



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΣΤΙΣ ΝΕΥΡΟΕΠΙΣΤΗΜΕΣ**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Establishment of Cretan Brain Bank; first observations
and perspectives**

Ταβλαδωράκης Εμμανουήλ

Επιβλέπων: Ζαγανάς Ιωάννης, Επίκουρος Καθηγητής Νευρολογίας

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2022

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ζαγανάς Ιωάννης
Επίκουρος Καθηγητής Νευρολογίας

Αναστάσιος Κουτσόπουλος
Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής

Ιωάννης Χαραλαμπόπουλος
Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας

Βιογραφικό Σημείωμα

Εκπαίδευση:

-Πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών στις Νευροεπιστήμες, Πανεπιστήμιο Κρήτης (2019-2022)

-Πτυχίο Φαρμακευτικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Τμήμα Φαρμακευτικής (2013-2019)

Εργαστηριακή Εμπειρία:

-Προπτυχιακός φοιτητής στο εργαστήριο Νευροεκφυλιστικών νόσων του τμήματος Φαρμακευτικής ΑΠΘ, εργασία με τίτλο: Δημιουργία σταθερών διαγονιδιακών μικρογλοιακών κυτταρικών σειρών με απαλοιφή του γονιδίου της ADAR1 με χρήση Crisp/Cas9 (επιβλέπων: Θεόδωρος Σκλαβιάδης)

-Μεταπτυχιακός φοιτητής στο εργαστήριο Νευρολογίας του τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης, εργασία πάνω στη Βιοτρέπεζα Εγκεφάλων Κρήτης (επιβλέπων: Ιωάννης Ζαγανάς)

Περίληψη: Η άνοια, και ειδικότερα η νόσος Alzheimer, είναι η κύρια αιτία θνησιμότητας και νοσηρότητας παγκοσμίως και ο αντίκτυπός της αναμένεται να αυξηθεί με τη γήρανση του πληθυσμού σε πολλές χώρες. Ενώ η έρευνα σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως η AD, συνήθως εκτελείται σε κυτταροκαλλιέργειες και ζωικά μοντέλα, αυτά δεν επαρκούν για να αποσαφηνίσουν πλήρως την παθοφυσιολογία στο σύνολό της, παρά τη σημαντική συμβολή τους στην τρέχουσα κατανόησή μας για την AD και τις σχετικές άνοιες. Η μελέτη μεταθανάτιου εγκεφαλικού ιστού από ασθενείς που προσβλήθηκαν από AD και σχετικές άνοιες είναι ζωτικής σημασίας για την κατανόηση των μηχανισμών της νόσου. Σε αυτή τη μελέτη, περιγράφουμε την ίδρυση μιας τράπεζας εγκεφάλου (Cretan Brain Bank, CBB) που επικεντρώνεται στη ΝΑ και τις σχετικές άνοιες στην Κρήτη, Ελλάδα. Το CBB βασίζεται σε μια συνεχή συνεργασία μεταξύ του Πανεπιστημίου Κρήτης, της Ιατρικής Σχολής, της Πανελλήνιας Βιοτράπεζας Νευρολογικών Νοσημάτων (PAVINN) και του Συλλόγου ΑΔ Ηρακλείου («Αλληλεγγύη»). Στόχος μας είναι να προωθήσουμε την έρευνα για τον ανθρώπινο νευροεκφυλισμό χρησιμοποιώντας το CBB ως εργαλείο. Η μελέτη εγκρίθηκε από την Επιτροπή Δεοντολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου και όλα τα υποκείμενα και οι νόμιμοι εκπρόσωποί τους έδωσαν ενημερωμένη συγκατάθεση. Το ένα ημισφαίριο του ληφθέντος εγκεφάλου αποθηκεύεται σε φορμόλη και το άλλο κόβεται σε φέτες και αποθηκεύεται στους -80°C . Τομές εγκεφαλικού ιστού εμποτισμένες σε παραφίνη και μονιμοποιημένες σε φορμόλη χρησιμοποιούνται για ανοσοϊστοχημική (IHC) χρώση για το Αβ αμυλοειδές και την πρωτεΐνη pTau για νευροπαθολογική επικύρωση της κλινικής διάγνωσης, ενώ τα κατεψυγμένα ημισφαίρια χρησιμοποιούνται για υγρή βιολογία, συμπεριλαμβανομένων των Western-Blots και ενζυματικών μελετών. Μέχρι σήμερα, δέκα από τους δεκαπέντε εγκεφάλους έχουν χαρακτηριστεί ιστοπαθολογικά ως AD που χρησιμοποιούν IHC για το Αβ αμυλοειδές και την πρωτεΐνη pTau σε τομές από την περιοχή του ιππόκαμπου. Επίσης, ανοσοϊστοχημικές χρώσεις από διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση του σταδίου της νόσου. Αυτοί οι νευροπαθολογικά χαρακτηρισμένοι εγκέφαλοι θα παρέχουν μια σταθερή βάση για περαιτέρω έρευνα σχετικά με νευροεκφυλιστικές ασθένειες.

Λέξεις κλειδιά: Νόσος Alzheimer, άνοια, βιοτράπεζα εγκεφάλου, γλουταμική αφυδρογονάση, ανοσοϊστοχημικές χρώσεις

Abstract: Dementia, and Alzheimer's disease in particular, is a leading cause of mortality and morbidity worldwide, and its impact is expected to rise with the aging population in several countries. While research in neurodegenerative diseases, such as AD, is typically administered on cell cultures and animal models, these are not sufficient to fully elucidate the pathophysiology in its entirety, despite their significant contribution to our current understanding of AD and related dementias. The study of postmortem brain tissue from patients stricken by AD and related dementias is crucial for our understanding of disease mechanisms. In this study, we describe the establishment of a brain bank (Cretan Brain Bank; CBB) focused on AD and related dementias in Crete, Greece. CBB builds on an ongoing collaboration between the University of Crete, Medical School, Panhellenic Biobank of Neurological Diseases (PAVINN) and the AD Association of Heraklion ("Allelegye"). Our aim is to advance research on human neurodegeneration using the CBB as a tool. The study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital of Heraklion and all subjects and their legal representatives gave informed consent. One hemisphere of the obtained brain is stored in formalin and the other is coronally sliced and stored at -80°C. Formalin-fixed paraffin embedded brain tissue sections are used for immunohistochemical (IHC) staining for A β amyloid and pTau protein for neuropathological validation of clinical diagnosis, while frozen hemispheres are utilized for wet biology, including Western-Blots and enzymatic studies. To date, ten of fifteen brains have been histopathologically characterized as AD utilizing IHC for A β amyloid and pTau protein on sections from the hippocampal area. Also, immunohistochemical stains from different specific brain regions were employed for the evaluation of the disease stage. These neuropathologically characterized brains will provide a solid basis for further research on neurodegenerative diseases

Keywords: Alzheimer's Disease, Dementia, human tissue bank, brain bank, IHC, glutamate dehydrogenase

Συντομογραφίες

SN: substantia nigra

DG: Dentate gyrus

Occip: Occipital Lobe

mtg: middle temporal gyrus

APP: Amyloid precursor protein

NFT's: neurofibrillary tangles

LBD: Lewy body dementia

FTD: Frontotemporal Dementia

AD: Alzheimer's Disease

PD: Parkinson's Disease

GDH: Glutamate Dehydrogenase

TBE: Tris/Borate/EDTA Buffer

IHC: Immunohistochemistry

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Κεφάλαιο 1 – ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Νόσος Alzheimer.....	8
1.2 Λοιπές άνοιες.....	11
1.3 Γλουταμική αφυδρογονάση.....	15
1.4 Βιοτράπεζες.....	16

Κεφάλαιο 2 – Υπόθεση, Στόχος, Ειδικοί στόχοι	19
--	----

Κεφάλαιο 3 – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 Εξέταση υποψήφιων ασθενών για δωρεά εγκεφάλου / δειγματοληψία DNA, ορού και πλάσματος.....	20
3.2 Αφαίρεση εγκεφάλου, διατομή και μακροσκοπική εξέταση.....	20
3.3 Νευροπαθολογική εξέταση.....	22
3.4 Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις.....	23

Κεφάλαιο 4 – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	25
--------------------------------	----

Κεφάλαιο 5 – ΣΥΖΗΤΗΣΗ, ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ, ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ.....	32
--	----

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	34
-------------------	----

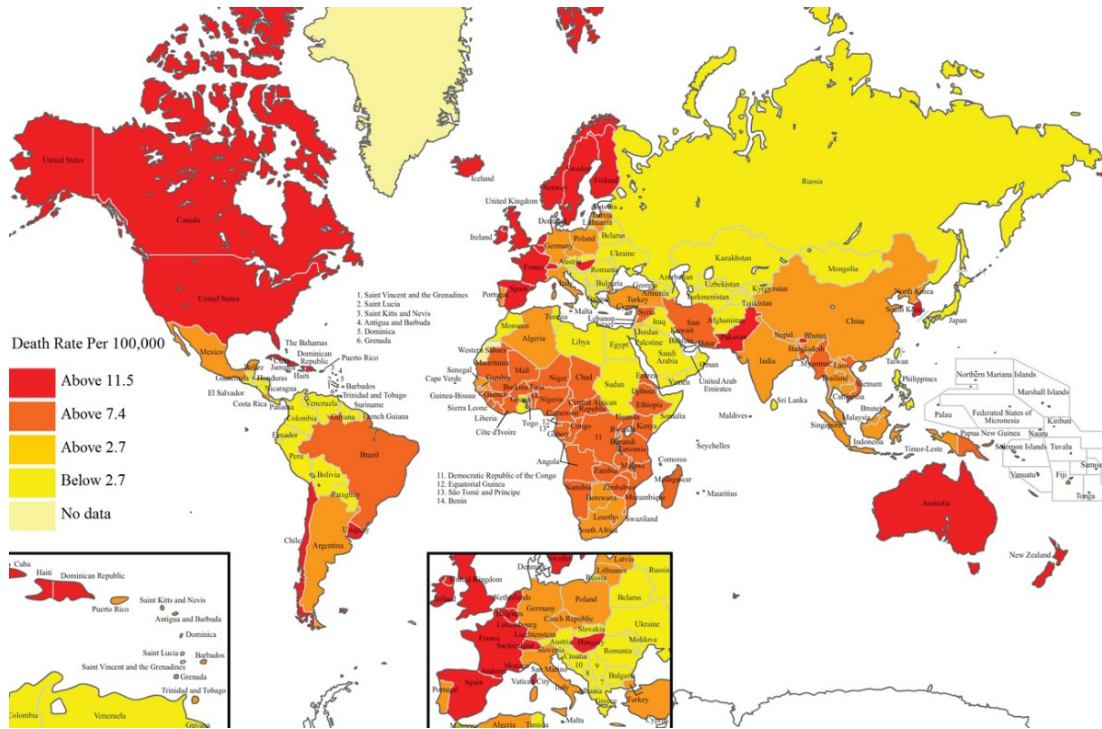
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

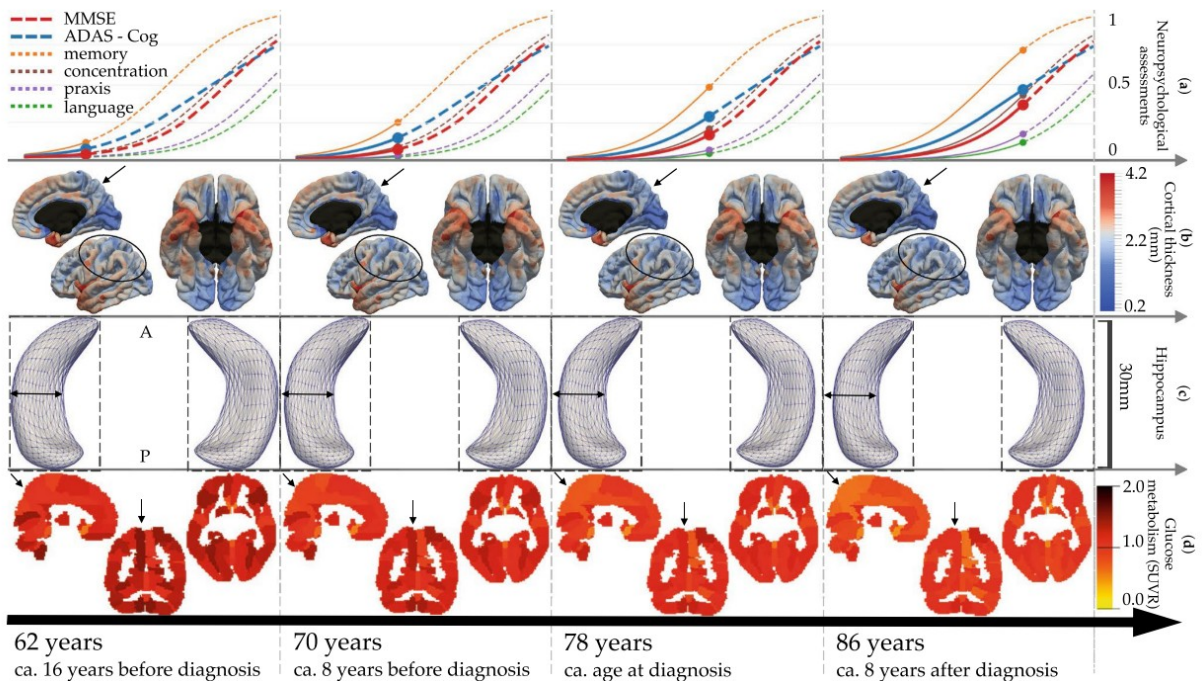
1.1 ΝΟΣΟΣ ALZHEIMER

Η νόσος Alzheimer αποτελεί την κυριότερη μορφή άνοιας (60-70 % των συνολικών περιπτώσεων άνοιας)¹ και εξελίσσεται γρήγορα σε ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα υγείας στις σημερινές κοινωνίες (**Εικόνα 1**).² Το 2012, ο επιπολασμός της άνοιας διεθνώς υπολογιζόταν γύρω στα 24 εκατομμύρια ανθρώπους με την εκτίμηση να διπλασιάζεται κάθε 20 χρόνια λόγω της διαρκώς αυξανόμενης γήρανσης του πληθυσμού.³ Παρόλα αυτά, με την ανάπτυξη των διαγνωστικών εργαλείων και της χρήσης βιοδεικτών, σήμερα, μόλις δέκα χρόνια αργότερα, έχουν ήδη ξεπεράσει τα 55 εκατομμύρια περιστατικά παγκοσμίως καθώς προκύπτουν νέες περιπτώσεις που παλαιότερα θα έμεναν αδιάγνωστες.⁴ Μάλιστα αναμένεται μέχρι το 2050 να έχει τριπλασιαστεί αυτός ο αριθμός, στα περίπου 140 εκατομμύρια περιστατικά ανά τον κόσμο.

Οι αλλαγές στον εγκέφαλο που σχετίζονται με τη νόσο ξεκινούν πριν εκδηλωθούν τα πρώτα συμπτώματα και αυτή η περίοδος αντιστοιχεί στο προκλινικό στάδιο της νόσου. Μία αδρή σταδιοποίηση αφορά τα εξής στάδια: το πρώιμο (ήπια συμπτώματα της νόσου), το μέσο στάδιο (πιο σοβαρά συμπτώματα) και το τελικό στάδιο (πολύ σοβαρά συμπτώματα της νόσου). Από τη σταδιακή απώλεια μνήμης και έκπτωση των βασικών γνωστικών λειτουργιών, προχωρά στην ελάττωση της λεκτικής και γραπτής ικανότητας, με εμφάνιση επιθετικότητας ή και ψευδαισθήσεων/παράνοιας σε ορισμένες περιπτώσεις, ώσπου στο τελικό στάδιο το άτομο παρουσιάζει δυσκολία σίτισης, ακράτεια, και πλήρη απώλεια λεκτικής ικανότητας και γνωστικών λειτουργιών.



Εικόνα 1: Παγκόσμιος χάρτης που απεικονίζει την παγκόσμια κατανομή των θανάτων που προκαλούνται από τη νόσο Alzheimer και λοιπές άνοιες χρησιμοποιώντας δεδομένα του ΠΟΥ από το 2011.⁵



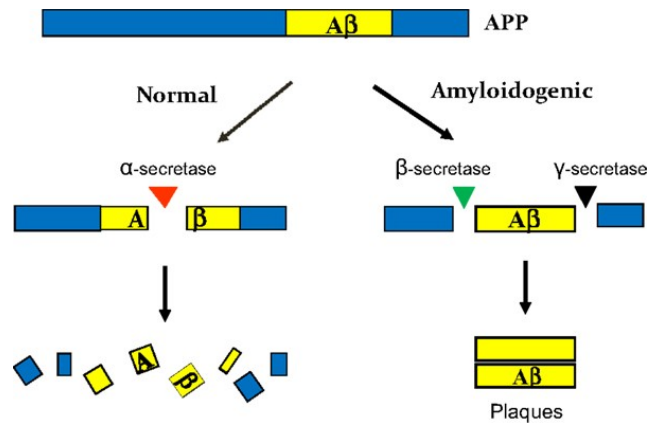
Εικόνα 2: Κανονιστικά μοντέλα εξέλιξης της νόσου Alzheimer που εμφανίζονται στην τέταρτη ηλικία με εκτιμώμενο χρόνο έως/από τη διάγνωση. Από κάτω προς τα πάνω οι σειρές δείχνουν αλλοίωση του μεταβολισμού της γλυκόζης στον εγκέφαλο, ατροφία του ιππόκαμπου, λεπύτωση του φλοιού και έναρξη γνωστικής έκπτωσης⁶

Οι κύριες κατηγορίες της νόσου είναι η σποραδική μορφή όψιμης έναρξης που αποτελεί ~75% των περιπτώσεων, η οικογενής όψιμης έναρξης, η οικογενής πρόωμης έναρξης, η σχετιζόμενη με σύνδρομο Down, και σχετιζόμενη με άλλες νευροεκφυλιστικές νόσους. Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις, παρατηρούνται ιστοπαθολογικά τα εξής χαρακτηριστικά στον εγκέφαλο: ατροφία του εγκεφάλου, διεύρυνση κοιλιών, μικρογλοΐωση και αστροκυττάρωση, ενώ τα κύρια παθολογικά σημεία της νόσου είναι οι πλάκες β-αμυλοειδούς και τα τολύπια (tangles) υπερφωσφορυλιωμένης tau πρωτεΐνης.^{7,8} Έχουν προταθεί πολλές υποθέσεις για την αιτιολογία της νόσου, που αν και φαίνεται πολυπαραγοντική, δύο είναι οι κυρίαρχες υποθέσεις.

α) Υπόθεση αμυλοειδούς:

Ο διαταραγμένος μεταβολισμός του Αβ αμυλοειδούς θεωρείται ότι αποτελεί τη κεντρική αιτία για την παθολογία της νόσου και ότι η ανώμαλη συσσώρευση πεπτιδίων Αβ προκαλεί την πολύπλοκη παθολογική διαδικασία που ακολουθεί. Τα Αβ πεπτιδία παράγονται κατά τη διάσπαση της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης APP (Amyloid precursor protein). Η απελευθέρωση των Αβ πεπτιδίων από τις μεμβράνες επιτυγχάνεται μέσω της διαδοχικής δράσης της β- και γ-σεκρετάσης. Έτσι, δημιουργούνται θραύσματα Αβ διαφόρων μηκών, με τυπικά μεγέθη 40 και 42 αμινοξέων. Το μεγαλύτερο πεπτιδίο, Αβ42 είναι περισσότερο νευροτοξικό και πιο επιρρεπές σε συσσωμάτωση. Η καταλυτική δράση της γ-σεκρετάσης είναι υπεύθυνη για την απελευθέρωση του αμυλοειδογενούς πεπτιδίου και του θραύσματος ΑICD. Έτσι, δημιουργούνται οι αμυλοειδικές πλάκες, οι οποίες είναι στην ουσία εστίες εναπόθεσης του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου.⁹ Αυτές, διαχωρίζονται σε διάχυτες (που δεν συνοδεύονται συνήθως από νευροανοσοαντιδραστικές διεργασίες όπως μικρογλοΐωση και αστροκύττωση στη τριγύρω περιοχή) και συμπαγείς/πυκνού-πυρήνα (που περιτριγυρίζονται από δυστροφικούς νευρίτες, ενεργοποιημένη μικρογλοΐα και αντιδραστικά αστροκύτταρα).¹⁰ Καθώς η επεξεργασία του APP από τη β-σεκρετάση λαμβάνει χώρα και σε υγιείς ανθρώπους, υπάρχει η υπόθεση πως η κύρια αιτιολογία της νόσου είναι η μεταβολή της αναλογίας του μεταβολισμού του APP από α- (που μεταβολίζεται φυσιολογικά προς το διαλυτό και μη νευροτοξικό Αβ) προς β-σεκρετάση.¹¹

Στην υπόθεση αμυλοειδούς βασίζεται η πληθώρα των διαγονιδιακών πειραματικών μοντέλων που χρησιμοποιούνται στην έρευνα για τη νόσο, συνήθως με μεταλλάξεις στα γονίδια του APP και των πρεσενιλινών που υπό φυσιολογικές συνθήκες μπλοκάρουν τη δράση της γ-σεκρετάσης.



Εικόνα 3: (Ming Chen, *The maze of APP processing in Alzheimer's disease: where did we go wrong in reasoning?* *Front. Cell. Neurosci.*, 28 May 2015)

β)Υπόθεση tau παθολογίας:

Η πρωτεΐνη tau φυσιολογικά κατέχει ρόλο συναρμολόγησης και σταθεροποίησης των μικροσωληνίσκων του κυτταροσκελετού. Όταν υπόκειται σε μη-φυσιολογική ή υπερ- φωσφορυλίωση και αλλάζουν οι θέσεις αναγνώρισης /πρόσδεσης με τη τουμπουλίνη, συμπλοκοποιούνται και με τη φυσιολογική tau λόγω συνάφειας (εξάπλωση κατά-prion / prion like propagation) με αποτέλεσμα τη δημιουργία ελικοειδών νηματίων (paired helical filaments, PHF's). Τα νημάτια (ινίδια) αυτά με τη σειρά τους οδηγούν στη δημιουργία των νευροινδιακών τολυπίων (neurofibrillary tangles, NFT's) οδηγώντας εν τέλει στο κυτταρικό θάνατο των νευρώνων.¹² Η υπόθεση της tau παθολογίας στηρίζεται από το εύρημα πως αυτά τα τολύπια εμφανίζονται μέχρι και δέκα χρόνια νωρίτερα από την αμυλοειδή παθολογία.¹³ Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή, επιλεγμένοι και εκτενώς διασυνδεδεμένοι γλουταμινεργικοί νευρώνες με μοναδικά μοριακά χαρακτηριστικά που τους καθιστούν ιδιαίτερα ευάλωτους σε ανώμαλη φωσφορυλίωση της tau. Αυτή, μπορεί με τη σειρά της να επιταχύνει τη διάσπαση του APP προς Aβ αμυλοειδές, ενώ παράλληλα μια σειρά πρόσθετων παραγόντων όπως δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) παραγώμενες από οξειδωτικό στρες επηρεάζουν την ταχύτητα αυτών των διεργασιών.¹⁴

Τέλος, αν και υπάρχουν πολλές ακόμα υποθέσεις για την αιτιολογία της νόσου, είναι σημαντικό να γίνει αναφορά και στην γλουταμινεργική υπόθεση, που έχει υποστηριχτεί για τη παθογένεια της νόσου και έρχεται σε συνύφανση με την υπόθεση της tau παθολογίας. Η γλουταμινεργική νευροδιαβίβαση μεταβάλλεται σοβαρά στις γλουταμινεργικές προβολές στο πάσχοντα από Alzheimer εγκέφαλο.¹⁵ Διαταραχές των επιπέδων γλουταμίνης και γλουταμικού στην Alzheimer έχουν αναφερθεί,¹⁶ ωστόσο, τα πρωταρχικά αίτια αυτών των διαταραχών δεν είναι ξεκάθαρα. Τα επίπεδα του γλουταμικού

εξαρτώνται από την ισορροπία μεταξύ των διεργασιών επεξεργασίας του όπως σύλληψη/μεταφορά και παραγωγή/μετατροπή.¹⁵

1.2 ΛΟΙΠΕΣ ΑΝΟΙΕΣ

Δεν είναι όμως η νόσος Alzheimer η μοναδική αιτία άνοιας. Εν γένει, η άνοια αναφέρεται σε ένα κλινικό σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από προοδευτική γνωστική έκπτωση παρεμβαλλόμενη στην ικανότητα των ατόμων να λειτουργούν αυτόνομα. Τα συμπτώματα της νευροεκφυλιστικού-τύπου άνοιας είναι σταδιακά, επίμονα και προοδευτικά, ενώ τα άτομα που πάσχουν από άνοια βιώνουν αλλαγές στη γνωστική λειτουργία, τη συμπεριφορά και τη λειτουργικότητα. Η κλινική εικόνα της άνοιας ποικίλλει μεταξύ των πασχόντων και τα γνωστικά ελλείμματα που προκαλεί μπορεί να εμφανιστούν ως απώλεια μνήμης, διαταραχές επικοινωνίας και γλώσσας, αγνωσία (αδυναμία αναγνώρισης αντικειμένων), απραξία (αδυναμία εκτέλεσης εργασιών που είχαν μάθει προηγουμένως) και μειωμένη εκτελεστική λειτουργία. Η γνωστική έκπτωση προέρχεται από τραυματισμό του εγκεφαλικού φλοιού που οφείλεται σε συναπτική ανεπάρκεια, φλεγμονή ή και αλλαγή στον εγκεφαλικό μεταβολισμό. Έτσι, σε αυτό το κλινικό φάσμα εντάσσονται και άλλες τρεις κύριες μορφές άνοιας, διαφορετικής παθολογίας.¹⁷

A. Αγγειακή άνοια

Η αγγειακή άνοια είναι η δεύτερη πιο διαδεδομένη μορφή άνοιας (~15% του συνόλου των ανοιών)¹⁸ και ονομάζεται επίσης πολυεμφραγματική άνοια, η οποία προκύπτει από τη νευρωνική στέρηση οξυγόνου που προκαλείται από καταστάσεις που είτε εμποδίζουν είτε μειώνουν τη ροή του αίματος στον εγκέφαλο. Το ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο είναι η πιο κοινή αιτία αγγειακής άνοιας και τα συμπτώματά μπορεί να ποικίλλουν ευρέως, ανάλογα με τις πληγείσες περιοχές του εγκεφάλου και τη σοβαρότητα της βλάβης των αιμοφόρων αγγείων. Μετά από ένα σοβαρό εγκεφαλικό επεισόδιο, τα πιο εμφανή συμπτώματα περιλαμβάνουν σύγχυση, αποπροσανατολισμό, δυσκολία στην ομιλία και στη κατανόηση της ομιλίας καθώς και απώλεια όρασης. Η μνήμη μπορεί να μην επηρεάζεται άμεσα στην

αγγειακή άνοια, αλλά μια ξαφνική αλλαγή στην εκτελεστική λειτουργία (π.χ. σκέψη, συλλογισμός) μπορεί να εμφανιστεί μετά από ένα εγκεφαλικό. Αντίθετα, πολλαπλά μικρά εγκεφαλικά επεισόδια οδηγούν σε πιο σταδιακή μείωση της εκτελεστικής λειτουργίας καθώς οι ζημιές συσσωρεύονται.

B. Άνοια με σωμάτια Lewy (Lewy body dementia, LBD)

Αποτελεί τη τρίτη πιο κοινή μορφή άνοιας (5-10%) και οφείλεται στο σχηματισμό εγκλειστων ασνουκλεΐνης, τα λεγόμενα σωμάτια Lewy, εντός των νευρικών κυττάρων.¹⁹

Οι μεταθανάτιες εξετάσεις έχουν αποκαλύψει ότι η LBD επηρεάζει τη μέλαινα ουσία, τη ραχιαία ραφή, τον υπομέλανα τόπο και τον ραχιαίο κινητικό πυρήνα του πνευμονογαστρικού νεύρου.²⁰

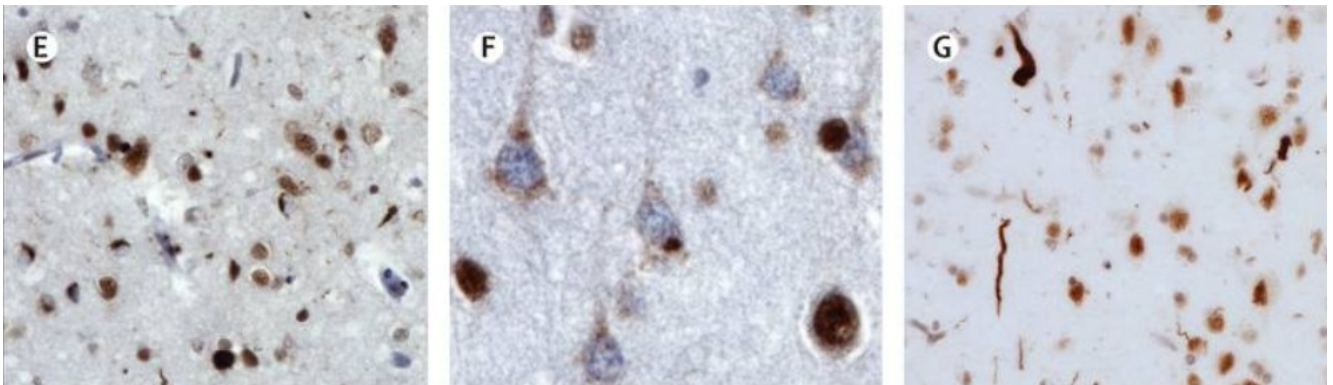
Γενετικές μεταλλάξεις, περιβαλλοντικές τοξίνες και η διαδικασία γήρανσης μπορεί να οδηγήσουν σε λανθασμένη αναδίπλωση της άλφα-σνουκλεΐνης και στη συσσώρευσή της με τη μορφή σωμάτων Lewy, μέσω οξειδωτικού στρες και μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας.²⁰ Κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου περιλαμβάνουν: προοδευτική έκπτωση στους γνωστικούς τομείς της προσοχής, στις εκτελεστικές και οπτικοχωρικές ικανότητες, εναλλαγές στην προσοχή και τη γνωστική εγρήγορση, οπτικές ψευδαισθήσεις, εμμονικές συμπεριφορές, παρκινονισμός, διαταραχή της REM φάσης του ύπνου.^{17,19} Αξίζει να αναφερθεί πως μεγάλο αναλογικά κομμάτι των ασθενών με Πάρκινσον καταλήγουν να εμφανίζουν άνοια.

Διαφορική διάγνωση με PD: Στην LBD, η άνοια αναπτύσσεται πριν ή εντός 1 έτους από τον αυθόρμητο παρκινονισμό ενώ στην άνοια της νόσου του Πάρκινσον, η άνοια αναπτύσσεται στο πλαίσιο της εγκατεστημένης νόσου του Πάρκινσον. Ακόμα, συγκριτικά με την AD, οι φροντιστές ασθενών με LBD μπορεί να παρατηρήσουν λήθαργο, ημερήσια υπνηλία και παρατεταμένες περιόδους κοιτάζοντας στο κενό¹⁷

Γ. Μετωποκροταφική άνοια

Η μετωποκροταφική άνοια είναι ένας γενικός κλινικός όρος που περιλαμβάνει μια ομάδα νευροεκφυλιστικών ασθενειών που χαρακτηρίζονται από προοδευτικά ελλείμματα στη συμπεριφορά, την εκτελεστική λειτουργία ή το λόγο.²¹ Ξεχωρίζουν κυρίως τρεις κλινικοί υπότυποι: α) συμπεριφορική/ μετωπιαία παραλλαγή της FTD (behavioural-variant FTD, bv-FTD), η οποία σχετίζεται με πρώιμα ελλείμματα συμπεριφοράς και εκτελεστικής ικανότητας, β) πρωτοπαθείς προϊούσες αφασίες, με προοδευτικά ελλείμματα στην ομιλία, τη γραμματική και την παραγωγή λέξεων καθώς και η σημασιολογική παραλλαγή η οποία είναι μια προοδευτική διαταραχή της σημασιολογικής ικανότητας και ονοματοδοσίας καθώς και γ) με συνύπαρξη κινητικών διαταραχών. Αν και περικλείονται πολλές μορφές υπό την ετερογενή ομπρέλα της FTD, οι πρωτεϊνικές εναποθέσεις που ανευρίσκονται είναι είτε tau, είτε FUS, είτε TDP-43. Η τελευταία, TDP-43, ευθύνεται για

τουλάχιστον 50% των περιπτώσεων FTD²¹ και η εναπόθεση της ακολουθεί τρία κύρια μοτίβα τα οποία καθορίζουν και τους υποτύπους (**Εικόνα 4**). Τέλος, υπάρχει συχνά επικάλυψη των συμπτωμάτων μεταξύ της νόσου Alzheimer και της μετωποκροταφικής άνοιας δυσκολεύοντας τη κλινική διάγνωση. Η παθολογία Alzheimer θα μπορούσε να υποδηλωθεί από την κυριαρχία των μνημονικών και των οπτικοχωρικών ελλειμμάτων, της κοινωνικής καταλληλότητας, της φυσιολογικής νευρολογικής εξέτασης και των ενδείξεων γενικευμένης ατροφίας του εγκεφάλου. Παρόλα αυτά, αν και η FTD εμφανίζεται σε μικρότερες ηλικίες (45-64 έτη) σε σχέση με την Alzheimer(>64), υπάρχει συχνά μείξη των δύο παθολογιών ιδίως στα όψιμα στάδια της νόσου Alzheimer., με την TDP-43 να παρουσιάζει ξεχωριστό προφίλ εναπόθεσης.^{22,23}



Εικόνα 4: (E) μικρά συμπαγή ή σχήματος μισοσφύγγαρου κυτταροπλασματικά εγκλείσματα TDP-43 νευρώνων και κοντά θραύσματα, σαν νήματα νευροπίλης σε FTLD-TDP43 τύπου A. (F) διάχτυτα ή κοκκώδη κυτταροπλασματικά νευρωνικά εγκλείσματα (με σχετική έλλειψη νημάτων νευροπίλης) σε FTLD-TDP τύπου B. και (G) μακροί, ελικοειδείς δυστροφικοί νευρίτες σε FTLD-TDP τύπου C.²¹

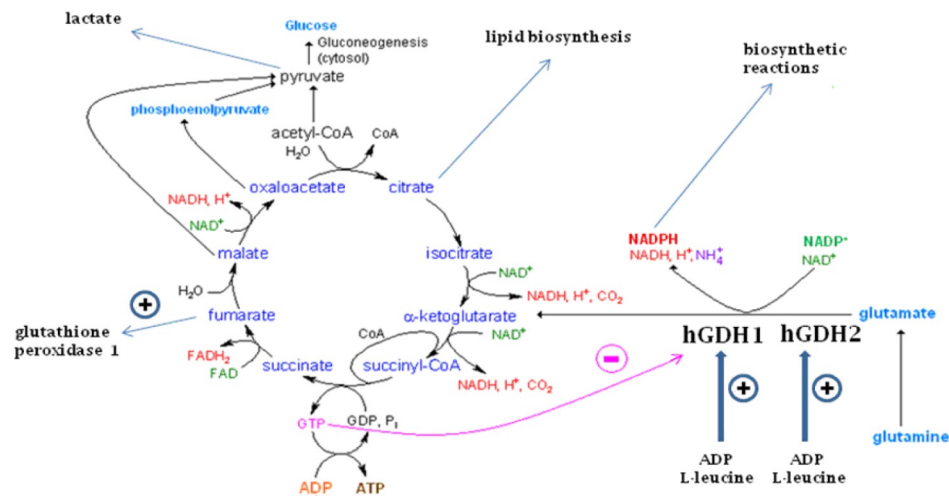
1.3 ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΗ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗ

Η αφυδρογονάση του γλουταμικού (glutamate dehydrogenase, GDH) είναι ένα αλλοστερικά ρυθμιζόμενο ένζυμο που κατέχει κεντρικό ρόλο στον μεταβολισμό του γλουταμικού οξέως και συμβάλλει σε σημαντικές κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένων των αναπληρωτικών μηχανισμών του κύκλου του Krebs, στη παραγωγή ενέργειας και στην ομοίωση της αμμωνίας.²⁴ Καταλύει την αναστρέψιμη αλληλομετατροπή του γλουταμικού σε α-κετογλουταρικό και αμμωνία χρησιμοποιώντας NADP(H) και NAD(H) ως συνένζυμα. (Εικόνα)

Η δραστηριότητα της GDH πρέπει να ελέγχεται αυστηρά γιατί βρίσκεται στο σταυροδρόμι κρίσιμων μονοπατιών. Έτσι, το ένζυμο έχει έναν μηχανισμό ανίχνευσης ενέργειας που επιτρέπει, ως απόκριση στα χαμηλά επίπεδα ενέργειας, στο γλουταμικό να τροφοδοτεί τον κύκλο του Krebs.²⁴

Στον άνθρωπο και στα ανώτερα πρωτεύοντα, προέκυψε παράλληλα με την διεύρυνση του εγκεφάλου η GDH2, ένα ισόενζυμο που υπέστη ταχεία εξελικτική προσαρμογή, αποκτώντας μοναδικές καταλυτικές και ρυθμιστικές ιδιότητες που επέτρεψαν τη λειτουργία του υπό συνθήκες ανασταλτικές για τον πρόγονό του GDH1, ενώ μόλις πρόσφατα επιτεύχθηκε η κρυσταλλογραφία της επιδεικνύοντας τις εξελικτικές δομικές αλλαγές από την GDH1.²⁵ Εν γένει, οι πρωτεΐνες GDH1 και GDH2 (που κωδικοποιούνται από τα γονίδια GLUD1 και GLUD2 αντίστοιχα) κατανέμονται σε περιοχές υψηλής δραστηριότητας γλουταμινεργικών νευροδιαβιβαστών στον εγκέφαλο²⁶ και ενώ η GDH1 έχει σταθερή έκφραση ως γονίδιο αναφοράς, το μετάγραφο της GDH2 φαίνεται να απαντάται κυρίως στον αμφιβληστροειδή, στον εγκέφαλο και στους όρχεις.²⁷ Στον εγκέφαλο φαίνεται να εντοπίζεται ως επί το πλείστον στα αστροκύτταρα, αν και έχει αποδειχτεί η δράση της και στους νευρώνες.²⁸

Το 1997, ο Cavallaro με τους συνεργάτες του έδειξε πως η έκφραση της GDH1 σε περιοχές του ιπποκάμπου (CA1, CA3, DG) είναι στενά σχετιζόμενη με τη μνημονική λειτουργία καθώς υπάρχει θετική συσχέτιση με την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη μνήμη. Αυτό μπορεί να αντανακλά έναν αυξημένο κύκλο εργασιών του διεγερτικού νευροδιαβιβαστή γλουταμικού, ο οποίος εμπλέκεται στη μάθηση και τη μνήμη.²⁹ Ακόμη, όταν υπερεκφράζεται σε μοντέλα μυών, με τα επομένως αυξημένα επίπεδα γλουταμικού, παρατηρείται μειωμένος αριθμός δενδριτικών ακάνθων και συναπτικών απολήξεων στην CA1 καθώς και νευρωνική απώλεια σχετιζόμενη με τη γήρανση (age-related memory loss).³⁰ Ακόμα, σε τριπλό μοντέλο μυός για τη νόσο Alzheimer, έχουν παρατηρηθεί διαταραγμένοι ομοιοστατικοί μηχανισμοί γλουταμικού,³¹ ενώ στο προμετωπιαίο φλοιό ασθενών με Alzheimer έχουν εντοπιστεί αυξημένα επίπεδα γλουταμικής αφυδρογονάσης.¹⁵



Εικόνα 5: Η οξειδωτική απαμίνωση του γλουταμικού από τις GDH1 και GDH2 δημιουργεί α-κετογλουταρικό, αμμωνία και NADH ή NADPH. Ενώ το α-κετογλουταρικό μεταβολίζεται από τον κύκλο του Krebs, το NADPH μπορεί να χρησιμοποιηθεί για βιοσυνθετικές αντιδράσεις. Το GTP αναστέλλει δυναμικά την hGDH1, αποτρέποντας έτσι, υπό επαρκές ενεργειακά επίπεδα, το γλουταμινικό από το να τροφοδοτεί αυτόν τον κύκλο. Από την άλλη πλευρά, η λειτουργία της hGDH2 είναι ανεξάρτητη από τον έλεγχο GTP και ως εκ τούτου επιτρέπει τη ροή γλουταμικού υπό συνθήκες ανασταλτικές για την hGDH1. Και τα δύο ένζυμα ενεργοποιούνται από την ADP και την L-λευκίνη. Ο οξειδωτικός μεταβολισμός του α-κετογλουταρικού μέσω του κύκλου Krebs δημιουργεί κεντρικό άλας που μπορεί να υποστηρίξει τη βιοσύνθεση των λιπιδίων που απαιτούνται για την ανάπτυξη του νευρικού ιστού και/ή την ανάπτυξη των κυττάρων του γλοιώματος.³²

1.4 ΒΙΟΤΡΑΠΕΖΕΣ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ

Ο εγκέφαλος αποτελεί το πλέον πολύπλοκο όργανο στο ανθρώπινο σώμα, και η τρέχουσα κατανόησή μας των φυσιολογικών του λειτουργιών καθώς και των παθολογικών αιτιών παραμένει περιορισμένη. Παρά τη σημαντική τους συμβολή στην έως τώρα υπάρχουσα γνώση, αναπαριστώντας πτυχές του ανθρώπινου νου, τα πειραματικά μοντέλα (κυτταρικές σειρές και εργαστηριακά ζώα) δεν επαρκούν για τη πλήρη αποσαφήνιση ολόκληρου του φάσματος των υποκείμενων μηχανισμών που αφορούν τόσο τον εν υγία, όσο και εν παθολογία εγκέφαλο.

Όσον αφορά τη νόσο του Alzheimer(AD), τα ζωικά μοντέλα αντιπροσωπεύουν τη συντριπτική πλειοψηφία των πειραματικών μοντέλων, και απαρτίζονται σχεδόν αποκλειστικά από διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν μεταλλαγμένα γονίδια οδηγώντας στο σχηματισμό αμυλοειδών πλακών ή νευροινιδιακών τολυπίων. Τούτο μπορεί να εξηγήσει μέρος του σχετικά υψηλού ποσοστού αποτυχίας των θεραπευτικών κλινικών δοκιμών AD· η μη-ώριμη δηλαδή προέκταση στον ανθρώπινο οργανισμό, της αποτελεσματικής μείωσης της παθολογίας που μπορεί να παρατηρείται στα πειραματικά

μοντέλα³⁴. Για παράδειγμα, το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο ζωικό μοντέλο στην έρευνα για τη νόσο Alzheimer, το μοντέλο μυός 5xFAD, δεν επιδεικνύει καθόλου πτυχές της tau παθολογίας, ένα από τα δύο κύρια παθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου³⁵. Ως εκτούτου, θα πρέπει να διεξάγονται μελέτες με χρήση ανθρώπινου ιστού, εάν αυτό είναι δυνατόν³⁶

Για την άρση του φραγμού της διαθεσιμότητας ιστού ως προς την έρευνα για τον ανθρώπινο εγκέφαλο, οι βιοτράπεζες εγκεφαλικού ιστού αποτελούν πλέον ένας ταχέως αναπτυσσόμενο τομέα.³⁷ Όλα ξεκίνησαν γύρω στον 5ο αιώνα π.Χ., όταν η έννοια του εγκεφαλοκεντρισμού εισήχθη από τον Αλκμαίωνα τον Κροτωνιάτη (520-450 π.Χ.). Τον 3ο αιώνα π.Χ., ξεκίνησαν στην Αλεξάνδρεια οι πρώτες συστηματικές ανατομές ανθρώπινου ιστού ενώ ο Ερασίστρατος (304-250 π.Χ.) και ο Ηρόφιλος ο Χαλκηδόνιος (330-260 π.Χ.) έκαναν ανθρώπινες τομές και ζωοτομές ξεχωρίζοντας νεύρα από τένοντες και αιμοφόρα αγγεία, τα κινητικά νεύρα από τα αισθητήρια νεύρα, τα κρανιακά νεύρα από τα νωτιαία νεύρα και τον εγκέφαλο από την παρεγκεφαλίδα.^{38 39}

Στη συνέχεια, γύρω στον 16ο αιώνα, όταν βελτιώθηκαν οι τεχνικές διατήρησης των μαλακών ιστών (π.χ. ανθρώπινος εγκέφαλος), δημιουργήθηκαν τα πρώτα αρχεία εγκεφάλου, τα οποία αργότερα μετατράπηκαν σε σύγχρονες τράπεζες εγκεφάλου, συλλέγοντας και αποθηκεύοντας ενεργά και στρατηγικά τόσο ασθενείς όσο και υγιείς εγκεφάλους και διανέμοντας τους στην επιστημονική κοινότητα. Λόγω των προόδων σε γνώση και τεχνικές, πολλές περισσότερες ερωτήσεις μπορούν τώρα να απαντηθούν χρησιμοποιώντας σωστά συντηρημένους ανθρώπινους εγκεφαλικούς ιστούς.⁴⁰ Επιπλέον, το διαγνωστικό εργαλείο που συνηθίζεται για την αξιολόγηση της γνωστικής έκπτωσης σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες βασίζεται σε καθιερωμένα κλινικά κριτήρια. Η κλινική διάγνωση της AD βασίζεται επί του παρόντος στη γνωστική έκπτωση και ενίοτε ένα θετικό αποτέλεσμα σε προσδιορισμούς βιοδεικτών, όπως αμυλοειδές και tau PET-Scan ή τα επιπεδα τους στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό· αντανάκλαση των νευροπαθολογικών αλλαγών που παρατηρούνται στη νόσο Alzheimer.^{41,42}

Ωστόσο, η μεταθανάτια νευροπαθολογική εντόπιση τόσο των αμυλοειδών πλακών όσο και των νευροϊνιδιακών τολυπίων tau εξακολουθεί να απαιτείται για την οριστική διάγνωση της νόσου, καθώς είναι καλά τεκμηριωμένο ότι υπάρχει μόνο μια μέτρια σχέση μεταξύ ορισμένων κλινικών διαγνώσεων και επακόλουθων νευροπαθολογικών διαγνώσεων.⁴³ Επομένως, τα κλινικά κριτήρια δεν θα πρέπει να θεωρούνται ως το απόλυτο εργαλείο για την οριστική διάγνωση νευροεκφυλιστικών νόσων, καθώς αυτές χαρακτηρίζονται από ένα σύνολο νευροπαθολογικών χαρακτηριστικών, με έντονες αλληλεπικαλυπτόμενες παθολογίες. Αμυλοειδείς εναποθέσεις στη νόσο Πάρκινσον, σωμάτια Lewy ασυνουκλεΐνης στη νόσο Alzheimer, ή tau παθολογία ως η πρωταρχική συνθήκη σε μετωποκροταφική άνοια με παρκισονισμό.³⁷ Γι αυτούς τους λόγους, πολλοί χρησιμοποιούν τους όρους

“συνουκλειϊνοπάθειες” ή “ταουοπάθειες” για να προσδιοριστεί το εύρος των αλληλεπικαλυπτόμενων κλινικών διαταραχών, όπου αυτές οι παθογόνες οντότητες παίζουν βασικό ρόλο.

Εν συντομία, η εργασία με υλικό βιοτράπεζας εγκεφάλου, είτε εγκεφαλικός ιστός είτε πλάσμα και ορός, επιτρέπει στους ερευνητές να εξετάσουν τη λειτουργία, την ανάπτυξη και την εξέλιξη του εγκεφάλου σε υγιείς και παθολογικές συνθήκες, με τις συγκεκριμένες ιδιαιτερότητες που εντοπίζονται μονάχα σε ανθρώπους, καθώς και να προχωρήσουν οι μελέτες βιοδεικτών με προ-θανάτιο υλικό συνοδευόμενο με μεταθανάτια επαλήθευση.^{44,45}

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Στόχοι - Υπόθεση

Υπό αυτούς τους όρους, επιδιώξαμε την ίδρυση της Βιοτράπεζας Εγκεφαλικού Ιστού Κρήτης [Cretan Brain Bank (CBB)]. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η έρευνα για τον ανθρώπινο εγκέφαλο είναι καλό να έχει βάση στον ίδιο τον ανθρώπινο εγκέφαλο, με τις δικές του ιδιαιτερότητες. Έτσι, ως κύριος στόχος της βιοτράπεζας είναι να διευκολύνει και να προωθήσει την έρευνα που διεξάγεται για τις νόσους του εγκεφάλου.

Παράλληλα, ως ειδικοί στόχοι τις παρούσας μελέτης είναι να ερευνηθεί ο συνεντοπισμός κυτταρικών πληθυσμών όπως μικρογλοία και αστροκύτταρα, καθώς και πρωτεϊνών ενδιαφέροντος όπως TDP-43 και GDH2, με τις πλάκες β-αμυλοειδούς και τα τολύπια tau. Ακόμα, μετά από μελέτες του εργαστηρίου που υποστηρίζουν το νευροπροστατευτικό ρόλο συγκεκριμένου πολυμορφισμού της GDH2 σε πληθυσμό της Κρήτης, θεωρήθηκε σκόπιμο να εξεταστούν τυχόν αλλαγές σε επίπεδα έκφρασης και κατανομή της γλουταμικής αφυδρογονάσης GDH2, καθώς άλλωστε υπάρχει πολύ περιορισμένο έργο στη βιβλιογραφία για τη συμβολή της στη νόσο, ιδίως όσον αφορά στον ασθενή ανθρώπινο εγκέφαλο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Πειραματικό μέρος

Η βιοτράπεζα εγκεφάλων Κρήτης έχει έγκριση δεοντολογίας από την Επιτροπή Δεοντολογίας και το Επιστημονικό Συμβούλιο του ΠΑΓΝΗ (Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου) (#16412 / 23-12-2013) και το Διοικητικό Συμβούλιο του ΠΑΓΝΗ (#899/21 / 13-11-2014). Όλοι οι συμμετέχοντες και οι νόμιμοι εκπρόσωποί τους έχουν δώσει τη συγκατάθεσή τους αφού πρώτα ενημερωθούν. Οι πιθανοί δότες επιλέγονται από τα κέντρα ημέρας που διοργανώνει η Εταιρεία Αλτσχάιμερ και Υγιούς Γήρανσης Ηρακλείου, Αλληλεγγύη.

3.1 Εξέταση υποψήφιων ασθενών για δωρεά εγκεφάλου / δειγματοληψία DNA, ορού και πλάσματος.

Μετά τη λήψη της συγκατάθεσης, νευρολόγος ή άλλος ειδικός γιατρός της μελέτης επισκέπτεται τον ασθενή και λαμβάνει όλες τις απαραίτητες πληροφορίες σχετικά με το ιατρικό ιστορικό, το οικογενειακό ιστορικό και τα εργαστηριακά ευρήματα. Γίνεται κλινική εξέταση και συντάσσεται έκθεση με τα παραπάνω στοιχεία. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ο ασθενής εξετάζεται και από νευροψυχολόγο για καλύτερη τεκμηρίωση της διάγνωσης. Στη συνέχεια, νοσοκόμα της μελέτης συλλέγει φιαλίδια αίματος, έτσι ώστε το DNA, ο ορός και το πλάσμα να απομονώνονται και να φυλάσσονται στους -80°C

3.2 Αφαίρεση εγκεφάλου, διατομή και μακροσκοπική εξέταση

Το πρωτόκολλο επεξεργασίας εγκεφαλικού ιστού περιλαμβάνει την άμεση πιθανή αφαίρεση του εγκεφάλου, μια λεπτομερή φωτογραφία του φρέσκου και μόνιμου εγκεφάλου και την καταγραφή μακροσκοπικών και μικροσκοπικών νευροπαθολογικών χαρακτηριστικών σε μια ολοκληρωμένη φόρμα εγγραφής. Καταγράφεται ο χρόνος θανάτου, ο χρόνος της νεκροτομής και η αφαίρεση του εγκεφάλου.

Η αυτοψία ξεκινά μόλις ο δότης μεταφερθεί στο νεκροτομείο και επιβεβαιωθεί για δεύτερη φορά η συγκατάθεση για δωρεά εγκεφάλου. Για βέλτιστη ποιότητα ιστού και πιο αποτελεσματική επεξεργασία, η περίοδος μετά θάνατον (Post-mortem interval- PMI) έως την τομή και την κατάψυξη συνιστάται να μην υπερβαίνει τις 6 ώρες. Ωστόσο, μια πρόσφατη μελέτη ανέφερε ότι υψηλής ποιότητας RNA μπορεί να εξαχθεί από ιστό με PMI έως και 36 ώρες, αποδεικνύοντας ότι ο ιστός που

διατηρείται στους -80°C για περισσότερες από δύο δεκαετίες διατήρησε την υψηλή του ποιότητα ως προς το RNA και την καταλληλότητά του για μελλοντική έρευνα.⁴⁶

Ο εγκέφαλος, οι μήνιγγες και οι λεπτομήνιγγες εξετάζονται επισκοπικά. Ο εγκέφαλος αφαιρείται από το κρανίο και ζυγίζεται. Περιγράφεται η εξωτερική εμφάνιση και φωτογραφίζεται η πάνω, η κάτω και οι δύο όψεις και στη συνέχεια χωρίζεται στη μέση σε δύο ημισφαίρια με κεντρική οβελιαία τομή κατά μήκος του διαφανούς διαφράγματος και καταγράφεται η σοβαρότητα της ατροφίας.

Για το ημισφαίριο B: Ο μέσος εγκέφαλος αποκόπτεται οριζόντια στο ύψος των μαστίων.

Φωτογραφίζεται η εσωτερική επιφάνεια κάθε ημισφαιρίου. Καταγράφεται η εντόπιση και η σοβαρότητα της ατροφίας καθώς και η διάτρηση των αυλάκων. Φωτογραφίζονται οι οπίσθιες επιφάνειες των τομών και γίνονται στεφαναϊές τομές πάχους 5 mm και ψύχονται γρήγορα τοποθετώντας τες μεταξύ πλακών αλουμινίου πάχους 0,4 cm σε απόσταση 0,7 cm μεταξύ τους.

Όλες οι τομές τοποθετούνται σε δοχείο που φέρει τον αύξοντα αριθμό αυτοψίας και τοποθετούνται σε βαθιά κατάψυξη (-80°C). Η ίδια διαδικασία ακολουθείται για το παρεγκεφαλιδικό ημισφαίριο, αφού κοπεί σε στεφαναϊές τομές. Το ημισφαίριο B αποθηκεύεται στους -80°C στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης για μελλοντικές DNA / RNA / πρωτεϊνικές μελέτες

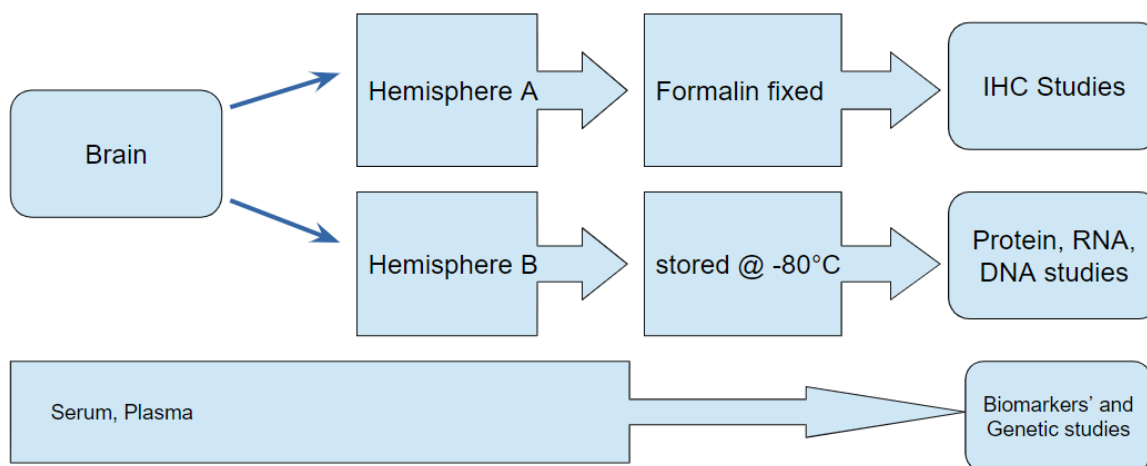
Ημισφαίριο A: Τοποθετείται σε δοχείο με φορμόλη/νερό σε αναλογία 1/5 για ~2 εβδομάδες μέχρι να μονιμοποιηθεί πλήρως με φορμόλη. Την πέμπτη μέρα κόβεται ελαφρά σε κορωνιαίες τομές πάχους 10 εκ. για να επιτευχθεί βέλτιστη και ταχύτερη μονιμοποίηση. Την 15η ημέρα, ακολουθούμε την τυποποιημένη πλέον δειγματοληψία του εγκεφαλικού ιστού⁴⁷ που απαιτείται για μια νευροπαθολογική διερεύνηση προκειμένου να διασφαλιστεί η αξιολόγηση όλων των σημαντικών βλαβών. Τα μονιμοποιημένα σε φορμόλη ημισφαίρια προωθούνται στο Παθολογικό Τμήμα και πραγματοποιείται δειγματοληψία των ακόλουθων 17 περιοχών: μέση και κάτω μετωπιαία έλικα, μέση κροταφική έλικα, μέση κροταφική έλικα, κυκλική έλικα, κάτω βρεγματική έλικα, ινιακός λοβός, πρόσθιος υπόκαμπος και οπίσθιος υπόκαμπος και παρα-ιπποκάμπια έλικα, βασικός πρόσθιος εγκέφαλος (αμυγδαλή και πυρήνας Meynert), ραβδωτό σώμα (κερκοφόρος πυρήνας, νησίδα και κέλυφος), θάλαμος και υποθαλαμικός πυρήνας, μεσεγκέφαλος και μέλαινα ουσία, γέφυρα και υπομέλας τόπος, προμήκης μυελός και φλοιώδης πυρήνας της παρεγκεφαλίδας. (Πίνακας 1)

Brain region	
1	Inferior frontal gyrus
2	Middle frontal gyrus
3	Middle temporal gyrus
4	Cingulate gyrus
5	Inferior parietal gyrus
6	Pre- and Post- central gyrus
7	Occipital lobe
8	Anterior hippocampal and parahippocampal gyrus
9	Posterior hippocampal and parahippocampal gyrus
10	Basal forebrain (amygdala, Meynert nucleus)
11	Striatum (caudatus, putamen, insula)
12	Thalamus and subthalamic nucleus
13	Mesencephalon and substantia nigra
14	Pons and locus coeruleus
15	Medulla oblongata and nucleus hypoglossus
16	Dentate nucleus of cerebellum
17	Cerebellar Cortex

Πίνακας 1: Ανατομικές περιοχές εγκεφάλου που χρησιμοποιήθηκαν για τη δειγματοληψία

3.3 Νευροπαθολογική εξέταση

Προκειμένου να επικυρωθεί η κλινική διάγνωση, πραγματοποιούνται χρώσεις ανοσοϊστοχημείας (IHC) για τις περιοχές του εγκεφάλου και τις πρωτεΐνες ενδιαφέροντος. Για περιπτώσεις AD, η ανοσοϊστοχημική χρώση πραγματοποιείται σε τομές ιππόκαμπου για πλάκες αμυλοειδούς και υπερφωσφορυλιωμένη tau. Έχει ήδη αποδειχθεί ότι η πλειονότητα των πρωτεϊνικών αλλοιώσεων έχει μια ξεχωριστή θέση έναρξης και ακολουθεί ένα νευροανατομικά καθορισμένο προοδευτικό μοτίβο.⁴⁷ Για την παθολογία tau η σειρά είναι: γέφυρα και υπομέλας τόπος, ιππόκαμπος, μέση κροταφική έλικα και ινιακός λοβός. Για την παθολογία αμυλοειδούς η σειρά είναι: μέση μετωπιαία έλικα και ινιακός λοβός, ιππόκαμπος, βασικός πρόσθιος εγκέφαλος, μεσεγκέφαλος και μέλαινα ουσία, οδοντωτός πυρήνας παρεγκεφαλίδας. Έτσι, για να περιγραφεί το στάδιο της AD σε κάθε περίπτωση, χρησιμοποιείται μια στρατηγική αντίστροφης αξιολόγησης, που σημαίνει ότι, παράλληλα, αναζητήσαμε πλάκες αμυλοειδούς και υπερφωσφορυλιωμένη tau σε εκείνες τις περιοχές του εγκεφάλου που είναι οι τελευταίες που αναμένεται να επηρεαστούν από τη παθολογία αμυλοειδούς και tau, δηλαδή οδοντωτός πυρήνας παρεγκεφαλίδας και ινιακός λοβός αντίστοιχα. Σε περιπτώσεις που αυτές οι πρωτεΐνες δεν μπορούν να ανιχνευθούν σε εκείνες τις περιοχές, επιστρατεύονται οι αμέσως προηγούμενες περιοχές που αναμένεται να επηρεαστούν (μέση κροταφική έλικα και μέλαινα ουσία αντίστοιχα) και ούτω καθεξής.



Εικόνα 6: Διάγραμμα ροής διαδικασιών μετά τη συλλογή ιστού. Ο εγκέφαλος χωρίζεται σε δύο ημισφαίρια. Το ημισφαίριο Α μονιμοποιείται σε φορμόλη για 14 ημέρες και στη συνέχεια δημιουργούνται μπλοκ ιστού εμβαπτισμένο σε παραφίνη για μελέτες IHC. Το ημισφαίριο Β τέμνεται και καταψύχεται γρήγορα, αποθηκευμένο στους -80 C, με δυνατότητα για περαιτέρω γενετικές ή υγρής-βιολογίας μελέτες. Παράλληλα, ορός και πλάσμα που συλλέγονται προ θανάτου αποθηκεύονται στους -80 C για ακόλουθες γενετικές μελέτες και μελέτες βιοδεικτών.

3.4 Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις

Για τις χρώσεις, όλα τα δείγματα εγκεφάλου που ελήφθησαν – μονιμοποιημένα σε φορμόλη - ενσωματώνονται σε παραφίνη σε μπλοκ ιστού. Τα πλακίδια που φέρουν τομές πάχους 3μm παρασκευασμένες από μικροτόμο τοποθετούνται στο φούρνο για 30 λεπτά στους 65 °C ώστε να αποπαραφινωθούν. Έπειτα εμβαπτίζονται σε διαλύματα ξυλόλης και μετά σε διαλύματα φθίνουσας συγκέντρωσης αιθανόλης (100%, 95%, 90%, 75%) 2-3 λεπτά στο καθένα. Η ανάκτηση αντιγόνου πραγματοποιείται με κιτρικό ρυθμιστικό διάλυμα (pH=6,1) στους 85 °C για 40 λεπτά. Για τις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις, χρησιμοποιήθηκε το kit UltraVision Quanto Detection System HRP DAB (Thermo-Fisher; #TL-060-QHD). Αφού μαρκαριστεί με υδρόφοβο μαρκαδόρο η περιοχή που περικλείει τη τομή και γίνει πλύση με TBE 1X, προστίθενται κατά σειρά τα αντιδραστήρια: 1) Hydrogen Peroxide Block για 10 λεπτά ώστε να ελαττωθεί η μη-ειδική χρώση στο υπόβαθρο από την ενδογενή δράση υπεροξειδάσης. 2) Πλύση με TBE. 3) Ultra Vision protein Block για 7 λεπτά ώστε να μειωθεί η χρώση υποβάθρου από μη-ειδική σύνδεση του αντισώματος και έπειτα ξέβγαλμα. 4) διάλυμα πρωτογενούς αντισώματος για 1 ώρα και έπειτα πλύση με TBE. 5) Primary Antibody

Amplifier Quanto για 10 λεπτά. 6) HRP Polymer Quanto για 10 λεπτά ώστε να προσδεθεί το συνδεδεμένο με την HRP βιοτινυλιωμένο πολυμερές στο πρωτογενές αντίσωμα και πλύση με TBE. 7) DAB Quanto Chromogen διαλυμένο σε 1 ml DAB Quanto Substrate ώστε να παραχθεί φωτοαντίδραση στις θέσεις που υπάρχει συνδεδεμένη η HRP, πλύση σε TBE. Η αντι-χρώση πραγματοποιείται με εμβάπτιση σε αιματοξυλίνη για 3 λεπτά.

Αντισώματα για τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες: φωσφορυλιωμένη-tau (AT-8; Thermo Fisher; #MN1020; 1/3000), ολικό Α-βήτα αμυλοειδές (1-16; Biolegend; # SIG-39300; 1/2000), TDP-43 (Proteintech; #22309-1-AP; 1/2000), GDH1 (Acris; #AP23724PU-N; 1/1000), GDH2 (homemade; 1/1000)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1

Αυτή τη στιγμή υπάρχουν 15 δείγματα εγκεφάλου στη συλλογή της CBB, 10 γυναίκες (66,6%) και 5 άνδρες (33,3%). Η μέση ηλικία των εγκεφάλων του αρχείου είναι 88,6 έτη (SD: 5,27 έτη) και το εύρος του μεσοδιαστήματος μετά το θάνατο είναι 4 έως 24 ώρες.



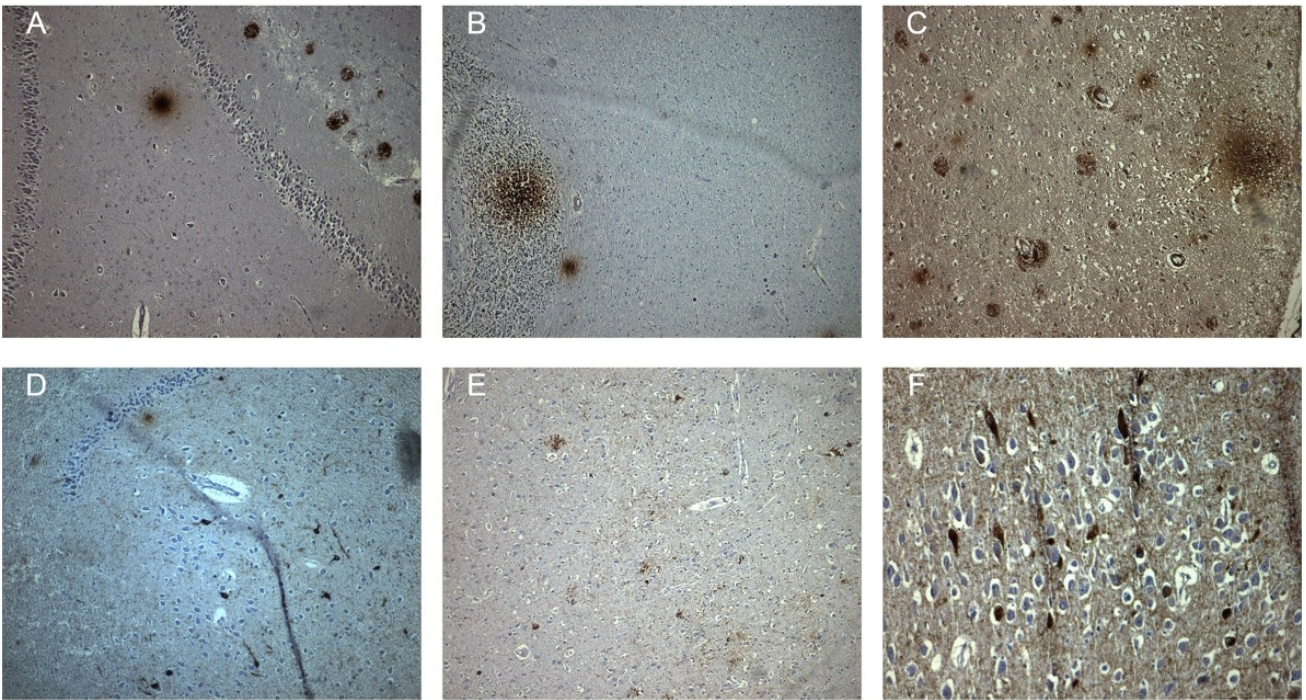
Εικόνα 7: Εγκέφαλοι που αποκτήθηκαν ανά έτος

Από τους 15 εγκεφάλους, 10 έχουν εξεταστεί από εμάς και επιβεβαιωθεί ιστοπαθολογικά ως περιπτώσεις νόσου Alzheimer, χρησιμοποιώντας αντισώματα για την υπερφωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη tau (AT-8; Thermo Fisher; #MN1020) και για το ολικό Α-βήτα αμυλοειδές (1-16; Biolegend; # SIG-39300) σε φέτες ιππόκαμπου. Σύμφωνα με το νευροανατομικά καθορισμένο προοδευτικό μοτίβο εξάπλωσης, οκτώ περιπτώσεις επιβεβαιώθηκαν στο τελευταίο στάδιο της νόσου (στάδιο Braak VI και φάση Thal 5) καθώς μπορούσαμε να παρατηρήσουμε τόσο υπερφωσφορυλιωμένη tau όσο και πλάκες βήτα Αμυλοειδούς σε περιοχές που είναι οι τελευταίες αναμενόμενες να επηρεαστούν από την εκάστοτε παθολογία (ινιακός λοβός και οδοντωτός πυρήνας παρεγκεφαλίδας αντίστοιχα για p-tau και Α-βήτα αμυλοειδές). Αποτύχαμε να ανιχνεύσουμε θετικούς p-tau νευρώνες στον ινιακό λοβό της Περίπτωσης 1, επομένως, κάνοντας ένα βήμα πίσω, ερευνήσαμε περαιτέρω την έσω κροταφική έλικα, όπου εντοπίστηκαν θετικοί p-tau νευρώνες. Αυτό αντιστοιχεί στο στάδιο IV κατά Braak. Ομοίως, δεν μπορέσαμε να παρατηρήσουμε θετικές πλάκες Αβ αμυλοειδούς, νευρωνικές ή αγγειακές εναποθέσεις στον οδοντωτό πυρήνα της παρεγκεφαλίδας της Περίπτωσης 5, οπότε κάνοντας ένα βήμα

πίσω, ερευνήσαμε περαιτέρω τη μέλαινα ουσία, για να επαληθεύσουμε την ύπαρξη θετικών πλακών Αβ αμυλοειδούς, που αντιστοιχούν στο Thal φάση 4.

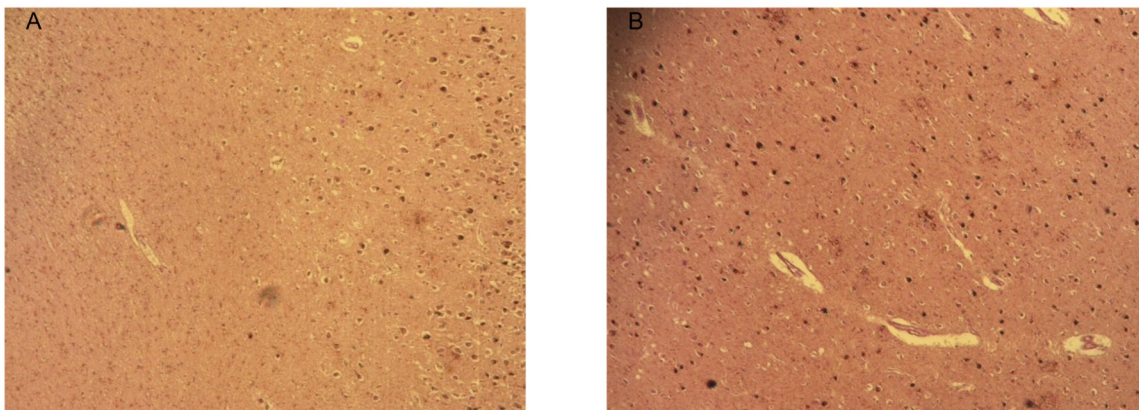
	A-beta			p-Tau			
	Hip.	DN	SN	Hip.	Occip.	mtg	Braak stage/ Thal phase
Brain 1	✓	X		✓	X	✓	4/5
Brain 2	✓	X		✓	X		5-6/5
Brain 3	✓	X		✓	X		5-6/5
Brain 4	✓	X		✓	X		5-6/5
Brain 5	✓	X	✓	✓	X		5-6/4
Brain 6	✓	X		✓	X		5-6/5
Brain 7	✓	X		✓	X		5-6/5
Brain 8	✓	X		✓	X		5-6/5
Brain 9	✓	X		✓	X		5-6/5
Brain 10	✓	X		✓	X		5-6/5

Πίνακας 2: Δείγματα εγκεφάλων και σταδιοποίηση της νόσου βάσει των περιοχών που εβρίσκεται Αβ και ται παθολογία.



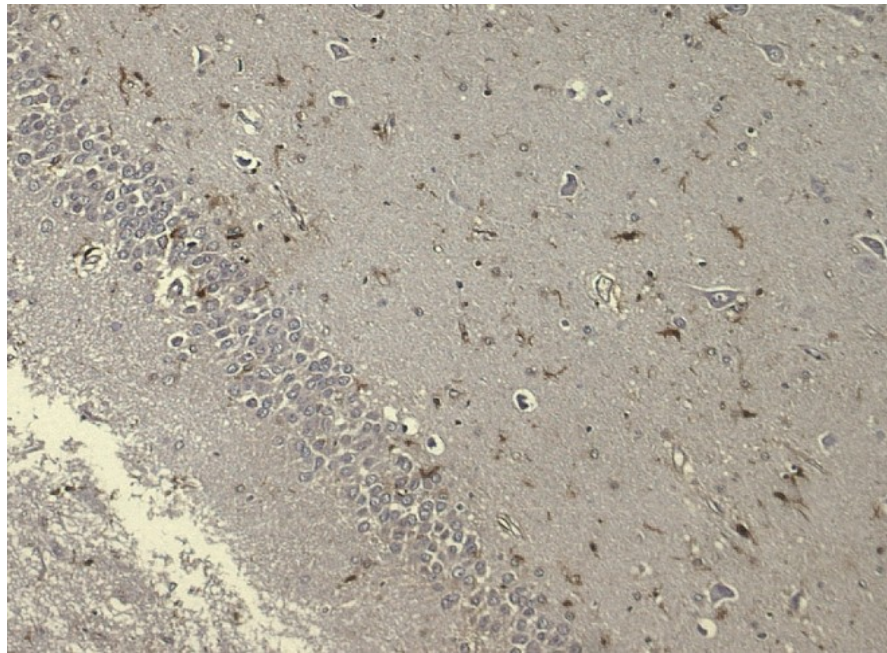
Εικόνα 8: Ανοσοαντιδραστικές αλλοιώσεις β-αμυλοειδούς και υπερφωσφορυλιωμένης tau (A) Διάχυτες (βέλος) και πυκνού πυρήνα (κεφαλή βέλος) πλάκες β-αμυλοειδούς σε τομές ιππόκαμπου. (B) Πλάκες β-αμυλοειδούς στον οδοντωτό πυρήνα της παρεγκεφαλίδας. (C) Αγγειακές εναποθέσεις αμυλοειδούς (βέλος) σε ιπποκάμπεια τομή. (D) Ταυ-θετικοί δυστροφικοί νευρίτες σε σχήμα φλόγας (βέλος) στον ιππόκαμπο (E) Υπερφωσφορυλιωμένοι νευρίτες tau θετικοί στον ινιακό λοβό. (F) Μεγέθυνση σε ταυ-θετικούς νευρώνες στην οδοντωτή έλικα του ιππόκαμπου. Magnification: (A,B,C,D,E), x40; (F) x100

Επιπλέον, πραγματοποιήσαμε χρώσεις για TDP-43 (Proteintech; #22309-1-AP). Προς μεγάλη μας έκπληξη, 9 στις 10 περιπτώσεις είχαν θετικούς νευρώνες του ιππόκαμπου για TDP-43. Έχουν υπάρξει αναφορές για ανοσοαντιδραστικά εγκλείσματα TDP-43 που βρέθηκαν σε ασθενείς με Alzheimer^{48,49} ενώ τα μοριακά μοτίβα του TDP-43 διαφέρουν από AD σε FTD²³; αλλά το ποσοστό των θετικών κρουσμάτων TDP-43 είναι υψηλότερο από το αναμενόμενο και θα μπορούσε ενδεχομένως να αποδοθεί στην προχωρημένη γήρανση των ατόμων.⁵⁰



Εικόνα 9: TDP-43 εγκλείσματα σε διαφορετικές περιοχές του ιπποκάμπου σε εγκέφαλος με AD. Magnification (A) x20; (B) x40

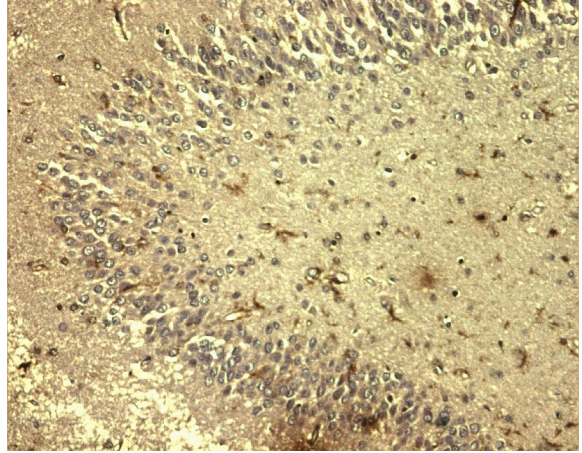
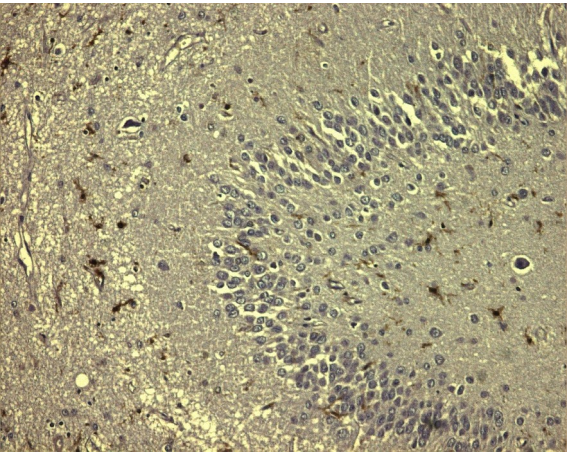
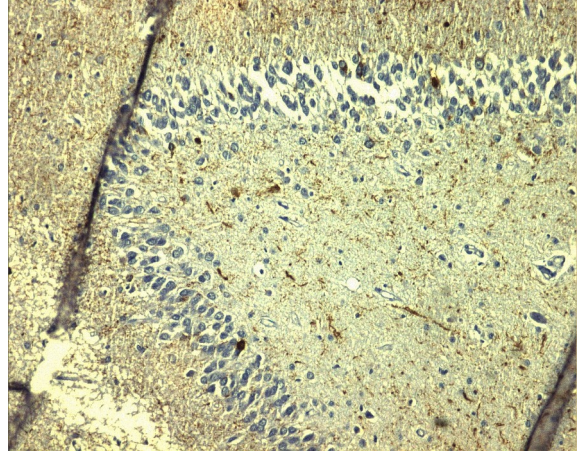
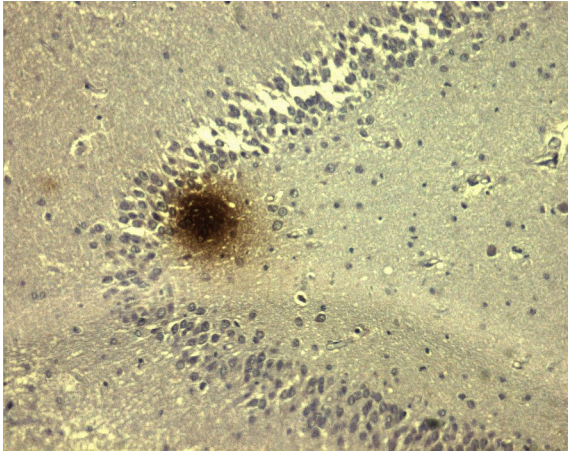
Τέλος, πραγματοποιώντας χρώσεις σε τομές ιπποκάμπου για την GDH2, παρατηρήθηκαν χαρακτηριστικά αστροκυτταρικής εντόπισης, τόσο πυρηνικής όσο και στις προεκβολές, όπως έχει παλαιότερα αναφερθεί,⁵¹ αλλά και διάχυτες μη-ειδικές χρώσεις.



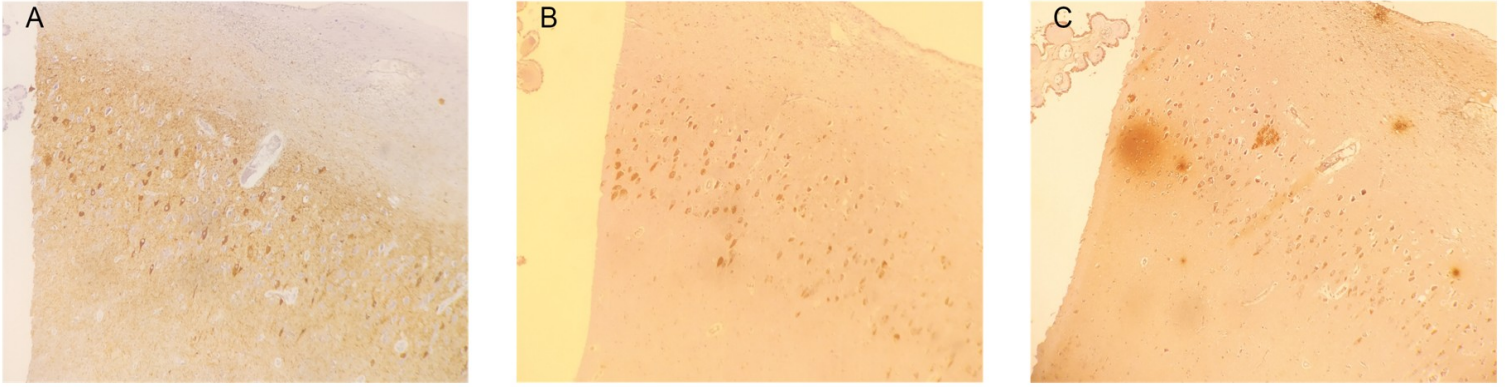
Εικόνα 10: Χρώση έναντι της GDH2 σε τομή ιπποκάμπου.

4.2 Συνεντοπισμός

Για περαιτέρω διερεύνηση του συνεντοπισμού πλακών Αβ και NFTs με άλλες πρωτεΐνες που μας ενδιαφέρουν αξιολογήσαμε τη προσέγγιση των σειριακών παρακείμενων τομών, ξεπερνώντας το εμπόδιο της διπλής χρώσης. Δεν εντοπίσαμε μοτίβα συνεντοπισμού που να σχετίζονται με πλάκες NFT ή αμυλοειδείς με γλουταμική αφυδρογονάση 2 (GDH2). Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε στη βιβλιογραφία⁴⁸ παρατηρήσαμε επίσης ότι τα ανοσοαντιδραστικά εγκλείσματα TDP-43 ήταν διαφορετικά από τα νευροϊνιδικά συμπλέγματα και, όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως,^{52,53} τα εγκλείσματα TDP-43 δεν φαίνεται να συνεντοπίζονται με αμυλοειδείς πλάκες, εκτός από ορισμένες μάλλον τυχαίες περιπτώσεις.



Εικόνα 11: Σειριακές ιπποκάμπειες τομές (A) για β-Αμλοειδές και (B) για p-tau (C) Iba1 (D) GFAP. Δεν φαίνεται να υπάρχει κάποιο μοτίβο συνεντοπισμού.



Εικόνα 12: Μοτίβα συνεντοπισμού σε γειτονικές σειριακές τομές ιππόκαμπτου υπερφωσφορυλιωμένης-ται (A), TDP-43 (B), β-αμλοειδούς (C). Οι θέσεις που εντοπίζονται θετικοί TDP-43 νευρώνες διαφέρουν από τος ται-θετικούς (A και B, αιχμές βελών) και, το TDP-43 δεν φαίνεται να συνεντοπίζεται με πλάκες αμλοειδούς, εκτός από ορισμένες μάλλον τυχαίες περιπτώσεις (B και Γ, βέλη)

ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ- ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Η άνθιση των βιοτραπεζών εγκεφάλου ανά τον κόσμο είναι ιδιαίτερα κρίσιμη, σε μια εποχή που οι νέες τεχνολογίες βιοχημείας και μοριακής βιολογίας ανοίγουν καινούριες ερευνητικές δυνατότητες χρησιμοποιώντας ανθρώπινο εγκεφαλικό ιστό. Καθώς προχωρούν οι γενετικές και μοριακές μελέτες για τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες, καθίσταται ολοένα και πιο ζωτικής σημασίας να ενσωματωθούν αυτά τα ευρήματα στην υπάρχουσα κλινική και νευροπαθολογική εικόνα προκειμένου να κατανοηθεί πλήρως η παθοφυσιολογία της νόσου. Η δημιουργία μιας τράπεζας εγκεφάλου και η επακόλουθη συστηματική ιστοπαθολογική αξιολόγηση του ανθρώπινου εγκεφάλου συμβάλει στην κατανόηση της παθογένειας των νευροεκφυλιστικών ασθενειών, παρέχοντας παράλληλα πρόσθετες ευκαιρίες μέσω συνεργασιών με εξωτερικούς ερευνητές να χρησιμοποιήσουν υλικό και δεδομένα.⁵⁴

Επιπλέον, η μεταθανάτια εξέταση του ανθρώπινου εγκεφάλου επιτρέπει στους κλινικούς γιατρούς που παρακολούθησαν τους συμμετέχοντες, με κλινικά, νευροψυχολογικά και δεδομένα βιοδεικτών, τη συσχέτιση με τα νευροπαθολογικά ευρήματα,^{54,55} τα οποία μπορεί να αποδοθούν στη μοναδικότητα κάθε πληθυσμού που εξετάζεται. Για παράδειγμα, παρατηρήσαμε ενδοκυτταρικά έγκλειστα TDP-43 σε 9 από τους 10 εγκεφάλους που εξετάστηκαν, κάτι που αναφέρεται πως σχετίζεται με πιο σοβαρές εκφάνσεις της νόσου.⁵³ Παρόλα αυτά δηλώνεται όλο και περισσότερο ότι η ανοσοαντιδραστικότητα TDP-43 είναι κοινή στη νόσο Alzheimer (σε ποσοστό περίπου 25%)^{22,49,56} όμως παρατηρήσαμε υψηλότερη αναλογία παρουσίας εγκλειστών TDP-43 (90% των περιπτώσεων). Αυτή η παρατήρηση θα μπορούσε να αποσαφηνιστεί λαμβάνοντας υπόψη την αυξημένη ηλικία των συμμετεχόντων της CBB, η οποία συνοδεύεται με πιο προχωρημένα στάδια της νόσου, μια διπλή συνθήκη που υποδεικνύει σημαντικό νευροεκφυλισμό και νευρωνική απώλεια. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με τη συνδυαστική υπόθεση της συνεργιστικής δράσης μεταξύ tau και TDP-43,⁵⁷ δηλώνοντας ότι σε ασθενείς με μικτή παθολογία Αβ, tau και TDP-43, η τελευταία θα μπορούσε ενδεχομένως να προκαλέσει περαιτέρω νευροεκφυλιστικές διεργασίες στη νόσο Alzheimer, επιδεινώνοντας τα αποτελέσματα (βαρύτερη γνωστική εξασθένηση, μεγαλύτερη ατροφία του ιππόκαμπου και ταχύτερη γνωστική έκπτωση). Επιπλέον, ενώ οι νέες τεχνολογίες βιοχημείας και μοριακής βιολογίας ανοίγουν νέες ερευνητικές δυνατότητες χρησιμοποιώντας ανθρώπινο εγκεφαλικό ιστό, έχουν εκφραστεί ανησυχίες σχετικά με την εγκυρότητα της αξιοποίησης των διαγονιδιακών μοντέλων σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Υπό το πρίσμα του υψηλού ποσοστού αποτυχίας των θεραπευτικών κλινικών δοκιμών στη νόσο Alzheimer, παρά το γεγονός ότι πολλά από αυτά τα φάρμακα ήταν επιτυχή σε προκλινικές δοκιμές χρησιμοποιώντας ζωικά μοντέλα,^{36,58} οι τράπεζες εγκεφάλου βοηθούν στη γεφύρωση του μεταφραστικού χάσματος μεταξύ πειραματικών ζωικών μοντέλων και ανθρώπινων μελετών. Προς μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα, η CBB απαρτίζεται από μια διεπιστημονική συμβολή ερευνητών, κλινικών ιατρών, παθολόγων, μοριακών βιολόγων, νευροεπιστημόνων, ψυχολόγων,

νοσηλευτών και συντονιστών για τις δωρεές που ενεργούν επίσης ως σύνδεσμοι της κοινότητας. Ωστόσο, η στρατολόγηση μιας αντίστοιχης ηλικιακά υγιούς ομάδας ελέγχου είναι επίσης θεμελιώδους σημασίας, καθώς οι υγιείς εγκέφαλοι χρειάζονται ώστε να εντοπιστούν οι διαφορές και να γίνει σύγκριση μεταξύ υγιούς και παθολογικής κατάστασης. Αναγνωρίζουμε την έλλειψη ιστού ελέγχου σε αυτή τη μελέτη, αλλά ελπίζουμε ότι αυτό είναι ένα εμπόδιο που θα αρθεί σύντομα, καθώς διαμορφώνεται μια επικείμενη συνεργασία με την Πανελλήνια Βιοτράπεζα Νευροπαθειών (Neuro-Bio Hellas), καθώς και όταν οι ήδη εγγεγραμμένοι υποψήφιοι δότες στη μελέτη μας, με την πάροδο του χρόνου, θα ξεκινήσουν να παρέχουν υγιές εγκεφαλικό υλικό.

BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ

1. James SL, Abate D, Abate KH, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 Diseases and Injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018;392(10159):1789-1858. doi:10.1016/S0140-6736(18)32279-7
2. Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, et al. Alzheimer's disease. *Lancet (London, England)*. 2021;397(10284):1577-1590. doi:10.1016/S0140-6736(20)32205-4
3. Mayeux R, Stern Y. Epidemiology of Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(8). doi:10.1101/CSHPERSPECT.A006239
4. Global prevalence - Dementia Statistics Hub. <https://www.dementiastatistics.org/statistics/global-prevalence/>. Accessed February 17, 2022.
5. Yegambaram M, Manivannan B, Beach T, Halden R. Role of Environmental Contaminants in the Etiology of Alzheimer's Disease: A Review. *Curr Alzheimer Res*. 2015;12(2):116-146. doi:10.2174/1567205012666150204121719
6. Koval I, Bône A, Louis M, et al. AD Course Map charts Alzheimer's disease progression. *Sci Reports 2021 III*. 2021;11(1):1-16. doi:10.1038/s41598-021-87434-1
7. Meraz-Ríos MA, Toral-Rios D, Franco-Bocanegra D, Villeda-Hernández J, Campos-Peña V. Inflammatory process in Alzheimer's Disease. *Front Integr Neurosci*. 2013;7(JUL):59. doi:10.3389/fnint.2013.00059
8. Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretschmar H, Tredici K. Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol*. 2006;112(4):389-404. doi:10.1007/s00401-006-0127-z
9. Dickson DW. The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1997;56(4):321-339. doi:10.1097/00005072-199704000-00001
10. Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. doi:10.1101/cshperspect.a006189
11. Macleod R, Hillert EK, Cameron RT, Baillie GS. The role and therapeutic targeting of α -, β - and γ -secretase in Alzheimer's disease. *Futur Sci OA*. 2015;1(3). doi:10.4155/FSO.15.9
12. Augustinack JC, Schneider A, Mandelkow EM, Hyman BT. Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 2002;103(1):26-35. doi:10.1007/S004010100423
13. Braak H, Del Tredici K. Neuroanatomy and pathology of sporadic Alzheimer's disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 2015;215:1-162. doi:10.1007/978-3-319-12679-1

14. Arnsten AFT, Datta D, Tredici K Del, Braak H. Hypothesis: Tau pathology is an initiating factor in sporadic Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* 2021;17(1):115-124. doi:10.1002/alz.12192
15. Burbaeva GS, Boksha IS, Tereshkina EB, Savushkina OK, Starodubtseva LI, Turishcheva MS. Glutamate metabolizing enzymes in prefrontal cortex of Alzheimer's disease patients. *Neurochem Res.* 2005;30(11):1443-1451. doi:10.1007/s11064-005-8654-x
16. Jones RS, Waldman AD. 1H-MRS evaluation of metabolism in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurol Res.* 2004;26(5):488-495. doi:10.1179/016164104225017640
17. Duong S, Patel T, Chang F. Dementia: What pharmacists need to know. *Can Pharm J CPJ.* 2017;150(2):118. doi:10.1177/1715163517690745
18. Patel BB, Holland NW. Vascular Dementia. *5-Minute Clin Consult Stand 2016 Twenty Fourth Ed.* January 2021. doi:10.1007/978-3-540-29676-8_3230
19. Walker Z, Possin KL, Boeve BF, Aarsland D. Non-Alzheimer's dementia 2: Lewy body dementias. *Lancet (London, England).* 2015;386(10004):1683. doi:10.1016/S0140-6736(15)00462-6
20. Haider A, Spurling BC, Sánchez-Manso JC. Lewy Body Dementia. *StatPearls.* July 2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482441/>. Accessed February 20, 2022.
21. Bang J, Spina S, Miller BL. Non-Alzheimer's dementia 1: Frontotemporal dementia. *Lancet (London, England).* 2015;386(10004):1672. doi:10.1016/S0140-6736(15)00461-4
22. Uryu K, Nakashima-Yasuda H, Forman MS, et al. Concomitant TAR-DNA-binding protein 43 pathology is present in Alzheimer disease and corticobasal degeneration but not in other tauopathies. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2008;67(6):555-564. doi:10.1097/NEN.0B013E31817713B5
23. Tomé SO, Vandenberghe R, Ospitalieri S, et al. Distinct molecular patterns of TDP-43 pathology in Alzheimer's disease: relationship with clinical phenotypes. *Acta Neuropathol Commun.* 2020;8(1). doi:10.1186/S40478-020-00934-5
24. Plaitakis A, Zaganas I, Spanaki C. Deregulation of glutamate dehydrogenase in human neurologic disorders. *J Neurosci Res.* 2013;91(8):1007-1017. doi:10.1002/jnr.23176
25. Dimovasili C, Fadouloglou VE, Kefala A, et al. Crystal structure of glutamate dehydrogenase 2, a positively selected novel human enzyme involved in brain biology and cancer pathophysiology. *J Neurochem.* 2021;157(3):802-815. doi:10.1111/JNC.15296
26. Bao X, Pal R, Hascup KN, et al. Transgenic expression of Glud1 (glutamate dehydrogenase 1) in neurons: in vivo model of enhanced glutamate release, altered synaptic plasticity, and selective neuronal vulnerability. *J Neurosci.* 2009;29(44):13929-13944. doi:10.1523/JNEUROSCI.4413-09.2009
27. Shashidharan P, Michaelidis TM, Robakis NK, Kresovali A, Papamatheakis J, Plaitakis A. Novel human glutamate dehydrogenase expressed in neural and testicular tissues and encoded

by an X-linked intronless gene. *J Biol Chem*. 1994;269(24):16971-16976. doi:10.1016/S0021-9258(19)89484-X

28. Zaganas I, Waagepetersen HS, Georgopoulos P, Sonnewald U, Plaitakis A, Schousboe A. Differential expression of glutamate dehydrogenase in cultured neurons and astrocytes from mouse cerebellum and cerebral cortex. *J Neurosci Res*. 2001;66(5):909-913. doi:10.1002/JNR.10058
29. Cavallaro S, Meiri N, Yi CL, et al. Late memory-related genes in the hippocampus revealed by RNA fingerprinting. *Proc Natl Acad Sci*. 1997;94(18):9669-9673. doi:10.1073/PNAS.94.18.9669
30. Michaelis EK, Wang X, Pal R, et al. Neuronal Glud1 (glutamate dehydrogenase 1) over-expressing mice: Increased glutamate formation and synaptic release, loss of synaptic activity, and adaptive changes in genomic expression. *Neurochem Int*. 2011;59(4):473-481. doi:10.1016/j.neuint.2011.03.003
31. Kulijewicz-Nawrot M, Syková E, Chvátal A, Verkhatsky A, Rodríguez JJ. Astrocytes and glutamate homeostasis in Alzheimer's disease: A decrease in glutamine synthetase, but not in glutamate transporter-1, in the prefrontal cortex. *ASN Neuro*. 2013;5(4):273-282. doi:10.1042/AN20130017
32. Plaitakis A, Kalef-Ezra E, Kotzamani D, Zaganas I, Spanaki C. The Glutamate Dehydrogenase Pathway and Its Roles in Cell and Tissue Biology in Health and Disease. *Biology (Basel)*. 2017;6(1):11. doi:10.3390/BIOLOGY6010011
33. Kumar A, Sidhu J, Goyal A, Tsao JW. Alzheimer Disease. *StatPearls*. August 2021:1-27. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499922/>. Accessed January 10, 2022.
34. Banik A, Brown RE, Bamburg J, et al. Translation of Pre-Clinical Studies into Successful Clinical Trials for Alzheimer's Disease: What are the Roadblocks and How Can They Be Overcome? *J Alzheimers Dis*. 2015;47(4):815-843. doi:10.3233/JAD-150136
35. Oakley H, Cole SL, Logan S, et al. Intraneuronal β -Amyloid Aggregates, Neurodegeneration, and Neuron Loss in Transgenic Mice with Five Familial Alzheimer's Disease Mutations: Potential Factors in Amyloid Plaque Formation. *J Neurosci*. 2006;26(40):10129-10140. doi:10.1523/JNEUROSCI.1202-06.2006
36. Drummond E, Wisniewski T. Alzheimer's disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathol*. 2017;133(2):155-175. doi:10.1007/s00401-016-1662-x
37. Murphy DD, Ravina B. Brain banking for neurodegenerative diseases. *Curr Opin Neurol*. 2003;16(4):459-463. doi:10.1097/01.wco.0000084222.82329.f2
38. Crivellato E, Ribatti D. Soul, mind, brain: Greek philosophy and the birth of neuroscience. *Brain Res Bull*. 2007;71(4):327-336. doi:10.1016/J.BRAINRESBULL.2006.09.020
39. Carlos AF, Poloni TE, Medici V, Chikhladze M, Guaita A, Ceroni M. From brain collections to modern brain banks: A historical perspective. *Alzheimer's Dement Transl Res Clin Interv*. 2019;5:52-60. doi:10.1016/J.TRCL.2018.12.002

40. Sheedy D, Garrick T, Dedova I, et al. An Australian Brain Bank: a critical investment with a high return! *Cell Tissue Bank*. 2008;9(3):205. doi:10.1007/S10561-008-9076-1
41. Jack CR, Albert MS, Knopman DS, et al. Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2011;7(3):257-262. doi:10.1016/J.JALZ.2011.03.004
42. Knopman DS, Jack CR, Lundt ES, et al. Evolution of neurodegeneration-imaging biomarkers from clinically normal to dementia in the Alzheimer disease spectrum. *Neurobiol Aging*. 2016;46:32-42. doi:10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2016.06.003
43. Nelson PT, Jicha GA, Kryscio RJ, et al. Low sensitivity in clinical diagnoses of dementia with Lewy bodies. *J Neurol*. 2010;257(3):359. doi:10.1007/S00415-009-5324-Y
44. Hoesen V, Intuition AY, Gucht V Der. Kretzschmar2008. 2009;10(JANuARy).
45. Kretzschmar H. Brain banking: opportunities, challenges and meaning for the future. *Nat Rev Neurosci* 2008 101. 2008;10(1):70-78. doi:10.1038/nrn2535
46. White K, Yang P, Li L, Farshori A, Medina AE, Zielke HR. Effect of Postmortem Interval and Years in Storage on RNA Quality of Tissue at a Repository of the NIH NeuroBioBank. *Biopreserv Biobank*. 2018;16(2):148. doi:10.1089/BIO.2017.0099
47. Alafuzoff I. *Minimal Neuropathologic Diagnosis for Brain Banking in the Normal Middle-Aged and Aged Brain and in Neurodegenerative Disorders*. Vol 150. 1st ed. Elsevier B.V.; 2018. doi:10.1016/B978-0-444-63639-3.00010-4
48. Amador-Ortiz C, Lin WL, Ahmed Z, et al. TDP-43 IMMUNOREACTIVITY IN HIPPOCAMPAL SCLEROSIS AND ALZHEIMER'S DISEASE. *Ann Neurol*. 2007;61(5):435. doi:10.1002/ANA.21154
49. Josephs KA, Murray ME, Whitwell JL, et al. Staging TDP-43 pathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 2014;127(3):441-450. doi:10.1007/S00401-013-1211-9
50. Wilson AC, Dugger BN, Dickson DW, Wang DS. TDP-43 in aging and Alzheimer's disease - a review. *Int J Clin Exp Pathol*. 2011;4(2):147. /pmc/articles/PMC3037200/. Accessed January 7, 2022.
51. Plaitakis A, Kotzamani D, Petraki Z, et al. Transgenic Mice Carrying GLUD2 as a Tool for Studying the Expressional and the Functional Adaptation of this Positive Selected Gene in Human Brain Evolution. *Neurochem Res*. 2019;44(1):154-169. doi:10.1007/s11064-018-2546-3
52. Lippa CF, Rosso AL, Stutzbach LD, Neumann M, Lee VMY, Trojanowski JQ. Transactive response DNA-binding protein 43 burden in familial Alzheimer disease and Down syndrome. *Arch Neurol*. 2009;66(12):1483-1488. doi:10.1001/ARCHNEUROL.2009.277
53. Shih YH, Tu LH, Chang TY, et al. TDP-43 interacts with amyloid- β , inhibits fibrillization, and worsens pathology in a model of Alzheimer's disease. *Nat Commun* 2020 111. 2020;11(1):1-17. doi:10.1038/s41467-020-19786-7

54. Isik AT, Danyeli AE, Kaya D, Soysal P, Karabay N, Gokden M. The importance of brain banking for dementia practice: the first experience of Turkey. *Cell Tissue Bank*. 2020;21(3):367-375. doi:10.1007/s10561-020-09835-2
55. Franklin EE, Perrin RJ, Vincent B, Baxter M, Morris JC, Cairns NJ. Brain collection, standardized neuropathologic assessment, and comorbidity in ADNI participants. *Alzheimers Dement*. 2015;11(7):815. doi:10.1016/J.JALZ.2015.05.010
56. Kadokura A, Yamazaki T, Lemere CA, Takatama M, Okamoto K. Regional distribution of TDP-43 inclusions in Alzheimer disease (AD) brains: their relation to AD common pathology. *Neuropathology*. 2009;29(5):566-573. doi:10.1111/J.1440-1789.2009.01017.X
57. Latimer CS, Liachko NF. Tau and TDP-43 synergy: a novel therapeutic target for sporadic late-onset Alzheimer's disease. *GeroScience*. 2021;43(4):1627-1634. doi:10.1007/S11357-021-00407-0
58. Cummings JL, Morstorf T, Zhong K. Alzheimer's disease drug-development pipeline: Few candidates, frequent failures. *Alzheimer's Res Ther*. 2014;6(4):1-7. doi:10.1186/ALZRT269/TABLES/3