σε 5% CO₂. Τέλος, ακολουθήσαμε διαφορετικά πρωτόκολλα για να

πάρουμε καθαρό πληθυσμό αστροκυττάρων και μικρογλοιακών κυττάρων, όπως περιγράφουμε παρακάτω.

Πρωτόκολλο απομόνωσης αστροκυττάρων από C57BL/6

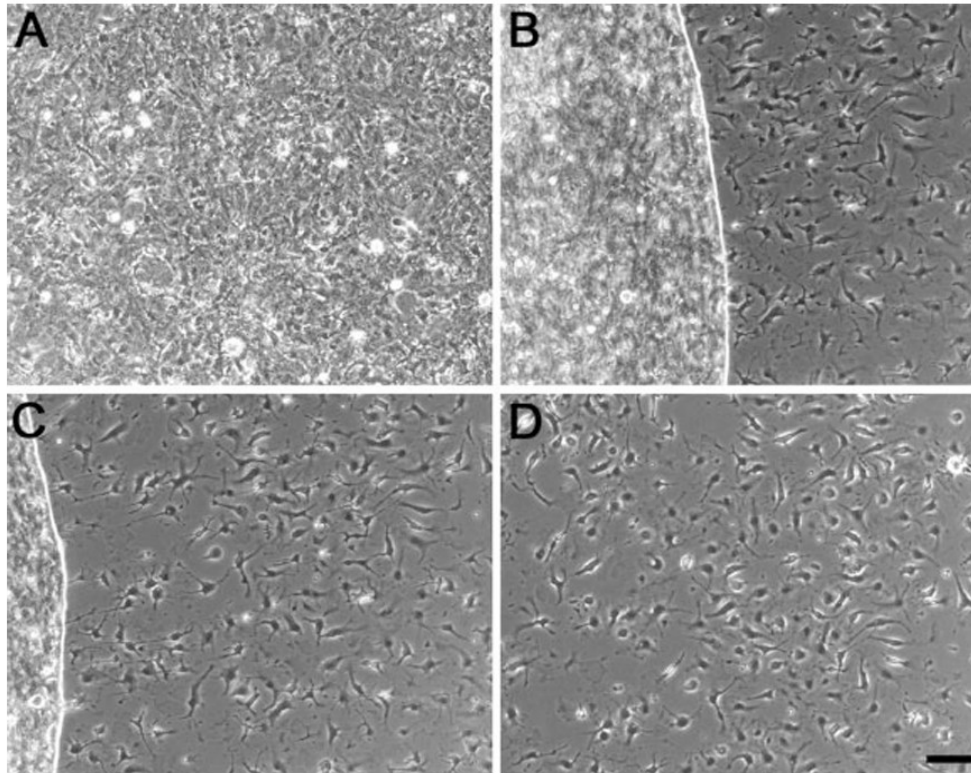
Καθαρές καλλιέργειες αστροκυττάρων απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν χρησιμοποιώντας το δημοσιευμένο πρωτόκολλο των Solà C et al. Μετά την συλλογή των κυττάρων από τον εγκεφαλικό φλοιό, διατηρήσαμε τα μικτά γλοιακά κύτταρα σε καλλιεργητικό μέσο. Μεταξύ της 6ης και 8ης ημέρας προσθέσαμε Ara-C (10 μM) στο καλλιεργητικό μέσο για 4 ημέρες. Στη συνέχεια, αντικαταστήσαμε το καλλιεργητικό μέσο και την επόμενη μέρα οι καλλιέργειες μεταφέρθηκαν χειροκίνητα (passage). Ανανεώναμε το καλλιεργητικό μέσο κάθε 3 ημέρες. Χρησιμοποιήσαμε τις καλλιέργειες αστροκυττάρων μετά το δεύτερο passage, όταν η καθαρότητά τους ξεπερνούσε το 98%.

Βιβλιογραφία.

Solà C, Cristófol R, Suñol C, Sanfeliu C. Primary cultures for neurotoxicity testing. In: *Cell Culture Techniques*. 2011; (Aschner, M et al., eds), pp 87-103 Totowa, NJ: Humana Press.

Πρωτόκολλο απομόνωσης μικρογλοιακών κυττάρων από C57BL/6

Καθαρές καλλιέργειες μικρογλοιακών κυττάρων απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν χρησιμοποιώντας το δημοσιευμένο πρωτόκολλο των Saura et al. (2003). Συνοπτικά, μετά την δημιουργία των μικτών γλοιακών καλλιεργειών, ανανεώνουμε το cortex medium κάθε 4 ημέρες. Μεταξύ 18^{ης} και 20^{ης} ημέρας ανανεώνουμε το cortex medium και μετά από 48 ώρες, το συλλέγουμε και το διατηρούμε στους 37°C ως conditioned medium. Ξεπλένουμε τις καλλιέργειες μία φορά με θρεπτικό χωρίς ορό και στη συνέχεια επωάζουμε με διάλυμα τρυψίνης (1:4 σε θρεπτικό χωρίς ορό) για 35–45 λεπτά στους 37°C, έως ότου αποκολληθεί πλήρως το αστροκυτταρικό στρώμα. Στη συνέχεια προσθέτουμε ίσο όγκο cortex medium και απομακρύνουμε όλο το θρεπτικό με τα αποκολλημένα κύτταρα. Προσθέτουμε το conditioned medium στις καλλιέργειες. Χρησιμοποιούμε τα μικρογλοιακά κύτταρα την επόμενη ημέρα, όταν η καθαρότητά τους υπερέβαινε το 98% (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Καλλιέργεια μικρογλοιακών κυττάρων όπως διακρίνονται σε απλό μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης.

Βιβλιογραφία

Saura J, Tusell JM, Serratos J. High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinization. *GLIA*. 2003;44:183–9.

Στοχεύοντας την βελτιστοποίηση των κυτταρικών και ζωικών μοντέλων για τον έλεγχο νέων θεραπευτικών παρεμβάσεων, αλλά και την έρευνα νέων βιοδεικτών, εστιάσαμε στον κοινό παθολογικό μηχανισμό της νευροφλεγμονής που απαντάται και στις δύο νευροεκφυλιστικές νόσους, Αλτσχάιμερ και Πάρκινσον. Πλήθος σημαντικών πρόσφατων μελετών ενοχοποιούν την νευροφλεγμονή όχι μόνο στην συμμετοχή της στην παθολογική εξέλιξη των νευροεκφυλιστικών νόσων, αλλά πιθανά και ως γενεσιουργό αιτία των νόσων αυτών. Στα πλαίσια αυτά χρησιμοποιήσαμε τους δύο βασικούς τύπους κυττάρων που διαμεσολαβούν την νευροφλεγμονή στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα, τα μικρογλοιακά κύτταρα και τα αστροκύτταρα, προερχόμενα τόσο από ζωικά μοντέλα όσο κι από ανθρώπινα βλαστοκύτταρα, σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που αναπτύχθηκαν στην πρώτη αλλά και στην δεύτερη φάση του έργου. Στα ανοσολογικά αυτά μοντέλα ελέγξαμε την φαρμακολογική δράση της νευροτροφίνης BDNF αλλά και γνωστών ανοσορρυθμιστικών μορίων όπως το γλυκοκορτικοειδές υδροκορτιζόλη.

Μελέτη του BDNF σε κατάσταση νευροφλεγμονής στη νόσο Αλτσχάιμερ

Τα μικρογλοιακά κύτταρα και τα αστροκύτταρα είναι οι κύριοι πληθυσμοί στο ΚΝΣ που είναι υπεύθυνοι για την διατήρηση της ομοιόστασης, τη ρύθμιση της συναπτικής δραστηριότητας και του συντονισμού των ανοσολογικών αποκρίσεων. Κατά τη διάρκεια της νευροφλεγμονής, και οι

δύο τύποι κυττάρων μεταβαίνουν από «ηρεμιστικές/ομοιοστατικές» καταστάσεις σε αντιδραστικές μορφές, υιοθετώντας τροποποιημένη μορφολογία, αλλάζοντας τα προφίλ έκκρισης κυτταροκινών και ρυθμίζοντας αμοιβαία τη λειτουργία τους με τρόπο που εξαρτάται από το εκάστοτε πλαίσιο. Στοχεύοντας την μελέτη και την περαιτέρω κατανόηση του ρόλου της νευροτροφίνης BDNF στη νευροφλεγμονή στη νόσο Αλτςχάιμερ, προχωρήσαμε στη μελέτη των δυο κυτταρικών πληθυσμών με την χρήση ζωικών πρωτογενών καλλιέργειών, αστροκυττάρων και μικρογλοίας. Για τις *in vitro* καλλιέργειες, αρχικά πραγματοποιήσαμε έλεγχο της φλεγμονώδους διέγερσης με τη χρήση λιποπολυσακχαρίδης (LPS), διεγείροντας τους δύο κυτταρικούς πληθυσμούς σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και σε διαφορετικά χρονικά σημεία, προκειμένου να αξιολογηθεί η απόκρισή τους και η κυτταροτοξικότητα. Αφού καταλήξαμε στην βέλτιστη συνθήκη διέγερσης με LPS, διερευνήσαμε την απόκριση των γλοιακών κυττάρων με αναστολή των υποδοχέων p75NTR και TrkB. Ακολουθώντας το ίδιο πλαίσιο, μελετήσαμε την απόκριση κυτοκινών των γλοιακών κυττάρων σε ερεθίσματα με β-αμυλοειδές για 48 - ώρες, της πρωτεΐνης που σχετίζεται με την νόσο Αλτςχάιμερ. Τέλος, διενεργούμε πειράματα με τον συνδυασμό όλων των ερεθισμάτων και με την προσθήκη BDNF, ώστε να αναλύσουμε την έκφραση των γονιδίων και πρωτεϊνών για κυτοκίνες, BDNF, TrkB, p75NTR, φωσφορυλιωμένα σηματοδοτικά μόρια, να αξιολογήσουμε μορφολογικά χαρακτηριστικά και να μελετήσουμε σηματοδοτικά μονοπάτια.

Χρονοφαρμακολογική μελέτη της επίδρασης υδροκορτιζόλης σε ανθρώπινα αστροκύτταρα.

Για τη μελέτη της επίδρασης της υπερκείμενης χρονικής οργάνωσης του γλυκοκορτικοειδούς υδροκορτιζόλη σε αστροκύτταρα προερχόμενα από hiPSC, η υδροκορτιζόλη χορηγήθηκε μέσω μικρορευστομηχανικής πλατφόρμας (microfluidic device) η οποία αναπτύχθηκε στο εργαστήριο μας με την χρήση ειδικών αισθητήρων ώστε να επιτυγχάνεται ο ακριβής έλεγχος χορήγησης φαρμάκων με την επιθυμητή χρονική σειρά και δοσολογία, μιμούμενοι την πραγματική χορήγηση φαρμάκων στον ανθρώπινο οργανισμό ανάλογα με τις φαρμακολογικές ιδιότητες κάθε φαρμάκου (φαρμακοκινητικό και φαρμακοδυναμικό προφίλ). Στην συγκεκριμένη μελέτη, ελέγχθηκε η δράση ενός γνωστού γλυκοκορτικοειδούς με αντιφλεγμονώδεις δράσεις, της υδροκορτιζόλης, και μάλιστα μιμηθήκαμε την πραγματική χρονική μεταβολή των επιπέδων του ενδογενούς γλυκοκορτικοειδούς. Έτσι, αναπτύχθηκαν δύο διακριτά ουλτράδια προφίλ, τα οποία εξασφάλιζαν ίση συνολική έκθεση σε υδροκορτιζόλη εντός 24 ωρών σε ανθρώπινα αστροκύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε ειδικό chip της μικροφλουϊδικής συσκευής. Το φυσιολογικό ουλτράδιο προφίλ σχεδιάστηκε ώστε να προσομοιώνει τη φυσιολογική παλμική έκκριση των γλυκοκορτικοειδών και περιλάμβανε οκτώ παλμούς διάρκειας 3 ωρών, με μέγιστη συγκέντρωση υδροκορτιζόλης 150 ng/ml, χρησιμοποιώντας δύο μέσα καλλιέργειας (0 και 150 ng/ml) που διοχετεύονταν ταυτόχρονα σε δύο κανάλια με ημιτονοειδή ροή αντίθετης φάσης. Το σταθερό προφίλ συνίστατο σε συνεχή χορήγηση υδροκορτιζόλης σε συγκέντρωση 75 ng/ml, βαθμονομημένη ώστε να αντιστοιχεί ακριβώς στη συνολική ημερήσια δόση του παλμικού προφίλ, με σταθερή ροή και στα δύο κανάλια. Η συγκριτική αυτή προσέγγιση επέτρεψε την απομόνωση της επίδρασης της παλμικότητας καθαυτής, ανεξάρτητα από τη συνολική ορμονική έκθεση, παρέχοντας ένα ελεγχόμενο πειραματικό πλαίσιο για τη διερεύνηση της λειτουργικής απόκρισης των ανθρώπινων αστροκυττάρων. Η συγκεκριμένη μελέτη κατέδειξε την σημασία της διατήρησης της ουλτράδιας ρυθμικότητας των γλυκοκορτικοειδών για την εμφάνιση της αντιφλεγμονώδους δράσης τους και πως αυτή μπορεί να μεταβάλλεται σε νευροεκφυλιστικά νοσήματα, οδώνοντας την παθολογία της

νόσου. Στην συγκεκριμένη μελέτη, απομονώθηκαν τόσο κυτταρικά εκχυλίσματα αστροκυττάρων στις διαφορετικές πειραματικές συνθήκες, όσο και το συνολικό υλικό των εκκρίσεων, και μελετάται σε συνεργασία με το Ινστιτούτο Φλέμινγκ η πλήρης πρωτεομική τους σύσταση, ώστε να αναδειχθούν νέοι βιοδείκτες νευροφλεγμονής. Η μελέτη αυτή επίσης βρίσκεται στο στάδιο της συγγραφής για δημοσίευση από τον Δρ Αλέξανδρο Τσιμπόλη, ο οποίος επίσης ολοκλήρωσε την διατριβή του πριν λίγους μήνες.

Βιβλιογραφία.

Zhang, Q., Yang, G., Luo, Y., Jiang, L., Chi, H., & Tian, G. (2024). Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Insights from peripheral immune cells. *Immunity & Ageing*, 21(1), 38. <https://doi.org/10.1186/s12979-024-00445-0>

Heneka, M. T., van der Flier, W. M., Jessen, F., Hoozemans, J., Thal, D. R., Boche, D., Brosseron, F., Teunissen, C., Zetterberg, H., Jacobs, A. H., Edison, P., Ramirez, A., Cruchaga, C., Lambert, J.-C., Laza, A. R., Sanchez-Mut, J. V., Fischer, A., Castro-Gomez, S., Stein, T. D., ... Riechers, S.-P. (2025). Neuroinflammation in Alzheimer disease. *Nature Reviews Immunology*, 25(5), 321–352. <https://doi.org/10.1038/s41577-024-01104-7>

Numakawa, T., & Kajihara, R. (2025). The Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor as an Essential Mediator in Neuronal Functions and the Therapeutic Potential of Its Mimetics for Neuroprotection in Neurologic and Psychiatric Disorders. *Molecules*, 30(4), 848. <https://doi.org/10.3390/molecules30040848>

Harun, Z. Z., Abdul Azhar, A., Kim, Y.-J., Ibrahim, F. W., Ng, M.-H., Tan, J.-K., & Lokanathan, Y. (2025). Modulation of BDNF/TrkB Signalling Pathway in Alzheimer's Disease: Mechanistic Insights and the Role of Stem Cell Therapy. *Biomedicines*, 13(12), 2931. <https://doi.org/10.3390/biomedicines13122931>

Jia, D., Wang, F., Bai, Z., & Chen, X. (2023). BDNF-TrkB/proBDNF-p75NTR pathway regulation by lipid emulsion rescues bupivacaine-induced central neurotoxicity in rats. *Scientific Reports*, 13(1), 18364. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-45572-8>

Xiong, J., Zhou, L., Yang, M., Lim, Y., Zhu, Y. -h., Fu, D. -l., Li, Z. -w., Zhong, J. -h., Xiao, Z. -c., & Zhou, X.-F. (2013). ProBDNF and its receptors are upregulated in glioma and inhibit the growth of glioma cells in vitro. *Neuro-Oncology*, 15(8), 990–1007. <https://doi.org/10.1093/neuonc/not039>

Ghimire, A., Rehman, S. A., Subhani, A., Khan, M. A., Rahman, Z., Iqbal, M. K., & Iqbal, A. (2025). Mechanism of microglia-mediated neuroinflammation, associated cognitive dysfunction, and therapeutic updates in Alzheimer's disease. *hLife*, 3(2), 64–81. <https://doi.org/10.1016/j.hlife.2024.11.006>