

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ**



***Investigarea unor molecule cu implicații potențiale
în patologia neurodegenerativă***

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. HINESCU E. MIHAIL

Student-doctorand:

DOBRI ANA-MARIA

2023

Cuprins

Introducere	6
I. Partea generală	10
1. Implicarea CD 36 în patologia sistemului nervos	10
1.1. CD36 –structura și funcții	10
1.1.1. CD36 ca și ”scavenger receptor” în imunitatea înăscută.....	13
1.1.2. CD36 și eliminarea oxLDL	13
1.1.3. CD36 și rolul în metabolismul lipidic și energetic	15
1.1.4. CD36 și rolul în angiogeneză	15
1.2. Rolul CD36 în patologia sistemului nervos	17
1.2.1. CD36 și patologia neurovasculară.....	17
1.2.2. CD36 și boala Parkinson	19
1.2.3. CD36 și epilepsia	20
1.2.4. CD36 și boala prionică	20
1.2.5. CD36 și scleroza multiplă	20
1.2.6. CD 36 și patologia tumorală cerebrală (gliom, glioblastom)	20
1.2.7. CD36 și regenerarea postraumatică a nervilor periferici.....	22
1.2.8. CD36 și patologia musculară	22
2. CD 36 în demența Alzheimer	23
2.1. Mecanisme patogenice – generalități	23
2.2. Rolul microgliei în neurodegenerare	28
2.2.1. Microglia, CD36 și beta-amiloidul.....	29
2.2.2. Microglia, CD36 și oxLDL	31
2.3. Rolul astrocitului în neurodegenerare	31
2.4. Polimorfismul genei CD36 în demența Alzheimer	33
2.5. Alte gene care modulează neuroinflamația în patologia Alzheimer.....	34
2.5. Efectele modulării CD36 și NRF2 asupra cogniției și comportamentului	35
3. Rolul acizilor grași în neuroinflamație și neurodegenerare.....	37
3.1. Acizii grași – generalități	37
3.2. Acizii grași și rolul lor în patogeneza bolii Alzheimer.....	38
3.3. Acizii grași și rolul lor în procesul neuroinflamator	40
3.3.1. Acidul oleic și rolul său în neuroinflamație	42
3.3.2. Acidul palmitic și rolul său în neuroinflamație	42

II. Contribuții personale	44
4. Ipoteza de lucru și obiectivele generale	44
4.1. Premise	44
4.2. Ipoteze	45
4.3. Obiective de etapă	48
5. Metodologia generală a cercetării	50
5.1. Culturi celulare umane	50
5.2. Modele murine	52
5.2.1. Șoarece CD36 knockout.....	52
5.2.2. Șoarece NRF2 knockout.....	53
6. STUDIUL 1- Evaluarea efectului CD36 asupra răspunsului inflamator al astrocitelor.....	55
6.1. Ipoteza de lucru și obiectivele generale	55
6.2. Materiale și metode	56
6.3. Rezultate.....	63
6.3.1. Astrocitele sunt capabile să asimileze atât acizi grași saturați, cât și nesaturați. Captarea acizilor grași nu este afectată de pre-tratamentul cu SSO	63
6.3.2. În prezența acidului oleic, tratamentul pe termen scurt cu SSO nu afectează viabilitatea astrocitelor pe termen lung, efect ce a fost evaluat prin video-microscopie	65
6.3.3. Astrocitele sunt capabile să producă citokine pro-inflamatorii în cultura celulară, iar sinteza acestora este redusă de tratamentul cu SSO	67
6.3.4. Expresia cerebrală a APP în creierul șoarecilor CD36-/- și NRF2-/-.....	71
6.4. Discuții	72
6.5. Concluzii de etapă	76
7. STUDIUL 2 - Evaluarea impactului CD36 asupra funcției cognitive	77
7.1. Ipoteza de lucru și obiectivele generale	77
7.2. Materiale și metodă	78
7.3. Rezultate.....	86
7.3.1. Rezultatele testului în câmp deschis.....	86
7.3.2. Rezultatele testului de recunoaștere a obiectelor noi	88
7.3.3. Rezultatele testului cu labirintul radial cu 8 brațe	88
7.4. Discuții	96
7.5. Concluzii de etapă	97
8. Concluzii generale și perspective de viitor.....	99
Bibliografie	101
Anexe	134

I. PARTEA GENERALĂ

Stadiul actual al cunoașterii

Boala Alzheimer este o afecțiune neurodegenerativă, fiind în principal caracterizată de evoluția progresivă a tulburărilor cognitive/mnezice și a unui declin al capacității de a desfășura activitățile zilnice [1]. Boala Alzheimer are un impact semnificativ la nivel mondial, prevalența bolii Alzheimer crescând odată cu vârsta, majoritatea cazurilor fiind diagnosticate la persoanele cu vârsta de peste 65 de ani [2],[3]. Povara pe care o reprezintă boala Alzheimer este semnificativă și complexă. Aceasta afectează nu numai sănătatea și bunăstarea persoanelor diagnosticate, ci și o povară economică substanțială pentru sistemele de sănătate, familie și societate [3]. Privind imaginea de ansamblu din jurul acestei patologii, eforturile de cercetare s-au concentrat pe înțelegerea mecanismelor patogenice, în vederea dezvoltării unor tratamente eficiente dar și pe identificarea unor modalități de diagnostic precoce (în stadiu preclinic) cu scopul de a preveni sau de a întârzia apariția simptomatologiei specifice. Depistarea și intervenția timpurie sunt esențiale pentru îmbunătățirea prognosticului și a calității vieții persoanelor cu boala Alzheimer.

De-a lungul timpului, mecanismele patogenice ale bolii Alzheimer au fost extensiv cercetate fiind formulate multiple ipoteze, cele mai cunoscute fiind ipoteza amiloidului și tau [4],[5]. Recent, a fost adusă în atenție ipoteza neuroinflamației ca potențial mecanism implicat în inițierea și progresia bolii Alzheimer [4].

Ipoteza neuroinflamației în boala Alzheimer [6] include câteva aspecte cheie enumerate mai jos:

- Microglia se activează în prezența beta-amiloidului și generează eliberarea de molecule pro-inflamatorii (citokine, chemokine) și menține astfel stresul oxidativ [7], [8].
- Eliberarea cronică de molecule pro-inflamatorii la nivel cerebral produce deteriorarea neuronilor și secundar disfuncție sinaptică, elemente esențiale pentru menținerea unei funcții cognitive normale [9], [10].
- Bariera hemato-encefalică în boala Alzheimer este afectată. Astfel fiind permis accesul mai facil al celulelor imune și moleculelor inflamatorii la nivelul creierului, potențând efectele locale menționate mai sus [11].

Cercetările în domeniul neuroinflamației sugerează un nou posibil jucător important în procesele legate de absorbția și acumularea de beta-amiloid, inițierea și menținerea neuroinflamației și disfuncție neurovasculară, acesta fiind receptorul scavenger CD36 [12].

CD36, este o proteină transmembranară care joacă un rol fundamental în absorbția celulelor a acizilor grași cu lanț lung și a lipoproteinelor oxidate cu densitate scăzută (oxLDL), precum și în legarea fibrilelor hidrofoabe amiloide găsite în creierul afectat de boala Alzheimer [11][13]. De asemenea, s-a observat că CD36 influențează profilul inflamator al microgliei umane și de șoarece, sugerând o posibilă interacțiune cu cascada neuroinflamației. CD36 a fost corelat cu deteriorarea cognitivă la șoarecii în vârstă, unde s-a demonstrat că inflamația periferică poate induce o neuroinflamație legată de vârstă și poate crește nivelurile de CD36 în hipocampusul șoarecilor [14]. De asemenea, s-a constatat că CD36 promovează depunerea de amiloid în vasele de sânge, conducând la leziuni vasculare cerebrale, disfuncție neurovasculară și deficite cognitive [11].

Studiile patogenezei bolii Alzheimer, au arătat în mod repetat faptul că microgliile activate au un rol principal în inițierea căii pro-inflamatorii cât și importanța receptorului CD36 în activarea microgliilor. Însă rolul astrocitului în inițierea unui răspuns pro-inflamator în contextul acumulării beta-amiloidului via CD36 nu a fost explorat. Deși astrocitele nu exprimă CD36 în condiții bazale, s-a observat că acestea pot produce citokine ca răspuns la tratamentele cu acizi grași. Câteva studii anterioare au punctat rolul receptorului CD36 în procesele de autofagie și fagocitoză ale microgliei și astrocitului, sugerând posibila implicare a sa în eliminarea beta-amiloidului în boala Alzheimer [15].

De asemenea, este cunoscut faptul că acizii grași cu lanț lung, (saturați și nesaturați) interacționează cu numeroși factori de transcriere, inclusiv cu receptorii de activare a proliferării peroxizomilor (PPAR) și NF- κ B, declanșând reacții inflamatorii [16] [17] [18].

Totuși, s-a observat că în concentrații crescute acizii grași saturați, în special acidul palmitic, determină producția de citokine pro-inflamatorii în culturile de celule astrocitare, într-o manieră dependentă de doză [19] [20] [21]. De asemenea, în unele studii este arătat că acidul palmitic prezintă un rol în progresia bolii, deoarece promovează inflamația și neurodegenerarea secundară [22]. În ceea ce privește efectele acidului oleic, studiile nu au înregistrat efect pro-inflamator dependent de doză. [23].

Ce-a de-a doua parte experimentală a urmărit efectele cognitive în relație cu modularea receptorului CD36. Există studii care au arătat că activarea CD36 a avut efecte pozitive

asupra cogniției, în teste efectuate pe model murin cu AD [24],[25]. În schimb, s-a observat că deficiența CD36 reduce inflamația indusă de macrofage [26]. Prin urmare, CD36 a fost analizat ca o posibilă țintă terapeutică în patologia Alzheimer [27]. Cu toate că a fost vizat în câteva studii, nu a fost raportată o concluzie certă legată de rolul pe care CD36 îl are în modularea cognitivă la șoareci. Conform datelor publicate într-un singur experiment, s-a observat că șoarecii CD36 KO prezintă un comportament de tip anxios [28]. Studiul literaturii privind comportamentul cognitiv la șoarecii CD36KO a identificat puține studii iar majoritatea s-au focusat pe testarea memoriei de scurtă durată.

Înțelegerea conexiunii complexe dintre acizii grași, neuroinflamație, neurodegenerare și rolul proteinelor CD36 este esențială pentru dezvoltarea unor strategii terapeutice noi în tratarea tulburărilor neurodegenerative. Prin dezvăluirea mecanismelor subiacente proceselor de neuroinflamație reglementate de CD36, perspectivele de viitor țintesc noi molecule terapeutice, cu scopul de a reduce nivelul de neuroinflamație și a menține integritatea neuronală. Această lucrare de doctorat își propune să aducă o contribuție semnificativă în această zonă emergentă a studiilor privind neurodegenerarea, prin examinarea detaliată a rolului anumitor acizi grași în procesele inflamatorii cu originea la nivelul astrocitelor și prin analizarea consecințelor neurocognitive la șoarecii cu deficiența proteinei CD36 (CD36 Knockout), conform detaliilor prezentate în secțiunea dedicată contribuțiilor originale.

Activitatea de cercetare a fost desfășurată în cadrul Institutul Național De Cercetare-Dezvoltare În Domeniul Patologiei și Științelor Biomedicale „Victor Babeș” București, Laboratorul de Biochimie- Proteomică. De asemenea, activitatea de cercetare și publicare a rezultatelor obținute a fost în parte susținută de proiectul Net4SCIENCE: Rețea de cercetare doctorală și postdoctorală aplicativă în domeniile de specializare inteligentă Sănătate și Bioeconomie Contract de finanțare POCU/993/6/13/154722, Programul 1: Îmbunătățirea Sistemului Național de Cercetare-Dezvoltare, Subprogramul 1.2: Excelență instituțională - Finanțarea proiectelor de excelență în CDI, Contract nr. 7PFE/16.10.2018, și Programul de bază PN 1N/2019_19.29.01.02, PN 19.29.01.04 (Program de bază), COP A 1.2.3., grant ID: P_40_197/2016, Programul 1, Îmbunătățirea Sistemului Național de Cercetare-Dezvoltare, Subprogramul 1.2, Excelență Instituțională, Finanțarea proiectelor de excelență în CDI, Contract nr. 31PFE/30.12.2021

II. CONTRIBUȚII PERSONALE

Ipoteze de lucru

La baza tezei de doctorat au stat următoarele ipoteze:

1) Receptorul membramar CD36 participă la inducerea neuroinflamației prin mecanisme dependente de astrocite.

2) Acizii grași prezintă un rol important în modularea neuroinflamației în boala Alzheimer, fiind vizat îndeosebi rolul CD36 în medierea acestor efecte.

3) Receptorul CD36 este implicat în modularea proceselor cognitiv-comportamentale în patologia Alzheimer.

Obiectivele generale ale experimentelor

Obiectivul principal al tezei mele de doctorat a fost investigarea implicării receptorului scavanger CD36 în procesele neuroinflamatorii asociate neurodegenerării cât și rolul acestuia în modularea proceselor neurocognitive.

Obiectivele de etapă au fost următoarele:

1) Evaluarea captării acizilor grași (acid oleic și acid palmitic) la nivelul astrocitelor umane (NHA).

2) Evaluarea efectului anti-inflamator al acizilor grași asupra culturilor celulare (astrocite umane).

3) Evaluarea comparativă a distribuției cerebrale a APP în două modele murine de neuroinflamație diferite (NRF2 ko și CD36 ko).

4) Alegerea a două modele *in vivo* pentru studiul efectelor neuroinflamatorii asupra cogniției și comportamentului.

5) Evaluarea efectului neuroinflamator asupra capacității de învățare, utilizând două modele de șoareci transgenici (CD36 ko și NRF2 ko).

6) Evaluarea efectului neuroinflamator asupra modulării comportamentului anxios, utilizând două modele de șoareci transgenici (CD36 ko și NRF2 ko).

STUDIUL 1 – Evaluarea efectului CD36 asupra răspunsului inflamator al astrocitelor

Materiale și metodă

Primul experiment a avut ca obiectiv evaluarea acumulării acizilor grași (acid oleic și acid palmitic) la nivelul culturilor astrocitare umane (NHA). Prin urmare, au fost folosite culturi celulare de tip glial (astrocite umane normale, Lonza) crescute în mediu de cultură de tip Mediu bazal ABM (CC-3187) suplimentat cu AGM SingleQuots™ Supplements (CC-4123) și menținute într-un incubator de culturi celulare (5% CO₂, 37 °C). Din acestea au fost însămânțate în plăci cu câte 6 godeuri câte 5 000 de celule/cm² timp de 1 săptămână, cu schimbarea periodică a mediului.

Metodologia experimentală a presupus tratamentul culturilor de astrocite cu acizi grași nesaturați, fiind ales în acest scop acidul oleic (OA) cât și cu acizi grași saturați precum acidul palmitic (PA). În urma analizei literaturii de specialitate și efectuării unor probe experimentale, s-a optat în final pentru tratarea culturilor celulare cu OA în concentrație de 40 μM și PA în concentrație de 20 μM. Am dorit să evaluez și efectul SSO în culturile studiate, optând astfel pentru un pre-tratament cu SSO 20 μM timp de 10 minute, ulterior continuându-se cu protocolul de tratare cu acizii grași menționat anterior. SSO este cunoscut ca un inhibitor al absorbției de acizi grași cu rol în reducerea inflamației.

Probele control ale experimentului au fost incubate cu vehicul (mediu suplimentat cu 0,07% etanol).

Menținerea culturilor celulare a presupus pasajul acestora, la fiecare 4 zile, conform protocoalelor menționate în extenso în teza de doctorat.

În vederea cuantificării efectului inflamator al acizilor grași asupra culturilor astrocitare am folosit următoarele materiale și metode.

Luminex

Din culturile celulare cu astrocite tratate cu acid oleic, acid palmitic și pretratate cu SSO s-au recoltat câte 100 μL supernatant în timpul 0 (înaintea adăugării acizilor grași), urmând a fi recoltat supernatantul la 1 ora, 2 ore, 4 ore, 6 ore, 24 de ore și 7 zile.

Din supernatantul recoltat, prin metoda Luminex au fost detectați și cuantificați markeri inflamatori (MIP-1a, IL-8, IL-10, IL-1b, IL4, IL-6, TNFa) folosind kit-ul Multiplex Magnetic Luminex Assay Human Premixed Multi-Analyte (R&D Systems, Minneapolis, MN, SUA și platforma Luminex®200TM (Luminex Corp, Austin, TX 78727, SUA) pentru achiziția datelor experimentale. Pentru analiza datelor am folosit software-ului xPONENT 4.2; curbele de calibrare au fost generate cu o ajustare logistică cu 5 parametri.

Videomicroscopie BioStation

Pentru monitorizarea culturilor astrocitare tratate cu acizi grași, în timp real, am utilizat sistemul BioStation IM (Nikon, Japonia) și software-ul NikonNIS Elements pentru achiziția imaginilor în timp real.

Cu acest scop, am numărat și împărțit 10 000 de celule în 4 flask-uri cu 4 camere (80416, Ibidi) și au fost lăsate la incubat peste noapte. Acestea au fost tratate în prealabil cu două concentrații diferite de SSO (20 și 10 μM) pentru o durată de 10 minute. După tratament, mediul cu SSO a fost înlocuit cu vehicul (mediu) sau OA 40 μM . Pentru a obține imaginile necesare a fost utilizat Nikon Biostation setat pentru achiziție la fiecare 15 minute, iar zona nuda a fost evaluată cu software-ul NiS Elements BR.

ELISA

O altă etapă experimentală a avut în vedere măsurarea IL-6 folosind în acest scop testele cantitative comerciale Legend Max (BioLegend, San Diego, CA, SUA). Experimentul a constat în tratarea culturilor NHA cu 0,2 μM beta-amiloid 1-42 și pre-incubate timp de 48 h la 37 °C pentru constituirea fibrilelor. A fost prelevat supernatant celular la 4 și 24 de ore. Din supernatantul recoltat a fost determinată cantitativ IL-6 cu scopul de a urmări capacitatea astrocitelor de a produce un răspuns pro-inflamator. În plăci am adăugat supernatant de cultură celulară (50 μL), recoltat din probe tratate la timpi diferiți și am incubat la temperatura camerei, timp de 2 h, cu agitare la 200 rpm. Ulterior am urmat protocolul ELISA în conformitate cu specificațiile producătorului.

Colorație OILRED

Pentru a pune în evidență picăturile lipidice de la nivelul astrcitelor cultivate și tratate cu acizi grași am folosit tehnica de colorare Oil Red. După cum este expus în extenso în teză aceasta tehnică implică colorarea structurilor bogate în lipide cu colorantul Oil Red rezultând o colorație roșie.

Analiza statistică

Analiza statistică a datelor a fost efectuată folosind GraphPad v7 (ANOVA cu o singură cale, comparație multiplă Dunnett) datele fiind comparate cu controlul. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

Rezultate

1. Astrocitele au capacitatea de asimilare a acizilor grași saturați, cât și nesaturați, Pre-tratamentul cu SSO nu influențează acest efect.

Cunoscând că SSO este un blocant al absorbției acizilor grași, am dorit să testez dacă SSO ar afecta astrocitele umane în cultura celulară astrocitară tratată cu SSO și acizi grași (oleic și palmitic). Observația extrasă este că în timp ce SSO afectează proliferarea celulară, prezența acizilor grași saturați, cât și cei nesaturați împiedică acest efect.

2. În prezența acidului oleic, tratamentul pe termen scurt cu SSO nu afectează viabilitatea astrocitelor pe termen lung.

Observația extrasă în urma experimentului este că mobilitatea sau viabilitatea astrocitelor nu a variat semnificativ între condițiile testate (culturi NHA timp de 10 minute-cu SSO, în două concentrații diferite (10 și 20 μM) și ulterior substituirea mediului cu introducerea OA în concentrație de 40 μM , pentru toate situațiile testate). Rezultatele obținute susțin că o concentrația mai mică de SSO determină o acoperire mai mare a suprafeței. Acest efect poate fi justificat de un număr ușor mai mare de diviziuni.

Rezultatele experimentale arată o progresie a proliferării celulare semnificativă statistic pentru situațiile testate la concentrația de SSO de 5 μM ($p < 0,1$) respectiv de 10 μM ($p < 0,001$).

3. Astrocitele sunt capabile să producă citokine pro-inflamatorii în cultura celulară, iar sinteza acestora este redusă de tratamentul cu SSO

Conform premisei de la care am pornit, culturile astrocitare tratate cu beta-amiloid 1-42 au indus formarea IL-6 la 24 h, o valoare semnificativ statistic mai mare față de control ($p < 0,01$). Acest efect a fost diminuat de tratamentul cu SSO.

Următorul pas experimental a vizat investigarea producției altor citokine pro-inflamatorii (IL-1b, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNFa, MIP1a) în supernatantul recoltat, cu atât

mai mult fiind motivată de efectul observat al SSO, de diminuare a producției de citokine în toate condițiile testate. În ciuda utilizării unui panel extins de markeri inflamatori, IL-6 și IL-8 au printre singurele citokine detectate în supernatantul de cultură a celulelor NHA. Este important de menționat ca secreția acestor citokine a urmat un pattern diferit de secreție raportat la timp.

STUDIUL 2- Evaluarea impactului CD36 asupra funcției cognitive

Materiale și metodă

Cu scopul testării comportamentale și cognitive am folosit două tulpini transgenice de șoareci CD36^{-/-} (B6.129S1-Cd36^{tm1Mfe/J}) și NRF2^{-/-} la vârste diferite. Șoarecii C57BL/6 de genotipuri *Nrf2*^{-/-} și *Nrf2*^{+/+} au fost create de la animale provenite din laboratorul Prof. A. Cuadrado, Universidad Autonoma de Madrid iar șoarecii CD36^{-/-} au fost achiziționați de la Jackson Laboratoires US.

Șoarecii de vârstă adultă au fost testați folosind testul în câmp deschis și testul de recunoaștere a obiectelor noi. În ceea ce privește loturile de șoarecii vârstnici, acestea au fost testate folosind testul labirintului radial cu 8 brațe pentru a analiza comportamentul anxios și disfuncția memoriei. Șoarecii au fost găzduiți în mod diferențiat de gen și model transgenic, în cuști simple în cadrul unui ciclu normal de 12 h lumină/întuneric, temperatură și umiditate constante, cu acces *ad libitum* la hrană și apă.

Studiile au fost efectuate în conformitate cu liniile directoare ale Directivei europene 2010/63/UE și aprobate de Autoritatea Națională pentru Cercetare Veterinară din România, autorizația nr. 588/13.01.2022 și, respectiv, nr. 385/09.02.2018.

Protocolul testării în câmp deschis (Open Field)

Protocolul experimental a constat în acclimatizarea acclimatizate tuturor animalelor timp de 30 de minute în sala de testare în cuștile lor pentru a minimiza stresul. Fiecare animal a fost plasat în mijlocul arenei și i s-a permis să exploreze timp de 5 minute. Folosind software-ul de urmărire video Smart 3.0 am înregistrat traiectoria în zona centrală față de periferia zâmpului de testare.

Protocolul testului de recunoaștere a obiectelor noi (NOR)

Protocolul pentru testarea obiectelor noi s-a desfășurat pe parcursul a 3 zile consecutive:

- în prima zi, fiecare animal a fost plasat în centrul arenei goale și i s-a permis să exploreze timp de 5 minute.

- în cea de-a doua zi, șoarecii au fost plasați timp de 5 minute în arenă și li s-a oferit să exploreze 2 obiecte similare plasate în colțuri diametral opuse;
- în a 3-a zi, unul dintre obiecte a fost schimbat cu unul nou (formă și culoare diferită) și fiecărui șoarece i s-a permis să exploreze timp de 5 minute atât obiectul vechi, cât și cel nou.

Menționez că acest experiment nu a presupus privarea de hrană a animalelor. Comportamentul animalelor a fost testat cu ajutorul programului SMART 3.0 de urmărire video

Protocolul de testare cu labirintul radial

Experimentul cu labirintul radial a presupus trei etape:

- faza de acomodare – fiecare animal a fost plasat timp de 5 minute pe platforma centrală a labirintului, cu toate brațele închise; faza s-a derulat timp de 5 zile succesive
- faza de antrenament în două etape - în primele 7 zile, fiecare șoarece a fost plasat în platforma centrală, având acces liber doar la 3 brațe cu momeală, timp de 5 minute. În următoarele 14 zile, șoarecii au avut acces deplin la toate cele 8 brațe, dintre care aceleași 3 au fost momite cu hrană; această fază s-a derulat pe parcursul a 21 de zile.
- faza finală de testare - a presupus ca fiecare șoarece să fie plasat pe platforma centrală cu toate brațele deschise; aceasta fază derulându-se pe parcursul a trei zile consecutive

Comportamentul animalelor a fost înregistrat cu ajutorul MazeSoft8, pentru a evalua erorile de memorie și a software-ului SMART 3.0 de urmărire video pentru analiza traseelor, a vitezei și a distanței.

Experimentul a presupus privarea de hrană pe o perioadă de 12 ore anterior testării, pentru a crește motivația și performanța.

Analiza statistică.

Baza de date a fost obținută folosind atât generarea automată a rezultatelor în programul SMART cât și utilizând baza de date Excel. Analiza statistică a fost realizată folosind următoarele soft-uri Prism7 (GraphPad Software 9.1.0) cu funcțiile OneWay

ANOVA și *testul t* Student. Datele sunt exprimate ca medie \pm SD. Grupurile au fost considerate semnificativ diferite atunci când $P < 0,05$ (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$).

Rezultate

1) Rezultatele testului în câmp deschis

Rezultatele obținute în ceea ce privește distanța totală, distanța în centru și viteza de deplasare a grupului grupul NRF2^{-/-} au fost semnificativ statistic mai mari comparativ cu grupul de control, fiind interpretate aceste rezultate ca un comportament anxios, hiperactiv al șoarecilor NRF2^{-/-}. La grupul CD36^{-/-} am obținut o distanța și un timp petrecut în centru ușor mai mari comparativ cu grupul control dar fără a atinge semnificația statistică. Viteza de deplasare și distanța totală au fost similare la testarea ambelor grupuri control și CD36^{-/-}.

2) Rezultatele testului de recunoaștere a obiectelor noi (NOR)

Testul de recunoașterea obiectelor noi evidențiază un comportament opus al celor două modele animale. În timp ce animalele NRF2^{-/-} sunt mai interesate de exploatarea obiectului nou, cele CD36^{-/-} îl evită, iar acest comportament de evitare este chiar mai accentuat decât la grupul control.

3) Rezultatele testului cu labirintul radial cu 8 brațe

Am testat și înregistrat distanța și viteza maximă parcurse în labirintul radial inițial la începutul testării (zilele 2-4) și pe termen mediu (zilele 5-14). Atât subiecții grupului CD36^{-/-} cât și cei din grupul NRF2^{-/-} au efectuat erori, toate brațele fiind vizitate înainte de expirarea perioadei de testare, totuși grupul NRF2^{-/-} a avut mai puține erori de memorie pe termen lung.

În urma analizei datelor experimentale s-a observat o oarecare protecție cognitivă (în ceea ce privește tulburările de memorie produse de îmbătrânire) la șoarecii CD36^{-/-}. Blocarea NRF2 nu a înregistrat modificări ale abilităților cognitive față de grupul de control.

În cele din urmă, am dorit să cercetăm dacă îmbătrânirea este o variabilă importantă în ceea ce privește evoluția comportamentului și a capacității de memorare pentru grupurile

knockout alese. În acest sens am analizat la șoarecii KO în vârstă distanța și viteza în deplasare, comparativ cu lotul control. Am evaluat, de asemenea, atât erorile de memorie de lucru pentru evaluarea memoriei recente, cât și erorile de memorie de referință pentru memoria pe termen lung.

Am observat o scădere a comportamentului de explorare al NRF2^{-/-} dependent de vârstă. Distanța parcursă a fost mai mică decât la WT, în timp ce viteza maximă a fost comparabilă cu cea de control, dar fără a se înregistra dificultăți ale memoriei. În ceea ce privește performanțele grupului CD36^{-/-}, nu s-au observat diferențe semnificative în comparație cu controlul. Totuși este posibil că deficiența de CD36 la animalele în vârstă oferă o anumită protecție împotriva deteriorării memoriei.

Rezultate asemănătoare ale ambelor grupuri au fost obiectivate și în ceea ce privește distanța parcursă și viteza maximă. Referitor la producerea erorilor de memorie de referință, CD36^{-/-} a avut rezultate ușor mai bune, dar fără ca diferențele să fie semnificative statistic. Nu au fost observate modificări semnificative statistic ale grupului NRF2 legate de distanța, viteza maximă sau erorile de învățare.

Concluzii si perspective de viitor

1) Astrocitele sunt capabile să capteze atât acizi grași saturați (acid palmitic), cât și nesaturați (acid oleic). Captarea acizilor grași nu este afectată de pre-tratamentul cu SSO, care inhibă specific abilitatea CD36 de a lega acești liganzi. Acest rezultat indică faptul că astrocitele se bazează și pe alți transportori membranari pentru activitatea de translocare a AG.

2) Astrocitele sunt capabile să producă citokine pro-inflamatorii în cultura celulară, iar sinteza acestora este redusă de tratamentul cu SSO

3) În cantități mici, acidul oleic are efect stimulant și determină eliberarea timpurie de IL-8.

4) APP a avut o expresie cerebrală predominant vasculară la modelul murin CD36ko

5) Eliminarea protecției împotriva stresului oxidativ prin deficiența NRF2 influențează comportamentul de tip anxietate, observat de-a lungul timpului la animalele tinere.

6) Îmbunătățirea protecției împotriva neuroinflamației prin blocarea receptorului CD36 are potențial efect favorabil, observând o oarecare protecție cognitivă (în ceea ce privește tulburările de memorie produse de îmbătrânire) la șoarecii CD36-/-.

7) Deficiența NRF2 nu a avut impact asupra abilităților cognitive.

Pe baza acestor concluzii, propun următoarele direcții de cercetare:

- aprofundarea studiului rolului astrocitelor în neuroinflamație prin generarea unei linii celulare astrocitare CD36+ (de exemplu prin transfecție sau editare genică)

- evaluarea implicațiilor disfuncției neurovasculare în amiloidogeneză prin studiul astrocitelor CD36+ și relației cu ceilalți participanți ai barierei hemato-encefalice pe organoizi cerebrali

- evaluarea mai amănunțită a angiopatiei amiloide cerebrale (AAC) la șoarecii CD36-/- și implicarea acestuia în prevenția și prognosticul hemoragiilor cerebrale secundare AAC

- continuarea studiului referitor la abilitățile cognitive ale șoarecilor bătrâni CD36-/- prin creșterea lotului testat și includerea și a unui lot de femele (având în vedere impactul binecunoscut al diferențelor hormonale)

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, Holstege H, Chételat G, Teunissen CE, et al. Alzheimer's disease. *Lancet* (London, England). 2021 Apr 24;397(10284):1577–90.
2. Chung S, Providencia R, Sofat R, Pujades-Rodriguez M, Torralbo A, Fatemifar G, et al. Incidence, morbidity, mortality and disparities in dementia: A population linked electronic health records study of 4.3 million individuals. *Alzheimer's Dement*. 2023 Jan 15;19(1):123–35.
3. 2020 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement*. 2020 Mar 10;16(3):391–460.
4. Blass JP. Alzheimer's disease and Alzheimer's dementia: distinct but overlapping entities. *Neurobiol Aging*. 23(6):1077–84.
5. Armstrong RA. Plaques and tangles and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol*. 2006;44(1):1–11.
6. Akiyama H. Inflammatory response in Alzheimer's disease. *Tohoku J Exp Med*. 1994 Nov;174(3):295–303.
7. Ho GJ, Drego R, Hakimian E, Masliah E. Mechanisms of cell signaling and inflammation in Alzheimer's disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005 Apr;4(2):247–56.
8. Fakhoury M. Microglia and Astrocytes in Alzheimer's Disease: Implications for Therapy. *Curr Neuropharmacol*. 2018;16(5):508–18.
9. Wilkinson K, El Khoury J. Microglial scavenger receptors and their roles in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis*. 2012;2012:489456.
10. Hickman SE, Allison EK, El Khoury J. Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *J Neurosci*. 2008 Aug 13;28(33):8354–60.
11. Ioghen O, Chițoiu L, Gherghiceanu M, Ceafalan LC, Hinescu ME. CD36 – A novel molecular target in the neurovascular unit. Majewska A, editor. *Eur J Neurosci*. 2021 Apr 28;53(8):2500–10.
12. Stewart CR, Stuart LM, Wilkinson K, van Gils JM, Deng J, Halle A, et al. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol*. 2010 Feb;11(2):155–61.
13. Dobri A-M, Dudău M, Enciu A-M, Hinescu ME. CD36 in Alzheimer's Disease: An Overview of Molecular Mechanisms and Therapeutic Targeting. *Neuroscience*. 2021;453:301–11.
14. Gadagkar SG, Lalancette-Hébert M, Thammisetty SS, Vexler ZS, Kriz J. CD36 neutralisation blunts TLR2-IRF7 but not IRF3 pathway in neonatal mouse brain and immature human microglia following innate immune challenge. *Sci Rep*. 2023 Feb 9;13(1):2304.

15. Ou-Yang P, Cai Z-Y, Zhang Z-H. Molecular Regulation Mechanism of Microglial Autophagy in the Pathology of Alzheimer's Disease. *Aging Dis.* 2023;
16. Jump DB. Fatty Acid Regulation of Gene Transcription. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2004 Jan 19;41(1):41–78.
17. Vargas-Bello-Pérez E, Zhao W, Bionaz M, Luo J, Looor JJ. Nutrigenomic Effect of Saturated and Unsaturated Long Chain Fatty Acids on Lipid-Related Genes in Goat Mammary Epithelial Cells: What Is the Role of PPAR γ ? *Vet Sci.* 2019 Jun 11;6(2):54.
18. Bravo-Ruiz I, Medina MÁ, Martínez-Poveda B. From Food to Genes: Transcriptional Regulation of Metabolism by Lipids and Carbohydrates. *Nutrients.* 2021 Apr 30;13(5):1513.
19. Hou J, Jeon B, Baek J, Yun Y, Kim D, Chang B, et al. High fat diet-induced brain damaging effects through autophagy-mediated senescence, inflammation and apoptosis mitigated by ginsenoside F1-enhanced mixture. *J Ginseng Res.* 2022 Jan;46(1):79–90.
20. Chen Z, Nie S-D, Qu M-L, Zhou D, Wu L-Y, Shi X-J, et al. The autophagic degradation of Cav-1 contributes to PA-induced apoptosis and inflammation of astrocytes. *Cell Death Dis.* 2018 Jul 10;9(7):771.
21. Ortiz-Rodriguez A, Acaz-Fonseca E, Boya P, Arevalo MA, Garcia-Segura LM. Lipotoxic Effects of Palmitic Acid on Astrocytes Are Associated with Autophagy Impairment. *Mol Neurobiol.* 2019 Mar 18;56(3):1665–80.
22. Fatima S, Hu X, Gong R-H, Huang C, Chen M, Wong HLX, et al. Palmitic acid is an intracellular signaling molecule involved in disease development. *Cell Mol Life Sci.* 2019 Jul 9;76(13):2547–57.
23. Gupta S, Knight AG, Gupta S, Keller JN, Bruce-Keller AJ. Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes. *J Neurochem.* 2012 Feb;no-no.
24. Yamanaka M, Ishikawa T, Griep A, Axt D, Kummer MP, Heneka MT. PPAR γ /RXR α -induced and CD36-mediated microglial amyloid- β phagocytosis results in cognitive improvement in amyloid precursor protein/presenilin 1 mice. *J Neurosci.* 2012 Nov 28;32(48):17321–31.
25. Uruno A, Matsumaru D, Ryoike R, Saito R, Kadoguchi S, Saigusa D, et al. Nrf2 Suppresses Oxidative Stress and Inflammation in App Knock-In Alzheimer's Disease Model Mice. *Mol Cell Biol.* 2020 Feb;40(6):e00467-19.
26. Kuchibhotla S, Vanegas D, Kennedy DJ, Guy E, Nimako G, Morton RE, et al. Absence of CD36 protects against atherosclerosis in ApoE knock-out mice with no additional protection provided by absence of scavenger receptor A I/II. *Cardiovasc Res.* 2008 Apr;78(1):185–96.
27. Doens D, Valiente PA, Mfuh AM, A XTV, Tristan A, Carreno L, et al. Identification of Inhibitors of CD36-Amyloid Beta Binding as Potential Agents for Alzheimer's Disease. *ACS Chem Neurosci.* 2017;8(6):1232–41.
28. Zhang S, Wang W, Li J, Cheng K, Zhou J, Zhu D, et al. Behavioral characterization of CD36 knockout mice with SHIRPA primary screen. *Behav Brain Res.* 2016 Feb;299:90–6.

Lista lucrărilor științifice publicate

Articole autor principal

CD36 in Alzheimer's Disease: An Overview of Molecular Mechanisms and Therapeutic Targeting, autori: **Ana-Maria Dobri**, Maria Dudău, Ana-Maria Enciu, Mihail Eugen Hinescu. Neuroscience. (ISI, IF 3.708), 2021 Jan 15;453:301-311. doi: 10.1016/j.neuroscience.2020.11.003. Epub 2020 Nov 17;

Link: [https://www.ibroneuroscience.org/article/S0306-4522\(20\)30719-3/fulltext](https://www.ibroneuroscience.org/article/S0306-4522(20)30719-3/fulltext)

Low-Concentrations of Fatty Acids Induce an Early Increase in IL-8 Levels in Normal Human Astrocytes, autori: **Ana-Maria Dobri**, Elena Codrici, Ionela-Daniela Popescu, Lucian Albulescu, Emanuel Tudor Fertig, Ana-Maria Enciu, Cristiana Tanase, Mihail E Hinescu, Metabolites (ISI, IF 5.581), 2022 Apr 6;12(4):329, doi: 10.3390/metabo12040329;

Link: <https://www.mdpi.com/2218-1989/12/4/329>

Behaviour testing in two different knockout mouse strains related to chronic inflammation and oxidative stress, autori: **Ana Maria Dobri**, Gheorghita Isvoranu, Ana-Maria Enciu, Mihail Eugen Hinescu, Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), (ISI, IF 1.77), 2023 Mar 31;69(3):113-117. doi: 10.14715/cmb/2023.69.3.15;

Link: <https://cellmolbiol.org/index.php/CMB/article/view/4710>

Articol co-autor

Fatty Acids, CD36, Thrombospondin-1, and CD47 in Glioblastoma: Together and/or Separately?, autori: Cristiana Tanase, Ana Maria Enciu, Elena Codrici, Ionela Daniela Popescu, Maria Dudau, **Ana Maria Dobri**, Sevinci Pop, Simona Mihai, Ancuța-Augustina Gheorghişan-Gălăţeanu, Mihail Eugen Hinescu, Int J Mol Sci 2022 6;23(2):604. doi:10.3390/ijms23020604, (ISI, IF 5.6);

Link: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/2/604>

