



UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
"CAROL DAVILA" din BUCUREȘTI



ANUL
2023

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

*Contribuții teoretice și experimentale privind dinamica amiloidului
beta în modele de neurodegenerare*

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:
PROF. UNIV. DR. POPESCU
BOGDAN OVIDIU

Student-doctorand:
SCHREINER
THOMAS GABRIEL

ANUL
2023

Cuprins

Introducere.....	4
I. Stadiul actual al cunoașterii	9
Capitolul 1: Considerații preliminare despre neurodegenerare și bolile neurodegenerative. Boala Alzheimer.....	9
1.1. Neurodegenerarea în contextul bolilor neurodegenerative	9
1.2. Factorii de risc în bolile neurodegenerative.....	10
1.3. Teoriile neurodegenerării.....	16
Capitolul 2: Amiloidul beta – de la normal la patologic	18
2.1. Formarea și eliminarea amiloidului beta.....	18
2.2. Rolurile amiloidului beta în condiții fiziologice.....	22
2.3. Rolurile amiloidului beta în condiții patologice de neurodegenerare.....	27
2.4. Amiloidul beta ca țintă terapeutică în boala Alzheimer.....	31
II. Contribuții personale.....	34
Capitolul 3: Ipoteza de lucru și obiectivele generale.....	34
Capitolul 4: Metodologia generală a cercetării.....	36
Capitolul 5: Studiul I: Teoria dinamicii amiloidului beta și strategii terapeutice derivate..	38
5.1. Introducere (Ipoteze de lucru și obiective specifice).....	38
5.2. Material și metodă	39
5.3. Rezultate	40
5.4. Discuții.....	42
Capitolul 6: Studiul II: Dezvoltarea unui dispozitiv biocompatibil de filtrare capabil de epurarea A β dintr-o soluție.....	43
6.1. Introducere (Ipoteze de lucru și obiective specifice).....	43
6.2. Material și metodă	47
6.2.1. Sinteza și funcționalizarea membranei nanoporoase de filtrare.....	47
6.2.2. Verificarea parametrilor nanoporilor membranei de filtrare.....	48
6.2.3. Verificarea selectivității membranei nanoporoase de filtrare	51
6.2.4. Testarea biocompatibilității membranelor nanoporoase și a componentelor dispozitivului de filtrare	53
6.2.5. Asamblarea dispozitivului de filtrare al A β	55
6.3. Rezultate	58
6.3.1. Validarea funcționalizării membranei nanoporoase de filtrare al A β	58

6.3.2. Demonstrarea biocompatibilității membranei nanoporoase și a celorlalte componente ale dispozitivului de filtrare	62
6.4. Discuții.....	64
6.5. Concluzii.....	66
Capitolul 7: Studiul III: Efectele clinice și paraclinice ale filtrării A β de la nivelul lichidului cefalorahidian într-un model murin pentru boala Alzheimer.....	67
7.1. Introducere (Ipoteze de lucru și obiective specifice)	67
7.2. Material și metodă	68
7.2.1. Loturi de studiu cu animale de laborator.....	68
7.2.2. Procedura de implantare a dispozitivului de filtrare	69
7.2.3. Testarea comportamentală	74
7.2.4. Procedura de recoltare a probelor biologice și de recuperare a dispozitivului implantat.....	79
7.2.5. Prelucrarea probelor recoltate	81
7.2.6. Etica cercetării.....	82
7.3. Rezultate	83
7.3.1. Implantarea dispozitivelor.....	83
7.3.2. Rezultatele testelor comportamentale	83
7.3.3. Rezultatele obținute în urma analizei probelor biologice.....	86
7.3.4. Rezultatul analizei membranelor nanoporoase după tratament	88
7.4. Discuții.....	94
7.5. Concluzii.....	96
8. Concluzii și contribuții personale	97
8.1. Concluzii, limitări și direcții viitoare de cercetare.....	97
Concluzii	97
Limitările studiului.....	100
Direcții viitoare de cercetare	101
8.2. Contribuții personale.....	101
Recunoașteri și mulțumiri.....	103
Bibliografie.....	104
Listă anexe.....	121

Lista cu abrevieri și simboluri

APP - proteina precursoră a amiloidului

A β – amiloid beta

BA – boala Alzheimer

BHE – bariera hematoencefalică

HHV-6 - virusul herpetic uman tip 6

HSV - virusul herpes simplex

LCR – lichid cefalorahidian

SNC – sistem nervos central

Introducere

Bolile neurodegenerative reprezintă un domeniu important al neurologiei secolului XXI, fiind caracterizate printr-o incidență în continuă creștere și un interes sporit din partea cercetătorilor, dovadă numărul mare de studii științifice din ultimii ani. Boala Alzheimer (BA), cea mai frecventă patologie neurodegenerativă la nivel mondial, este un exemplu relevant pentru provocările pe care bolile neurodegenerative le aduc medicului neurolog. Astfel, în ciuda numeroaselor cercetări efectuate până în prezent, rămân în continuare multe elemente necunoscute privind etiologia și fiziopatologia bolii, precum și dificultatea depistării precoce și absența unui tratament curativ al bolii.

Inexistența unui tratament eficient care să oprească (sau chiar să inverseze) procesul de neurodegenerare se datorează în principal cunoașterii insuficiente a mecanismelor celulare și moleculare implicate în apariția și evoluția patologiilor neurodegenerative. Pornind de la exemplul bolii Alzheimer, care a fost descrisă inițial în 1906, chiar și după 100 de ani de cercetări exhaustive, ipotezele vehiculate rămân incomplete. În prezent, cercetările se axează pe câteva direcții, cele mai importante fiind reprezentate de acumularea patologică de amiloid beta, impactul stresului oxidativ asupra neuronilor și neuroinflamația cronică. Totuși, dezvoltarea de terapii care să contracareze aceste mecanisme patologice nu au avut efectul așteptat, respectiv ameliorarea semnificativă a simptomatologiei, reducerea injuriei cerebrale sau creșterea speranței de viață a pacientului. În acest sens, pentru înțelegerea mai bună a BA, este necesară o altă abordare în cercetarea fundamentală, care să se bazeze inițial

pe reinterpretarea unor teorii intens dezbătute (precum ipoteza amiloidului), iar ulterior, pe asamblarea informațiilor teoretice heterogene într-un tablou fiziopatologic unitar.

Amiloidul beta ($A\beta$), un peptid rezultat în urma clivării patologice a proteinei precursoră a amiloidului (APP), deși descris inițial în urmă cu mai multe decenii la nivelul creierului pacienților cu BA, rămâne în prezent unul dintre biomarkerii esențiali în diagnosticul acestei patologii. Mai mult, în ultimii ani, $A\beta$ a devenit și o veritabilă țintă terapeutică pentru BA, dar și alte boli neurodegenerative, cu apariția foarte recentă a unor anticorpi monoclonali îndreptați împotriva acestei molecule, cu potențial efect benefic pentru pacienți. $A\beta$ joacă un rol primordial în fiziopatologia BA, toxicitatea diferitelor forme de $A\beta$ regăsit la nivel cerebral fiind legată de restul proceselor distructive (inflamație cronică, stres oxidativ, acumularea altor proteine cu rol patologic, apoptoză neuronală) întâlnite în sistemul nervos central (SNC) afectat de neurodegenerare. Conform ultimelor cercetări, $A\beta$ pare a avea multiple roluri și în condiții fiziologice, țintirea acestei molecule încă din stadii preclinice de BA devenind o posibilă opțiune terapeutică și de prevenție.

I. Stadiul actual al cunoașterii

Capitolul 1: Considerații preliminare despre neurodegenerare și bolile neurodegenerative. Boala Alzheimer

1.1. Neurodegenerarea în contextul bolilor neurodegenerative

Bolile neurodegenerative reprezintă un grup heterogen de patologii neurologice care afectează de regulă populația vârstnică. Cea mai frecventă patologie neurodegenerativă este boala Alzheimer (BA) care, conform celor mai recente date epidemiologice, afectează în prezent peste 6 milioane de americani cu vârsta peste 65 de ani (Alzheimer's Association, 2021). În prezent, nu se cunoaște cu exactitate etiologia BA, fiind observați doar câțiva factori de risc asociați neurodegenerării (Hu & Octave, 2019). În plus, tratamentele disponibile la acest moment sunt majoritar terapii simptomatice, care au efecte limitate asupra ameliorării tabloului clinic, dar nu reușesc oprirea evoluției bolii (Wareham et al., 2022).

Procesul central care determină apariția BA, precum și al celorlalte patologii neurodegenerative, este neurodegenerarea. Acest proces care afectează sistemul nervos central (SNC-ul) se caracterizează prin întreruperea conectivității dintre neuronii localizați în diferite arii cerebrale, prin degradarea progresivă a sinapselor interneuronale și a axonilor,

culminând cu pierdere neuronală extinsă (Jellinger, 2010). Consecința clinică a acestui fenomen este reprezentată de afectarea a numeroase procese cognitive, senzoriale și motorii, incluzând în principal limbajul, memoria, motilitatea, vederea și auzul (Taipa et al., 2022). Se explică astfel tabloul clinic regăsit la pacienții cu BA, la care memoria, limbajul și atenția sunt afectate predominant. Totuși, și alte disfuncții cognitive precum agnozia sau apraxia pot fi întâlnite.

Deși neurodegenerarea are în centru moartea neuronilor, acest fenomen nu ar fi posibil fără prezența unor factori declanșatori, unor factori susținători și, nu în ultimul rând, prin afectarea concomitentă a altor celule de la nivelul SNC (Valori et al., 2021). În plus, conform cercetărilor recente, neurodegenerarea de la nivelul SNC ar fi și rezultatul unor dezechilibre la nivelul sistemului nervos periferic (Ma et al., 2021) și al sistemului imun care acționează în periferie (Zang et al., 2022).

1.2.Factorii de risc în bolile neurodegenerative

Studiile multiple efectuate în ultimele decade au evidențiat factori genetici și factori de mediu care cresc predispoziția pentru apariția bolilor neurodegenerative (Wang et al., 2021). Pentru identificarea genelor care conferă un risc crescut de apariție a BA au fost necesare studii de secvențiere a genomului uman. Aceste cercetări au evidențiat căi moleculare comune asociate unor gene, cum ar fi *APOE4* sau *CLU*, care codifică apolipoproteina E și apolipoproteina J (numită și clusterină) (An et al., 2021). *APOE4* este un factor de risc intens studiat pentru BA, care modulează mecanisme diverse ce implică agregarea patologică a proteinelor, susținerea inflamației și a neurodegenerării (Husain et al., 2021). Alte gene care suferă mutații de tip autozomal dominant la pacienții cu BA, cu precădere în forma cu debut precoce („early onset Alzheimer’s disease”), sunt genele *APP*, *PSEN1* și *PSEN2* (Xiao et al., 2021). Aceste gene codifică elemente cheie din cascada amiloidului beta, precum proteina precursoră a amiloidului (*APP*), presenilina-1 și presenilina-2, componente ale complexului gamma secretază.

Este clar faptul că doar prezența factorilor genetici nu este o certitudine pentru apariția BA, existând un proces pe mai multe etape, unele necunoscute încă, prin care o persoană care posedă o anumită alelă să dezvolte manifestări clinice compatibile cu degenerarea SNC (Avila & Perry, 2021). Astfel, poate de o importanță mai mare sunt factorii de mediu, mulți dintre ei modificabili, care au fost asociați cu un risc crescut pentru apariția BA.

De-a lungul timpului, au fost studiați numeroși factori de mediu în asociere cu BA, incluzând vârsta, dieta, exercițiile fizice și expunerea la substanțe neurotoxice, din prisma

de declanșatori sau exacerbatori ai cascade neurodegenerării. Vârsta înaintată este un factor de risc esențial în numeroase patologii, îmbătrânirea având o influență cu atât mai semnificativă asupra neuronilor de la nivelul SNC (Sikora et al., 2021). Dintre factorii demografici, s-a observat faptul că un pacient are un risc crescut de a dezvolta BA în cazul unui nivel educațional și social mai scăzut (Bodryzlova et al., 2022), în timp ce impactul genului sau rasei rămâne încă incomplet elucidat (Mielke et al., 2022). Ca factori neurotoxici proveniți din mediul înconjurător, rămâne deschisă dezbateră privind adevăratul impact al particulelor metalice în patogenia BA, prin diverse mecanisme precum interacțiunea cu metabolismul APP sau modularea APOE. Cele mai multe cercetări s-au axat pe studiul efectelor aluminiului, zincului, mercurului, cuprului sau magneziului în neurodegenerare (Bakulski et al., 2020). În plus, studiile au arătat și efectul cumulativ în cazul asocierii mai multor metale, mecanismele exacte rămânând incomplet elucidate (Islam et al., 2022).

O asociere interesantă se remarcă între traumatismul cranio-cerebral și BA, în special la pacienții cu un istoric de multiple leziuni traumatice la nivelul extremității cefalice (Ramos-Cejudo et al., 2018). Cele mai recente date înclină spre faptul că etiopatogenia BA este influențată de dietă, persoanele cu un aport excesiv de grăsimi saturate sau cele cu un deficit de vitamina E având un risc mai crescut de a dezvolta această boala (Bello-Corral et al., 2021). Malnutriția, obezitatea și diabetul zaharat au fost asociate cu neurodegenerarea, în special cu BA. Tot ca factor exogen cu potențiale implicații în apariția și/sau evoluția BA ar putea fi infecțiile cu diferiți agenți patogeni, majoritatea virali. Dintre studiile relevante pe această temă, demne de menționat sunt rezultatele privind virusul herpes simplex (HSV), virusul Epstein-Barr sau virusul herpetic uman tip 6 (HHV-6) și riscul crescut de a dezvolta BA (Itzhaki et al., 2021).

După cum se observă, există un mozaic de elemente endogene și exogene care, prin efectul lor cumulativ și, cel mai probabil, pe baza unui mecanism adițional neelucidat până în prezent, induc și mențin neurodegenerarea caracteristică BA.

1.3. Teoriile neurodegenerării

În prezent, există mai multe teorii acceptate privind apariția și evoluția neurodegenerării în cadrul BA. Criteriul temporal este unul esențial în evoluția procesului degenerativ, bolile caracterizate prin neurodegenerare fiind rezultatul acumulării unei substanțe toxice (endo- sau exogene) sau efectul dependent de timp al unei substanțe toxice prezente anterior într-o anumită concentrație (Modgil et al., 2014). Mecanismul de acțiune al factorilor de risc nu este unul direct, ci unul cumulativ, dependent de vârstă. Una dintre căile comune ale acestor

promotori ai neurodenegerării este eliberarea crescută de radicali liberi de oxigen care, în cazul înaintării în vârstă, nu mai pot fi contracarați optim prin mecanismele fiziologice de neutralizare, determinând boală (Ionescu-Tucker & Cotman, 2021).

O altă abordare teoretică se bazează pe ipoteza „dublei lovituri”, în care există două momente cheie distincte ce conduc la apariția stării patologice (Zhu et al., 2007). În mod similar, a fost generată și ipoteza „loviturilor multiple”, în care autorii ei au încercat explicarea apariției patologiilor neurodegenerative pe baza interacțiunilor multiple și complexe între infecțiile bacteriene, disfuncțiile imune și patologia de la nivelul SNC (Patrick et al., 2019). În final, o altă teorie interesantă, mai recentă, se bazează pe conceptul de „sarcină alostatică” a corpului (Guidi et al., 2021). Conform acestui concept, principalul factor de risc este rata de îmbătrânire, disfuncția sistemelor anatomice dependentă de vârstă determinând o „uzură a corpului” ce include pierderea sinapselor și a neuronilor.

Capitolul 2: Amiloidul beta – de la normal la patologic

2.1. Formarea și eliminarea amiloidului beta

Amiloidul beta ($A\beta$) este un peptid rezultat în urma clivării patologice a proteinei precursora a amiloidului (APP) pe calea amiloidogenică, sub acțiunea β -secretazei și al complexului gama-secretazei. Impactul (toxicitatea) $A\beta$ în fiziopatologia BA se datorează în principal modificărilor structurii cuaternare ale moleculei. Alături de neurotoxicitatea plăcilor de amiloid, monomerii și oligomerii joacă și ei roluri tot mai importante în neurotoxicitatea care conduce la neurodegenerare.

Acumularea $A\beta$ la nivel cerebral rămâne elementul central în fiziopatologia BA, însă nu doar producerea sa în exces, cât mai mult deficitul de eliminare a fost asociat cu forma cu debut tardiv a BA („late-onset Alzheimer’s disease”) (Rosas-Hernandez et al., 2020). Există mai multe modalități prin care $A\beta$ este eliminat de la nivelul interstițiului cerebral, prin degradare intra și extracelulară sau prin transport către circulația sistemică și limfatică (Tarasoff-Conway et al., 2015). Eliminarea $A\beta$ cerebral se face într-o proporție semnificativă la nivelul BHE direct în fluxul sangvin, sub acțiunea unor sisteme de transport specializate. Principalii responsabili pentru efluxul $A\beta$ solubil de la nivelul interstițiului cerebral sunt membrii familiei receptorilor LDL (LDLR), cum ar fi LRP1, și transportorii cu casetă de legare a ATP (transportatori ABC). Există și alte căi de eliminare a $A\beta$ de la nivelul SNC, precum degradarea intra și extracelulară, drenajul perivascular și la nivelul sistemului glimfatic, sau prin absorbția de la nivelul lichidului cefalorahidian (LCR).

2.2. Rolurile amiloidului beta în condiții fiziologice

În ultimii ani au apărut tot mai multe studii care sugerează că monomerii și oligomerii de A β au rolurile benefice în condiții fiziologice. În acest sens, au fost propuse cinci direcții principale pentru a explica rolul „protector” al A β în condiții fiziologice: efect antimicrobian, activitate de supresie tumorală, capacitate de etanșare a barierei hematoencefalice, promotor de reparație a leziunilor cerebrale și reglator al funcționării sinaptice.

Studiile efectuate in vitro pe culturi celulare au arătat că A β poate reduce proliferarea mai multor specii de bacterii (Soscia et al., 2010). A β a redus viabilitatea culturilor fungice in vitro, precum culturile de *Candida albicans* care au fost inhibitate de omogenate obținute din creierul pacienților cu BA (Vojtechova et al., 2022). Rolul antitumoral al peptidului A β a fost sugerat inițial pe baza corelației inverse dintre BA și riscul apariției de tumori. Numeroase studii epidemiologice au arătat că pacienții cu BA au un risc mult mai mic de a dezvolta cancer în comparație cu subiecții sănătoși (Lanni et al., 2021). În ce privește legătura dintre A β și bariera hematoencefalică, este deja bine cunoscut rolul pe care alterarea structurală al BHE îl are în susținerea cascadei neurodegenerative, conducând la acumularea patologică de A β la nivel cerebral. Există câteva studii care au arătat o acumulare crescută de A β la câteva ore după TCC, acumulările mai importante fiind corelate cu o recuperare mai bună (Plummer et al., 2016). În final, cercetări recente au demonstrat rolul moleculei APP în transportul axonal și eliberarea de A β în fanta sinaptică în timpul activității neuronale (Fagiani et al., 2021). A β acționează asupra neuronului presinaptic, stimulând eliberarea neurotransmițătorilor, susținând astfel procesele fiziologice care asigură funcționarea corectă a circuitelor neuronale de memorie (Fanutza et al., 2015).

2.3. Rolurile amiloidului beta în condiții patologice de neurodegenerare

În cazul BA, A β are un impact negativ asupra numeroaselor procese de la nivelul SNC, generând și susținând neurodegenerarea. Disfuncția sinapselor este una dintre principalele consecințe ale plăcilor toxice de A β și este rezultatul pierderii sinaptice crescute fără o sinaptogeneză compensatorie adecvată (Sciacaluga et al., 2021). A β influențează negativ și alte molecule de la nivel cerebral, precum proteina Tau sau α -sinucleina. Fiind în strânsă legătură cu A β , aceste proteine exprimă un comportament anormal în bolile neurodegenerative, suferind hiperfosforilare sau alte modificări structurale pe baza cărora este susținută agregarea lor patologică. A β are un impact negativ și la nivel intracelular,

numeroase procese de semnalizare fiind afectate, rezultând dezechilibre ionice, în special cel legat de calciu (Ca^{2+}). Stresul celular cronic determină o activitate metabolică redusă, iar în ce privește mitocondria, există un echilibru energetic deficitar, cu o producție redusă de adenozin trifosfat (ATP) și o scădere a activității enzimatică mitocondriale (Ryu et al., 2021). Afectarea mitocondrială, alături de alterarea homeostaziei celulare, înseamnă și afectarea respirației celulare, fiind bine cunoscut rolul mitocondriei în glicoliză și menținerea balanței speciilor reactive de oxigen (Bell et al., 2021).

Multiple studii au arătat că $\text{A}\beta$ activează microglia și astrocitele, celule care produc ulterior citokine pro-inflamatorii și chemokine care susțin o stare inflamatorie cronică (Jung et al., 2022). Rămâne important de menționat și legătura bidirecțională dintre $\text{A}\beta$ și bariera hematoencefalică (BHE), BHE fiind puternic alterată în BA. Permeabilitatea crescută a endoteliului capilar, degradarea joncțiunilor strânse și creșterea ratei de transcitoză, detașarea pericitului de endoteliul capilar și transformarea în celulă fagocitară sau fibroblast, activarea astrocitelor și a microgliei, acestea fiind cele mai relevante modificări observabile la nivelul BHE.

2.4. Amiloidul beta ca țintă terapeutică în boala Alzheimer

Având în vedere importanța $\text{A}\beta$ în cadrul procesului complex de neurodegenerare, $\text{A}\beta$ fiind una dintre moleculele cheie care generează și susține acest fenomen, este ușor de înțeles motivul pentru care cercetătorii au considerat $\text{A}\beta$ o țintă terapeutică propice în cadrul tratamentului antidemential. Dintr-o perspectivă sumarizată, controlul echilibrului $\text{A}\beta$ la nivel cerebral se poate obține prin modularea a două procese distincte: producția de $\text{A}\beta$ (care este crescută în special în cazul formelor cu debut precoce de BA, iar în acest caz este necesară diminuarea ei), și eliminarea $\text{A}\beta$ de la nivelul SNC (care este defectuoasă în special în cazul formelor cu debut tardiv de BA, iar în acest caz este necesară creșterea ei).

Având în vedere faptul că încercările terapeutice bazate pe reducerea producției de $\text{A}\beta$ nu au condus la rezultatele așteptate, abordările recente se axează pe ameliorarea drenajului $\text{A}\beta$, atât de la nivel cerebral, cât și de la nivel sistemic. Au fost utilizate două abordări distincte bazate pe reactivitatea imună, imunoterapia activă și cea pasivă, care neutralizează moleculele monomerice și/sau oligomerice de $\text{A}\beta$, favorizând eliminarea compusului. În final, ameliorarea eliminării $\text{A}\beta$ de la nivel cerebral (dar și sistemic) se poate face și prin metode minim invazive, cum ar fi plasmafereza, dializa, sau filtrarea $\text{A}\beta$ din diferite compartimente biologice (inclusiv din compartimentul LCR) și neutralizarea $\text{A}\beta$ prin utilizarea anticorpilor specifici.

II. Contribuții personale

Capitolul 3: Ipoteza de lucru și obiectivele generale

Contribuția personală poate fi fragmentată în cadrul a trei studii distincte, primul teoretic și celelalte două practice. Obiectivele generale ale tezei cuprind câte două obiective pentru fiecare dintre cele trei studii menționate anterior:

- I. Generarea unei ipoteze noi privind rolul dinamicii A β în apariția și evoluția bolii Alzheimer, pornind de la clasică ipoteză a amiloidului
- II. Generarea unei ipoteze numită „strategia terapeutică a compartimentului lichidului cefalorahidian” care să deschidă noi perspective terapeutice în boala Alzheimer și alte boli neurodegenerative
- III. Dezvoltarea unei membrane filtrante cu nanopori capabilă de filtrarea moleculelor solubile de A β (de tipul monomerilor și oligomerilor)
- IV. Dezvoltarea unui dispozitiv biocompatibil de filtrare capabil de epurarea A β de la nivelul compartimentului lichidului cefalorahidian
- V. Validarea practică a ipotezelor teoretice din studiul 1 prin implantarea dispozitivului de filtrare al A β pe un model murin pentru boala Alzheimer, cu bună supraviețuire a animalului timp de 4 săptămâni
- VI. Cuantificarea efectelor terapeutice ale dispozitivului de filtrare al A β la un model murin pentru boala Alzheimer, pe baza ameliorării simptomatologiei clinice și a parametrilor paraclinici

Capitolul 4: Metodologia generală a cercetării

Pentru atingerea obiectivelor tezei, am aplicat metode de laborator și de bioinginerie variate. Astfel, pentru dezvoltarea membranelor nanoporoase biocompatibile de filtrare au fost necesari mai mulți pași:

- sinteza membranei printr-un proces de anodizare în două etape în electroliți pe bază de acid oxalic pornind de la discuri de aluminiu,
- funcționalizarea membranei de alumina prin tehnica ALD (atomic layer deposition) prin care au fost depuse mai multe straturi atomice,
- controlul calității funcționalizării care a fost realizat prin diferite metode de măsurare: spectroscopie bazată pe difracție cu raze X, spectroscopie Raman,

- spectroscopie în infraroșu, microscopie electronică de scanare (SEM), spectroscopie cu raze X cu dispersie de energie (EDS) și o analiză termică simultană constând în termogravimetrie și calorimetrie cu scanare diferențială,
- măsurători de selectivitate membranară pentru confirmarea selectivității membranei nanoporoase pentru A β ,
 - evaluarea biocompatibilității membranei pe baza testelor MTT.

Ulterior, după obținerea unei membrane nanoporoase biocompatibile, am imaginat și asamblat un dispozitiv experimental de filtrare a LCR, alcătuit din trei componente principale: un cateter cu rol de conectare a ventriculului lateral la modulul de filtrare, modulul de filtrare care conține membrana nanoporoasă cu rol de filtrare selectivă a A β din LCR și un rezervor în care LCR-ul bogat în A β este sechestrat pe baza unei reacții antigen-anticorp. Toate componentele care intră în alcătuirea dispozitivului au fost testate individual privind biocompatibilitatea, prin teste MTT.

Dispozitivul astfel asamblat a fost implantat pe un total de 20 de animale, reprezentând 4 loturi a câte 5 animale. Mai exact, pentru efectuarea studiilor in vivo, au fost utilizați 10 șoareci C57BL/6 și 10 șoareci APP/PS1 cărora li s-au administrat la intervale de timp bine stabilite (cu o săptămână anterior implantării și după 4 săptămâni de tratament) teste comportamentale de tipul testului în labirintul în formă de plus (elevated plus maze) și testului în labirintul Y (Y maze test), iar la finalul perioadei de tratament, au fost sacrificați, fiind recoltate probe biologice (sânge, LCR, țesut cerebral și hepatic), care au fost analizate prin metode imunohistochimice. Suplimentar, au fost utilizate încă 10 animale, 5 șoareci C57BL/6 și 5 șoareci APP/PS1, drept martori negativi care nu au primit tratament.

Capitolul 5: Studiul I: Teoria dinamicii amiloidului beta și strategii terapeutice derivate

5.3. Rezultate

Primul studiu din cadrul tezei a avut ca rezultat producerea unui articol de tip review (Schreiner et al., 2022a), în care autorii realizează două aspecte importante:

- în primul rând, revizuiesc literatura de specialitate existentă până la acel moment și explică, pe baza informațiilor cunoscute și demonstrate deja, importanța cunoașterii dinamicii A β între compartimentele organismului uman pentru apariția și evoluția BA;
- generează o nouă ipoteză numită „strategia terapeutică a compartimentului

lichidului cefalorahidian” cu impact terapeutic semnificativ, pe care o vor folosi ca bază teoretică și principiu fundamental pentru studiile experimentale din studiul 3.

Pornind de la ipoteza dinamicii A β , se observă că punctul comun al drenajului cerebral al A β , alături de alți compuși reziduali, este compartimentul lichidului cefalorahidian, de unde ulterior o parte semnificativă de reziduuri proteice este direcționată către circulația periferică. Lichidul cefalorahidian devine astfel o țintă terapeutică esențială, acest compartiment comunicând în principal cu fluidul interstițial cerebral, dar și cu mediul intern. Prin diverse intervenții menite să modifice caracteristicile biochimice ale lichidului cefalorahidian (reducerea anumitor substanțe dizolvate), reducerea concentrației de A β de la acest nivel ar putea duce și la modificări semnificative ale concentrației cerebrale de peptid A β . Se pun astfel bazele „strategiei terapeutice a compartimentului lichidului cefalorahidian” pornind de la echilibrul dinamic al substanțelor solubile între cele trei compartimente biologice distincte, interstițiul cerebral, lichidul cefalorahidian și sângele periferic. Această ipoteză este validă și utilă din punct de vedere practic și din cauza faptului că A β (predominant în formă de monomer și oligomer mic) în diverse soluții (LCR sau sânge în condiții in vivo) este filtrabil prin membrane filtrante cu parametri specifici, acesta fiind și motivul principal realizării unui dispozitiv de filtrare capabil a separa A β dintr-o soluție coloidală (vezi studiul 2 pentru detalii).

Capitolul 6: Studiul II: Dezvoltarea unui dispozit biocompatibil de filtrare capabil de epurarea A β dintr-o soluție

6.3. Rezultate

Prima etapă din cadrul studiului II a constat în dezvoltarea unei membrane filtrante cu nanopori capabilă de filtrarea moleculelor solubile de A β (de tipul monomerilor și oligomerilor). Obținerea acestei membrane a fost posibilă în urma procesului de sinteză a membranei de alumina și ulterior funcționalizarea suprafeței acestei structuri. Toate etapele sunt prezentate detaliat în secțiunea de “Material și metodă”. Ulterior, un pas esențial îl reprezintă validarea funcționalizării membranei care s-a realizat prin analiză de spectroscopie bazată pe difracție cu raze X, spectroscopie Raman, spectroscopie în infraroșu și analiză SEM-EDS. Rezultatele au atestat faptul că membrana funcționalizată se înscrie în parametrii doriți (vezi graficele de mai jos).

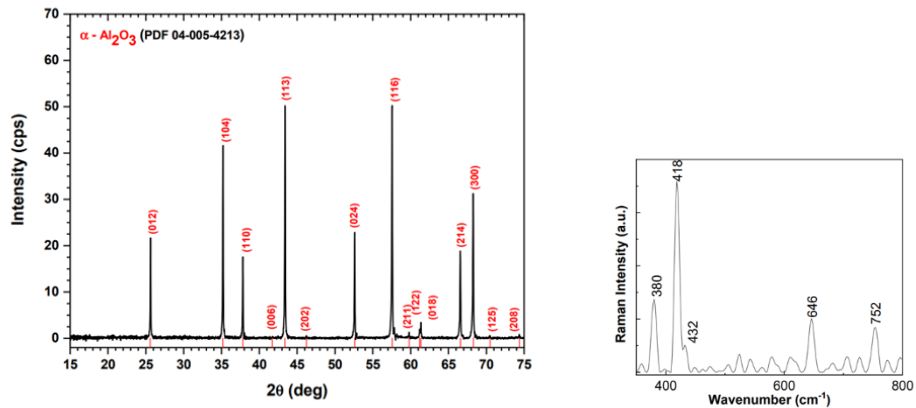


Figura 1: Analiza membranei nanoporoase prin spectroscopie cu raze X și spectroscopie Raman

Analiza SEM-EDS oferă o imagine mult mai detaliată în ce privește structura membranei nanoporoase. Această analiză a arătat o distribuție uniformă a porilor și dimensiuni cvasi-egale ale diametrelor porilor. Procesul tehnologic (în principal procesul de funcționalizare) de obținere a membranei nanoporoase a fost bine realizat, întrucât porii produsului final au avut o dimensiune medie de cca. 17 nm, ideal pentru filtrarea Aβ. Din punct de vedere teoretic, o dimensiune a porilor sub 25 nm (ideal sub 20 nm) este suficientă pentru filtrarea selectivă a Aβ. În plus, prin controlul strict al procesului tehnologic de formare al membranei, porii obținuți au fost mult mai uniformi și mai apropiați spațial decât ceea ce a fost considerat inițial în proiectarea teoretică, adică o distanță interpor mai mică de 50 nm. Impactul direct este creșterea eficienței filtrării și, având în vedere că suprafața de filtrare necesară poate fi mai mică, o miniaturizare suplimentară a dispozitivului poate fi luată în considerare.

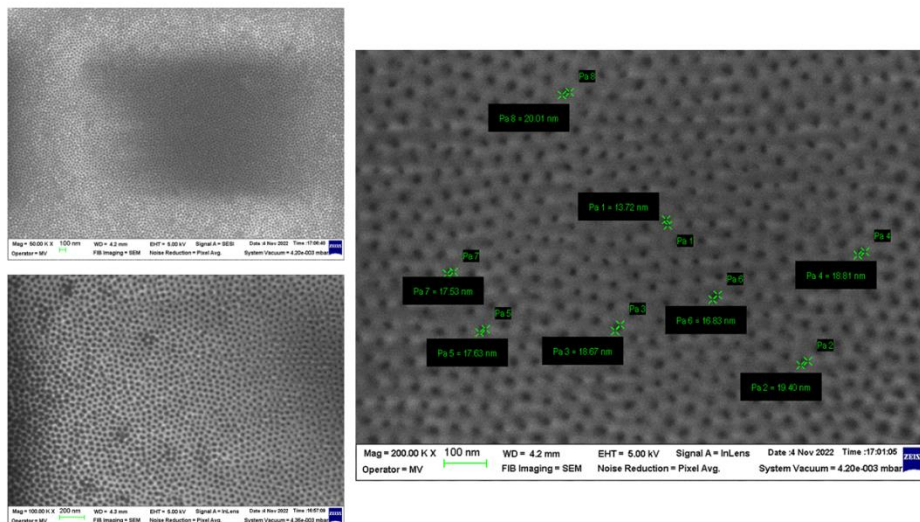


Figura 2: Analiza SEM-EDS a membranei nanoporoase la diferite grade de magnificare (de la stânga-sus 50.000X, stânga-jos 100.000X și dreapta 200.000X)

În final, s-a efectuat și o analiză termică simultană constând în termogravimetrie și calorimetrie cu scanare diferențială (Figura 3). Proba a fost analizată inițial prin DSC în azot până la o temperatură de 300°C, pentru a observa dacă există contaminare organică/polimerică, aspect esențial al filtrelor concepute pentru separarea moleculelor organice. A fost observat un proces endotermic slab la aproximativ 82,5°C, probabil din cauza eliminării umidității reziduale. În rest graficul obținut este caracteristic pentru materialele anorganice necontaminate. În analiza DSC efectuată în aer până la 500°C, există unele procese exoterme slabe de la 290°C la 375°C, explicate prin oxidarea urmelor de carbon și/sau fosfor. La analiza TG în azot până la 700°C nu se observă nicio modificare, deci se reconfirmă faptul că membrana nanoporoasă anorganică nu este contaminată cu substanțe organice.

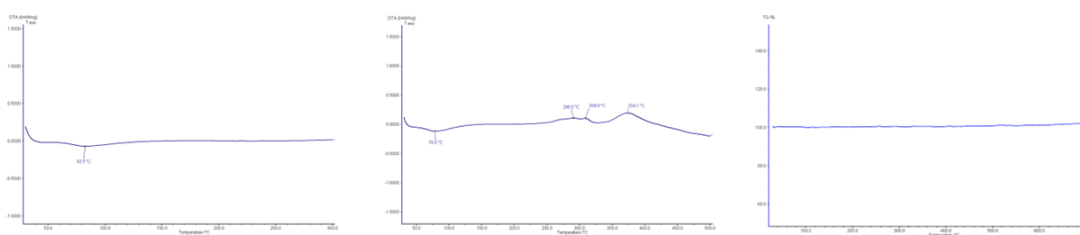


Figura 3: Analiza termică simultană a membranei nanoporoase (stânga – analiza DSC în azot până la 300°C, mijloc – analiza DSC în aer până la 500°C, dreapta – analiza TG în azot până la 700°C)

Utilizarea membranei nanoporoase în condiții in vivo necesită în mod obligatoriu demonstrarea biocompatibilității ei.

Membrana de alumina nu a influențat viabilitatea celulelor MCF-7, singurul efect vizibil fiind creșterea numărului de celule (celule viabile). Extractul brut a determinat o creștere a numărului de celule/viabilitate cu 13,58%, diluția 1:2 cu 17,74% și diluția 1:4 cu 19,03%. În plus, în cazul celulelor MDA-MB-231, extractul de membrană de alumina nu a influențat viabilitatea celulelor; cu toate acestea, s-a înregistrat o creștere a numărului de celule vii. Amplitudinea a fost mai mică decât în cazul celulelor MDA-MB-231, dar a depășit viabilitatea de 100% a grupului de control cu 9,45% (extract brut), 10,71% (diluție 1:2) și 13,52% (1: 4 diluție). Semnificația statistică calculată prin testul t-student a arătat că toate

diferențele de viabilitate celulară au fost relevante din punct de vedere statistic (* $\leq 0,05$, ** $\leq 0,01$). Astfel, în acest test preliminar de evaluare a biocompatibilității, membrana testată s-a dovedit a fi pe deplin compatibilă cu cele două culturi celulare testate. Rezultatele în ce privește biocompatibilitatea/toxicitatea au fost promițătoare și în cazul celorlalte componentelor care, alături de membrana nanoporoasă, alcătuiesc modulul de filtrare al prototipului.

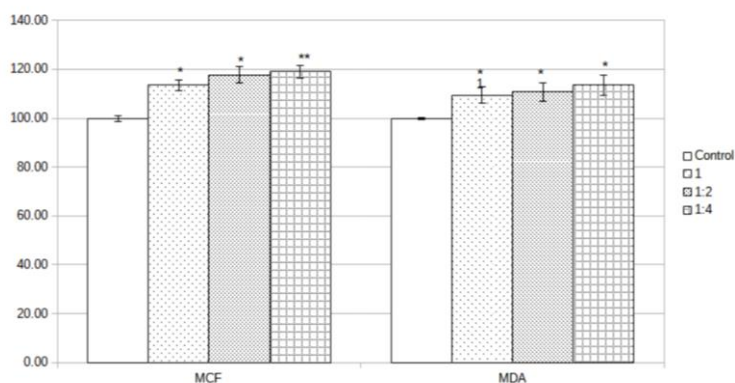


Figura 4: Viabilitatea liniilor celulare MCF-7 și MDA-MB-231 determinată prin test MTT după 48 de ore de incubare cu extractul de membrană testat în diferite diluții: 1 extract concentrat, 1:2—1 parte extract și 1 parte DMEM, 1: 4—1 parte extract și 3 părți DMEM.

Acest studiu oferă o descriere detaliată a etapelor obligatorii care trebuie urmate pentru obținerea unui dispozitiv eficient și biocompatibil, capabil a filtra A β de la nivelul compartimentului lichidului cefalorahidian. Membrana filtrantă cu nanopori rămâne componenta centrală a dispozitivului, iar obținerea unei nanostructuri de alumina funcționalizată prin tehnica ALD este o opțiune viabilă și de preferat, în special având în vedere progresele tehnologice din domeniul bioingineriei. În final, acest studiu deschide noi perspective pentru ameliorarea designului dispozitivelor experimentale de filtrare a lichidului cefalorahidian și pentru dezvoltarea de noi prototipuri biocompatibile, miniaturizate, care pot fi produse facil și cu costuri scăzute la scară industrială.

Capitolul 7: Studiul III: Efectele clinice și paraclinice ale filtrării A β de la nivelul lichidului cefalorahidian într-un model murin pentru boala Alzheimer

7.3. Rezultate

Pornind de la ipotezele detaliate în studiul 1, în cadrul acestui al treilea studiu am avut trei obiective principale. În primul rând, am dorit validarea în practică a noțiunilor teoretice prin implantarea dispozitivului experimental de filtrare al A β la un model murin pentru boala Alzheimer (șoarece APP/PS1). Alături de implantarea cu succes al prototipului de filtrare a lichidului cefalorahidian de A β , scopul studiului este și menținerea unei viabilități îndelungate (minim 4 săptămâni) a șoarecelui cu dispozitivul montat. În al doilea rând, la finalul perioadei de probă, pe baza analizelor clinice (studii comportamentale) și paraclinice (studiul biomarkerilor în diferite probe biologice) se cuantifică efectul terapeutic al acestei metode, fiind trasate concluzii în ce privește posibilitatea utilizării acestei metode în viitor, în practica neurologică zilnică. În final, după sacrificarea șoarecilor, un număr de cinci dispozitive de filtrare au fost recuperate, fiind studiat efectul celor 4 săptămâni de tratament asupra membranei nanoporoase. Urmărirea modificărilor structurale ale membranei post-tratament precum acumularea de reziduu proteic și colmatarea porilor poate fi considerată o metodă indirectă de urmărire a eficienței acestui dispozitiv.

Cu excepția celor două loturi L0 care au fost utilizate drept loturi martor, restul de 20 de șoareci au beneficiat de implantarea dispozitivului de filtrare al A β . Procedura chirurgicală (detaliată în capitolul „Material și metodă”) a cuprins mai mulți pași, fiecare cu riscurile sale peri și postprocedurale. Totuși, în cazul loturilor din studiul prezent, intervenția chirurgicală a avut o rată de reușită de 100% (fără decese intraoperatorii). Mai mult, în cele 4 săptămâni după intervenție, animalele au fost urmărite zilnic în vederea depistării cât mai precoce a unei eventuale alterări a stării generale sau apariției de complicații. Cu excepția a unor dehiscente la nivel tegumentar în zonele adiacente implantării canulei, apărute la 5 din cele 20 de animale în decursul primei săptămâni post procedură, nu am semnalat alte efecte adverse precum infecții, alterări ale statusului general sau deces. Cauzele principale pentru alterările integrității tegumentului sunt diverse, de la motive care țin de grosimea redusă a pielii în zona extremității cefalice, rata individualizată de refacere postoperatorie, elemente ce țin de dispozitiv, precum dimensiunile crescute ale canulei comparativ cu extremitatea cefalică a șoarecelui, tensiunea ridicată a cateterului situat imediat subcutanat, până la probleme ce țin de calitatea materialelor și a tehnicii utilizate în efectuarea suturii finale.

Pentru a demonstra eficiența metodei de epurare a lichidului cefalorahidian de A β cu ajutorul dispozitivului de filtrare dezvoltat anterior am cuantificat atât din punct de vedere clinic, cât și din punct de vedere paraclinic, rezultatele obținute în cadrul loturilor de șoareci care au beneficiat de acest tratament.

În ce privește latura clinică, am urmărit doi parametri distincți, dar corelați între ei, mai exact gradul de anxietate și memoria de scurtă durată. Ambii parametri sunt în legătură strânsă cu deficitul cognitiv întâlnit în cadrul bolii Alzheimer. Rezultatele obținute în cazul loturilor care au beneficiat de tratament cu soluție cu anticorpi sunt încurajatoare, observându-se o scădere a gradului general de anxietate la aceste animale. Nu aceleași rezultate pot fi constatate în cazul loturilor martor, dovadă suplimentară pentru efectul terapeutic al anticorpilor anti-A β în cadrul filtrării LCR. Tot din punct de vedere comportamental, se observă o ușoară ameliorare a deficitului de memorie doar la grupul de șoareci APP/PS1 care au beneficiat de tratament cu soluție cu anticorpi. Degradarea cognitivă înregistrată în celelalte loturi sugerează în plus un efect negativ al acestui tratament la șoarecii WT, eliminarea în exces a A β de la nivel LCR conducând la tulburări cognitive. Trebuie menționat faptul că rezultatele au fost obținute pe loturi mici de studiu, fiind necesare studii cu mai mulți subiecți pentru confirmarea acestor tendințe.

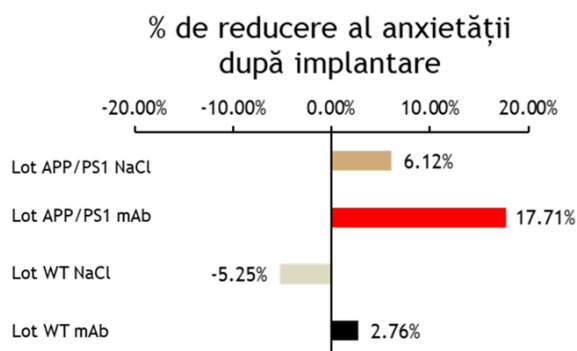


Figura 5: Datele finale privind reducerea gradului de anxietate la șoarecii testați după perioada de tratament

În ce privește datele paraclinice, obținerea de rezultate relevante s-a putut face doar în cazul probelor de țesut cerebral. Limitările datorate cantității mici de LCR și sânge în cazul șoarecilor utilizați, precum și contaminarea din timpul recoltării, au condus la obținerea unui număr foarte redus de probe lichide care să fie analizate ulterior. Chiar dacă nu au semnificație statistică, rezultatele parțiale susțin eficacitatea tratamentului experimental în scăderea nivelurilor de A β din LCR la șoarecii APP/PS1. În mod similar, o scădere (neseemnificativă statistic) a fost observată și în cazul concentrației A β de la nivel cerebral, fiind demonstrat echilibrul dinamic al A β între compartimentul central și compartimentul periferic. Trebuie menționat că acest tratament experimental are efecte negative în cazul

subiecților martori sănătoși, la care a fost înregistrată o degradare cognitivă și o acumulare în exces de A β la nivel cerebral.

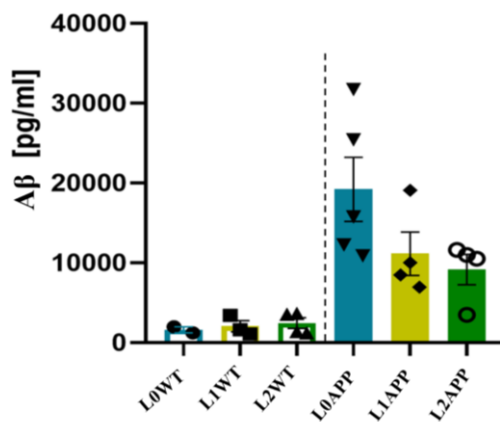


Figura 6: Concentrația A β la nivel cerebral înainte și după tratament

În final, au fost recuperate cele cinci dispozitive de filtrare utilizate în cadrul lotului L2APP, de la care au fost preluate membranele nanoporoase pentru teste suplimentare. Pe baza rezultatelor analizei combinate SEM și EDS, s-au vizualizat acumulări importante de proteine care duc la reducerea dimensiunii porilor, colmatarea lor incompletă, în final diminuând eficacitatea de filtrare a nanomembranei. Reducerea diametrului porilor, de la 17 nm la o medie de 11 nm, a fost neomogenă, afectând în mod diferit și nesistematic nanomembranele. În ciuda reziduurilor proteice, colmatarea membranei nu a fost totală, aceasta păstrându-și o eficiență de aproximativ 60-75% chiar și după filtrarea continuă timp de o lună.

Limitarea colmatării membranelor de filtrare este un alt deziderat important în procesul de obținere al unei membrane ideale, cu aplicații bio-medicale. Mai mult, evitarea acumulării de reziduuri menține eficiența acestora și asigură o durată de viață mai lungă a membranei. Polarizarea membranelor este un fenomen comun și inevitabil, care susține acumularea nedorită de reziduu organic în cadrul proceselor membranare osmotice, ducând la reducerea nedorită a fluxului transmembranar. Strategiile actuale de limitare a polarizării concentrației includ ajustarea hidrodinamicii, gestionarea fluxului și optimizarea designului membranei. Optimizarea membranei de filtrare se poate face pe baza reglării precise atât a naturii chimice, cât și a naturii fizice a suprafeței porilor membranari. În acest sens, tehnologia ALD, utilizată și în cazul membranelor din studiul prezent, este una dintre soluțiile pentru ameliorarea suprafeței membranare și reducerea fenomenului de polarizare.

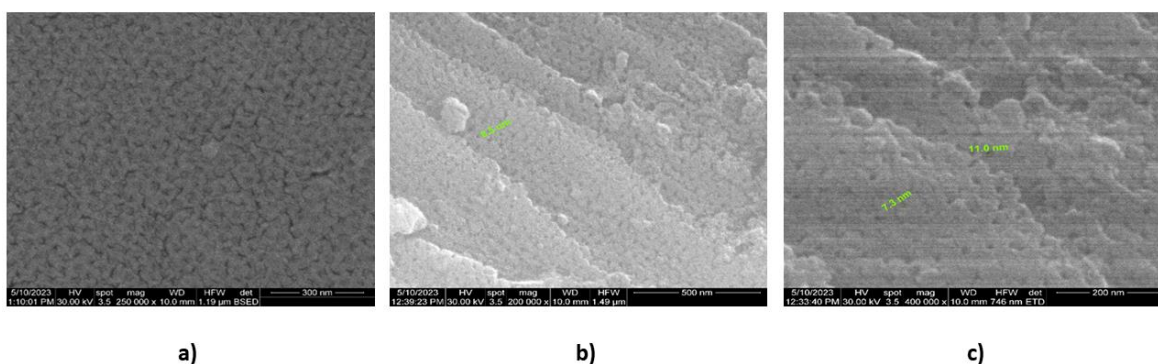


Figura 7: Analiza SEM a membranei nanoporoase de filtrare după perioada de tratament de 4 săptămâni: a) suprafață bazală, grad de magnificare de 250.000X; b) suprafață apicală, grad de magnificare de 200.000X; c) suprafața apicală, grad de magnificare de 400.000X

Gradul ridicat de acumulare de materie organică (proteică) la nivelul membranei nanoporoase a fost suplimentar constatată și în cadrul analizei termice simultane (TG și DSC). Au fost depistate două fenomene termice la 221°C și 300°C, caracteristice descompunerii de substanțe proteice, mai exact reziduurile de A β colmatate la nivelul nanoporilor. Aceste rezultate conduc la două concluzii: pe de o parte, sunt o modalitate indirectă care atestă, prin acumularea în cadrul porilor nanomembranei, buna funcționare și eficacitatea dispozitivului de filtrare, iar pe de altă parte, arată faptul că o perioadă de aproximativ 4 săptămâni este durata de viață optimă a nanomembranei utilizate în acest studiu. Se impune astfel schimbarea nanomembranei după o lună de utilizare în cazul în care se dorește utilizarea dispozitivului pe termen mai lung în studii viitoare.

8. Concluzii și contribuții personale

Boala Alzheimer rămâne cea mai frecventă patologie neurodegenerativă în România și la nivel mondial, iar prevalența acesteia este așteptată a crește în următoarele decenii. Chiar dacă se efectuează numeroase cercetări privind etiologia, fiziopatologia și tratamentul acestei boli, rezultatele sunt în continuare modeste.

Dintre teoriile acceptate în prezent privind apariția și evoluția bolii Alzheimer, ipoteza amiloidului este cea mai constantă. Pe baza rezultatelor anatomopatologice, markerul principal se consideră a fi acumularea patologică de A β la nivel cerebral, sub forma plăcilor senile. A β devine astfel un element cheie atât pentru cercetarea experimentală, cât și o

veritabilă țintă terapeutică.

Pornind de la varianta clasică a ipotezei amiloidului, am reinterpretat viziunea clasică pe baza celor mai recente descoperiri. Astfel, am generat o nouă ipoteză, bazată pe rolul dinamicii A β între diferitele compartimente ale organismului uman (SNC, LCR și circulația periferică). Alterarea dinamicii A β , în principal o eliminare defectuoasă, conduc la apariția și evoluția bolii Alzheimer, în special forma cu debut tardiv.

Pe baza afectării dinamicii A β în neurodegenerare, studiile au demonstrat superioritatea terapiilor bazate pe îmbunătățirea eliminării A β de la nivel cerebral comparativ cu tratamentul bazat pe încetinirea/oprirea producției. În acest context, am generat o nouă ipoteză care ar putea avea importanță terapeutică, pe care am denumit-o „strategia terapeutică a compartimentului lichidului cefalorahidian”. Conform acestei noi abordări, pornind de la echilibrul hidrodinamic al A β solubil dintre compartimentul interstițial cerebral și compartimentul LCR, eliminarea A β de la nivelul LCR ar determina o scădere a nivelului A β de la nivel cerebral. Mai mult, eliminarea A β de la nivelul LCR are un impact superior asupra nivelului A β de la nivel cerebral comparativ cu eliminarea lui de la nivelul circulației sistemice.

Pentru a pune în practică conceptele teoretice menționate anterior, partea centrală a tezei a fost reprezentată de dezvoltarea unui dispozitiv biocompatibil capabil a filtra lichidul cefalorahidian și a epura A β de la acest nivel. Componenta principală a acestui dispozitiv este membrana filtrantă cu nanopori, capabilă să filtreze selectiv moleculele solubile de A β (de tipul monomerilor și oligomerilor).

Obținerea membranei nanoporoase capabilă a filtra A β este rezultatul a două procese distincte: inițial, sinteza membranei de alumina și ulterior funcționalizarea suprafeței acestei structuri prin tehnica ALD. Odată obținută, membrana trebuie să parcurgă o verificare atentă care să confirme parametrii, calitatea și biocompatibilitatea structurii cu nanopori.

Primul aspect constă în confirmarea faptului că procesul de funcționalizare al membranei a decurs conform specificațiilor, în acest sens fiind utilizate următoarele tehnici: spectroscopie bazată pe difracția cu raze X, spectroscopie Raman, spectroscopie în infraroșu, microscopie electronică de scanare (SEM) cu spectroscopie cu raze X cu dispersie de energie (EDS) și o analiză termică simultană constând în termogravimetrie și calorimetrie cu scanare diferențială. Apoi, au fost verificate selectivitatea produsului final pentru moleculele de A β și, în final, biocompatibilitatea pe baza testului MTT. În final, după validare, membrana nanoporoasă a fost incorporată în cadrul dispozitivului experimental de filtrare a LCR.

Demonstrarea conceptelor teoretice a fost posibilă prin implantarea dispozitivului

anterior dezvoltat pe un model murin care simulează boala Alzheimer. În cadrul studiului, am prezentat în detaliu tehnica chirurgicală de implantare a dispozitivului, precum și modalitățile de recoltare de probe biologice după perioada de tratament.

Tehnica chirurgicală a avut o rată de succes de 100% (fără decese peri sau postchirurgicale). Ulterior, pe tot parcursul perioadei de tratament însumând 4 săptămâni, animalele au fost atent monitorizate, neexistând complicații locale sau generale majore.

Demonstrarea eficienței metodei de filtrare a LCR cu ajutorul dispozitivului experimental s-a făcut prin cuantificarea efectelor clinice și paraclinice. În ce privește latura clinică, am urmărit doi parametri, gradul de anxietate și memoria de scurtă durată, ambii parametri fiind în legătură strânsă cu deficitul cognitiv întâlnit în cadrul bolii Alzheimer. În cazul loturilor de șoareci APP/PS1 care au beneficiat de tratament cu soluție cu anticorpi, s-a observat o scădere a gradului general de anxietate și o ușoară ameliorare a deficitului de memorie de scurtă durată.

În ce privește datele paraclinice, obținerea de rezultate relevante s-a putut face doar în cazul probelor de țesut cerebral. După tratament, am observat o scădere (nesemnificativă statistic) în cazul concentrației A β de la nivel cerebral la șoarecii APP/PS1, fiind demonstrat echilibrul dinamic al A β între compartimentul central și compartimentul periferic și validitatea procedurii terapeutice.

Suplimentar, au fost recuperate cele cinci dispozitive de filtrare utilizate la șoarecii din lotul L2APP, de la care au fost preluate membranele nanoporoase pentru retestări. Pe baza rezultatelor analizei combinate SEM și EDS, s-au vizualizat acumulări importante de proteine care duc la reducerea dimensiunii porilor, colmatarea lor incompletă, în final diminuând eficacitatea de filtrare a nanomembranei. Acest grad ridicat de acumulare de materie organică (proteică) a fost suplimentar constatată și în cadrul analizei termice simultane (TG și DSC). Aceste rezultate arată în mod indirect funcționarea corectă și eficientă a dispozitivului de filtrare.

Concluzionând, tratamentul bazat pe eliminarea forțată de A β de la nivelul compartimentului LCR este o modalitate terapeutică viabilă, cu perspective promițătoare în tratamentul bolii Alzheimer. Pe baza rezultatelor din studiul prezent, durata de viață optimă a prototipului utilizat în cadrul acestei cercetări este de 4 săptămâni. Se impune astfel schimbarea nanomembranei (sau a întregului ansamblu dacă este posibil) după o lună de utilizare, în cazul în care se dorește în studii viitoare utilizarea dispozitivului pe termen mai lung.

Bibliografie selectivă

Alzheimer's Association. 2021 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* 2021;17(3):327-406. doi:10.1002/alz.12328

An N, Fu Y, Shi J, et al. Synergistic Effects of APOE and CLU May Increase the Risk of Alzheimer's Disease: Acceleration of Atrophy in the Volumes and Shapes of the Hippocampus and Amygdala. *J Alzheimers Dis.* 2021;80(3):1311-1327. doi:10.3233/JAD-201162

Avila J, Perry G. A Multilevel View of the Development of Alzheimer's Disease. *Neuroscience.* 2021;457:283-293. doi:10.1016/j.neuroscience.2020.11.015

Bakulski KM, Seo YA, Hickman RC, et al. Heavy Metals Exposure and Alzheimer's Disease and Related Dementias. *J Alzheimers Dis.* 2020;76(4):1215-1242. doi:10.3233/JAD-200282

Bell SM, Barnes K, De Marco M, Shaw PJ, Ferraiuolo L, Blackburn DJ, Venneri A, Mortiboys H. Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease: A Biomarker of the Future? *Biomedicines* 2021, 9, 63

Bello-Corral L, Sánchez-Valdeón L, Casado-Verdejo I, Seco-Calvo JÁ, Antonio Fernández-Fernández J, Nélida Fernández-Martínez M. The Influence of Nutrition in Alzheimer's Disease: Neuroinflammation and the Microbiome vs. Transmissible Prion. *Front Neurosci.* 2021;15:677777. doi:10.3389/fnins.2021.677777

Bodryzlova Y, Kim A, Michaud X, André C, Bélanger E, Moullec G. Social class and the risk of dementia: A systematic review and meta-analysis of the prospective longitudinal studies. *Scand J Public Health.* 2022;14034948221110019.

Fagiani F, Lanni C, Racchi M, Govoni S. (Dys)regulation of Synaptic Activity and Neurotransmitter Release by β -Amyloid: A Look Beyond Alzheimer's Disease Pathogenesis. *Front Mol Neurosci.* 2021;14:635880. doi:10.3389/fnmol.2021.635880

Fanutza T, Del Prete D, Ford MJ, Castillo PE, D'Adamio L. APP and APLP2 interact with the synaptic release machinery and facilitate transmitter release at hippocampal synapses. *Elife.* 2015;4:e09743. doi:10.7554/eLife.09743

Guidi J, Lucente M, Sonino N, Fava GA. Allostatic Load and Its Impact on Health: A Systematic Review. *Psychother Psychosom.* 2021;90(1):11-27. doi:10.1159/000510696

Hu CJ, Octave JN. Editorial: Risk Factors and Outcome Predicating Biomarker of Neurodegenerative Diseases. *Front Neurol.* 2019;10:45. doi:10.3389/fneur.2019.00045

Hussain B, Fang C, Chang J. Blood-Brain Barrier Breakdown: An Emerging

Biomarker of Cognitive Impairment in Normal Aging and Dementia. *Front Neurosci.* 2021;15:688090. doi:10.3389/fnins.2021.688090

Ionescu-Tucker A, Cotman CW. Emerging roles of oxidative stress in brain aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2021;107:86-95. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2021.07.014

Islam F, Shohag S, Akhter S, et al. Exposure of metal toxicity in Alzheimer's disease: An extensive review. *Front Pharmacol.* 2022;13:903099. doi:10.3389/fphar.2022.903099

Itzhaki RF. Overwhelming Evidence for a Major Role for Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV1) in Alzheimer's Disease (AD); Underwhelming Evidence against. *Vaccines (Basel).* 2021;9(6):679. doi:10.3390/vaccines9060679

Jellinger KA. Basic mechanisms of neurodegeneration: a critical update. *J Cell Mol Med.* 2010;14(3):457-487. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01010.x

Jung ES, Suh K, Han J, Kim H, Kang HS, Choi WS, Mook-Jung I. Amyloid- β activates NLRP3 inflammasomes by affecting microglial immunometabolism through the Syk-AMPK pathway. *Aging Cell.* 2022, 21, e13623

Lanni C, Masi M, Racchi M, Govoni S. Cancer and Alzheimer's disease inverse relationship: an age-associated diverging derailment of shared pathways. *Mol Psychiatry.* 2021;26(1):280-295. doi:10.1038/s41380-020-0760-2

Ma C, Zhang W, Cao M. Role of the Peripheral Nervous System in PD Pathology, Diagnosis, and Treatment. *Front Neurosci.* 2021;15:598457. doi:10.3389/fnins.2021.598457

Mielke MM, Aggarwal NT, Vila-Castelar C, et al. Consideration of sex and gender in Alzheimer's disease and related disorders from a global perspective. *Alzheimers Dement.* 2022;10.1002/alz.12662. doi:10.1002/alz.12662

Modgil S, Lahiri DK, Sharma VL, Anand A. Role of early life exposure and environment on neurodegeneration: implications on brain disorders. *Transl Neurodegener.* 2014;3:9. doi:10.1186/2047-9158-3-9

Patrick KL, Bell SL, Weindel CG, Watson RO. Exploring the "Multiple-Hit Hypothesis" of Neurodegenerative Disease: Bacterial Infection Comes Up to Bat. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9:138. doi:10.3389/fcimb.2019.00138

Plummer S, Van den Heuvel C, Thornton E, Corrigan F, Cappai R. The Neuroprotective Properties of the Amyloid Pre-cursor Protein Following Traumatic Brain Injury. *Aging Dis.* 2016, 7, 163–179

Ramos-Cejudo J, Wisniewski T, Marmar C, et al. Traumatic Brain Injury and

Alzheimer's Disease: The Cerebrovascular Link. *EBioMedicine*. 2018;28:21-30. doi:10.1016/j.ebiom.2018.01.021

Rosas-Hernandez H, Cuevas E, Raymick JB, Robinson BL, Sarkar S. Impaired Amyloid Beta Clearance and Brain Microvascular Dysfunction are Present in the Tg-SwDI Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Neuroscience*. 2020;440:48-55. doi:10.1016/j.neuroscience.2020.05.024

Ryu WI, Bormann MK, Shen M, Kim D, Forester B, Park Y, So J, Seo H, Sonntag KC, Cohen BM. Brain cells derived from Alzheimer's disease patients have multiple specific innate abnormalities in energy metabolism. *Mol. Psychiatry* 2021, 26, 5702–5714

Sciaccaluga M, Megaro A, Bellomo G, et al. An Unbalanced Synaptic Transmission: Cause or Consequence of the Amyloid Oligomers Neurotoxicity?. *Int J Mol Sci*. 2021;22(11):5991. doi:10.3390/ijms22115991

Sikora E, Bielak-Zmijewska A, Dudkowska M, et al. Cellular Senescence in Brain Aging. *Front Aging Neurosci*. 2021;13:646924. doi:10.3389/fnagi.2021.646924

Soscia SJ, Kirby JE, Washicosky KJ, et al. The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide. *PLoS One*. 2010;5(3):e9505. doi:10.1371/journal.pone.0009505

Taipa R, Pinho J, Melo-Pires M. Clinico-pathological correlations of the most common neurodegenerative dementias. *Front Neurol*. 2012;3:68. doi:10.3389/fneur.2012.00068

Tarasoff-Conway JM, Carare RO, Osorio RS, et al. Clearance systems in the brain-implications for Alzheimer disease [published correction appears in *Nat Rev Neurol*. 2016 Apr;12(4):248]. *Nat Rev Neurol*. 2015;11(8):457-470. doi:10.1038/nrneuro.2015.119

Valori CF, Possenti A, Brambilla L, Rossi D. Challenges and Opportunities of Targeting Astrocytes to Halt Neurodegenerative Disorders. *Cells*. 2021; 10(8):2019. <https://doi.org/10.3390/cells10082019>

Vojtechova I, Machacek T, Kristofikova Z, Stuchlik A, Petrasek T. Infectious origin of Alzheimer's disease: Amyloid beta as a component of brain antimicrobial immunity. *PLoS Pathog*. 2022;18(11):e1010929. doi:10.1371/journal.ppat.1010929

Wang H, Yang F, Zhang S, Xin R, Sun Y. Genetic and environmental factors in Alzheimer's and Parkinson's diseases and promising therapeutic intervention via fecal microbiota transplantation. *NPJ Parkinsons Dis*. 2021;7(1):70. doi:10.1038/s41531-021-00213-7

Wareham LK, Liddelw SA, Temple S, et al. Solving neurodegeneration: common

mechanisms and strategies for new treatments. *Mol Neurodegener.* 2022;17(1):23. doi:10.1186/s13024-022-00524-0

Xiao X, Liu H, Liu X, Zhang W, Zhang S, Jiao B. *APP, PSEN1, and PSEN2 Variants in Alzheimer's Disease: Systematic Re-evaluation According to ACMG Guidelines.* *Front Aging Neurosci.* 2021;13:695808. doi:10.3389/fnagi.2021.695808

Zang X, Chen S, Zhu J, Ma J, Zhai Y. The Emerging Role of Central and Peripheral Immune Systems in Neurodegenerative Diseases. *Front Aging Neurosci.* 2022;14:872134. doi:10.3389/fnagi.2022.872134

Zhu X, Lee HG, Perry G, Smith MA. Alzheimer disease, the two-hit hypothesis: an update. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1772(4):494-502. doi:10.1016/j.bbadis.2006.10.014

Lista cu lucrări publicate

Schreiner TG, Menéndez-González M, Popescu BO. The “Cerebrospinal Fluid Sink Therapeutic Strategy” in Alzheimer’s Disease—From Theory to Design of Applied Systems. *Biomedicines* 2022, 10, 1509. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071509> (Capitolul 5, paginile 38-43)

Schreiner TG, Popescu BO. Amyloid Beta Dynamics in Biological Fluids—Therapeutic Impact. *J. Clin. Med.* 2021, 10, 5986. <https://doi.org/10.3390/jcm10245986> (Capitolul 2, Subcapitolul 2.1. și Subcapitolul 2.4. paginile 18-22 și 31-34)

Schreiner TG, Schreiner OD, Adam M, Popescu BO. The Roles of the Amyloid Beta Monomers in Physiological and Pathological Conditions. *Biomedicines* 2023, 11, 1411. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11051411> (Capitolul 2, Subcapitolul 2.2 și Subcapitolul 2.3, paginile 23-30)

Schreiner TG, Tamba BI, Mihai CT, Lorinczi A, Baibarac M, Ciobanu RC, Popescu BO. Nanoporous Membranes for the Filtration of Proteins from Biological Fluids: Biocompatibility Tests on Cell Cultures and Suggested Applications for the Treatment of Alzheimer’s Disease. *J. Clin. Med.* 2022, 11, 5846. <https://doi.org/10.3390/jcm11195846> (Capitolul 6, paginile 43-66)