

CZU: 616.894-053.8

<https://doi.org/10.52692/1857-0011.2021.3-71.44>

## NOI STRATEGII ÎN FARMACOTERAPIA BOLII ALZHEIMER

<sup>1</sup>Lucia ȚURCAN, dr. în șt.med, conf.univ.<sup>1</sup>Anastasia CARACAȘ, medic rezident<sup>1</sup>Dumitru ȘTÎRBA, medic rezident<sup>1</sup>Svelana LATUS, medic rezident

Olesea MALANCEA, medic rezident

<sup>1</sup>Nicolae BACINSCHI, dr. hab. în șt. med., prof. universitar<sup>1</sup>IP Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”,  
Chișinău, R. Moldova

### Rezumat.

Boala Alzheimer, patologie neurodegenerativă cu pronostic sever, reprezintă mai mult de jumătate din cazurile de demență, asociată cu pierderi persistente și progresive a memoriei, tulburări cognitive și de personalitate. Conform Asociației bolii Alzheimer, în țările dezvoltate 13% dintre persoanele peste 65 de ani suferă de boala Alzheimer, reprezentând a cincea cauză de deces la pacienții din această grupă de vârstă. Datele Organizației Mondiale a Sănătății, de asemenea, ne demonstrează că odată cu creșterea populației și duratei vieții, incidența globală a bolii Alzheimer se va majora de 4 ori până în 2050, și poate atinge la 114 milioane. Acest lucru va determina un impact social imens și poveri economice considerabile pentru sistemul de sănătate, reieșind din faptul, că actualmente nu există tratamente eficiente a patologiei date. Elaborarea de medicamente noi, eficiente și inofensive, menite să amelioreze calitatea și cantitatea vieții pacienților cu boala Alzheimer rămîne o prioritate, iar savanții la nivel global își conjugă eforturile pentru soluționarea problemei date. Verigile etiopatogenetice ale bolii Alzheimer sunt țintele terapeutice promițătoare în vederea descoperii unei terapii medicamentatoase eficiente.

**Cuvinte cheie:** Boala Alzheimer, tulburări cognitive, verigile etiopatogenetice, medicamente noi.

### Summary. New directions of research in the pharmacotherapy of Alzheimer's disease

Alzheimer's disease, a neurodegenerative disease with a severe prognosis, accounts more than half of cases of dementia, associated with persistent and progressive memory loss, cognitive and personality disorders. According to the Alzheimer's Association, in developed countries 13% of people over 65 years old suffer from Alzheimer's disease, the fifth leading cause of death in patients of this age group. Data from the World Health Organization also shows that with the increase population and life expectancy, the overall incidence of Alzheimer's disease will increase 4 times by 2050 and can reach 114 million. This will have a huge social impact and considerable economic burdens for the health system, as there are currently no efficient treatments for Alzheimer's disease. The development of new, efficient and harmless drugs, designed to improve the quality and quantity of life of patients with Alzheimer's disease remains a priority, and scientists globally combine their efforts to solve this problem. The etiopathogenetic links of Alzheimer's disease are promising therapeutic targets for the discovery of efficient drug therapy.

**Keywords:** Alzheimer's disease, cognitive impairment, etiopathogenetic links, new drugs.

### Резюме. Новые стратегии в фармакотерапии болезни Альцгеймера

Болезнь Альцгеймера, нейродегенеративное заболевание с тяжелым прогнозом, составляет более половины случаев деменции, связанной со стойкой и прогрессирующей потерей памяти, когнитивными расстройствами и расстройствами личности. По данным Ассоциации болезни Альцгеймера, в развитых странах 13% людей старше 65 лет страдают данной болезнью, что составляет пятое место среди причин смерти пациентов в этой возрастной группе. Данные Всемирной организации здравоохранения также показывают, что с увеличением численности населения и продолжительности жизни общая заболеваемость болезнью Альцгеймера к 2050 году увеличится в 4 раза и может достигнуть 114 миллионов. Это вызовет огромное социальное бремя и значительное экономическое затраты для системы здравоохранения так как в настоящее время не существуют эффективные методы лечения этой патологии. Разработка новых эффективных и безопасных препаратов, предназначенных для улучшения качества и продления жизни пациентов с болезнью Альцгеймера, остается приоритетной задачей, и ученые всего мира объединяют свои усилия для решения этой проблемы. Этиопатогенетические звенья болезни Альцгеймера являются многообещающими терапевтическими целями для открытия эффективной лекарственной терапии.

**Ключевые слова:** болезнь Альцгеймера, когнитивные расстройства, новые препараты, этиопатогенетические звенья.

### Introducere.

Boala Alzheimer (BA), patologie neurodegenerativă cu pronostic sever, determină 50–70% din cazurile de demență, asociată cu pierderi persistente și progresive a memoriei, tulburări cognitive și de personalitate. Conform Asociației bolii Alzheimer în țările dezvoltate 13% dintre persoanele peste 65 de ani suferă de BA, reprezentând a cincea cauză de deces la pacienții din această grupă de vârstă. Conform datelor Organizației Mondiale a Sănătății (OMS), odată cu creșterea populației și duratei vieții, incidența globală a BA se va majora de 4 ori și va atinge 114 milioane până în 2050. Acest lucru va determina un impact social imens și poveri economice considerabile pentru sistemul de sănătate. Boala Alzheimer, în funcție de vârsta la care încep manifestările, poate fi sindivizată ca maladie cu debut precoce (până la 65 de ani cu prevalență 3–5%) și debut tardiv (peste 65 de ani cu prevalență 95–97%). Patologia poate fi de origine ereditară sau sporadică, aceasta din urmă fiind cea mai frecventă (prevalență de 98%). Principalul simptom al BA este pierderea memoriei, ce corelează cu micșorarea populației de neuroni în hipocamp (25–70%), o zonă a creierului esențială pentru învățare și memorie [6,8,20].

În prezent, există doar câteva medicamente aprobate de Asociația Americană a Medicamentelor (FDA) pentru tratamentul BA, inclusiv 3 inhibitori ai acetilcolinesterazei (tacrină (suspendată de pe piață), donepezil, galantamina, rivastigmină), un blocant al NMDA-receptorilor (memantină) și un antagonist al receptorului orexinei (suvorexant). Timp de mai multe decenii se efectuează studii pentru elaborarea și aprobarea medicamentelor ce ar modifica evoluția bolii, ar stopa progresia bolii și ar asigura pacienților o terapie eficientă și inofensivă. În acest context elucidarea factorilor de risc și verigilor etiopatogenetice ar permite depistarea țintelor terapeutice esențiale pentru elaborarea terapiei medicamentoase. Cercetările în acest domeniu s-au concentrat pe 2 direcții de perspectivă: sinteza și depunerea de  $\beta$ -amiloid ( $\beta$ A) și dereglările intraneuronale prin intermediul proteinei tau [2,27].

Pe parcursul ultimilor decenii au fost propuse mai multe ipoteze pentru a explica patogeneza BA (cascada amiloidului, proteinei tau, dezechilibrului colinergic, excitotoxicității) și pentru a elabora medicamente cu mecanisme care să contracareze modificările patologice [3].

Una din ipotezele implicate în patogeneza BA se consideră acumularea extracelulară și agregarea peptidelor amiloide, în primul rând a  $\beta$ A, cu dezvoltarea efectelor neurotoxice: blocarea transportului proteinelor prin membrana mitocondrială cu disfuncția mitocondriilor; interacțiunea peptidelor amiloidice cu

ionii metalelor din creier și declanșarea formării speciilor reactive ale oxigenului (SRO) și stresului oxidativ; perturbarea homeostazei calciului și dereglarea fluxului prin membrana plasmatică; activarea microgliei prin peptidele amiloide cu eliberarea mediatorilor inflamației (citokine, chemokine) și dezvoltarea neuroinflamației. Corelația dintre acumularea peptidelor amiloide și efectele neurotoxice este reciprocă după principiul feed back pozitiv [20,25,26].

Se estimează, că creșterea producției de  $\beta$ A inițial poate fi o reacție compensatorie pentru protecția neuronală indusă de un șir de dereglări precum: inflamație cronică; dereglări metabolice; activarea anormală a microgliei; stresul oxidativ; dereglările metabolismului colesterolului. Supraproducția prelungită devine patologică cu activarea cascadei și agregarea  $\beta$ A. S-a constatat că nivelul cerebral de  $\beta$ A poate fi crescut în numeroase afecțiuni neurologice (leziuni cerebrale traumatiche, encefalopatia traumatică cronică, scleroza amiotrofică laterală, scleroza multiplă, ischemia cerebrală), precum și în anestezia generală, intervenții chirurgicale pe cord însoțite de stop cardiac, privarea de somn sau întreruperea somnului cu unde lente [18].

O altă ipoteză a patogenezei BA se reduce la hiperfosforilarea proteinei tau (PT), esențială pentru autoasamblarea, stabilizarea și funcționalitatea microtubulilor neuronilor, astrocitelor și oligodendrocitelor. Proteina tau, prin reglarea microtubulilor, influențează semnalizarea celulară, plasticitatea sinaptică și reglarea stabilității genomice. Această proteină poate suferi un șir de modificări post-translaționale (fosforilare, acetilare, nitrare, glicare, glicozilare etc.) cu modificarea funcțiilor și localizării celulare. La pacienții cu BA s-a constatat o intensificare a fosforilării PT cu pliarea greșită și acumularea în filamentele elicoidale cu dereglări ale microtubulilor și funcțiilor celulare în fibrele neuronale ce determină tulburări neurodegenerative [11,14,26].

Formarea  $A\beta$  și hiperfosforilarea PT, deși sunt cele 2 leziuni caracteristice BA, totuși ele nu pot pe deplin explica etiopatogeneza bolii. Se estimează, că procesele neuroinflamatorii, disfuncția neurotransmițătorilor, stresul oxidativ, disfuncția mitocondrială, modificările neurodegenerative și pierderea neuronilor sunt asociate cu dezvoltarea și progresia BA și apariția simptomelor asociate. În acest context, pe lângă elaborarea medicamentelor care vizează  $\beta$ A și PT, cercetările sunt axate și pe unele strategii terapeutice, precum: diminuarea inflamației; ameliorarea dezechilibrului neurotransmițătorilor; diminuarea stresului oxidativ; îmbunătățirea funcției mitocondriale; protecția neuronilor; regenerarea neuronală (fig. 1). [27].

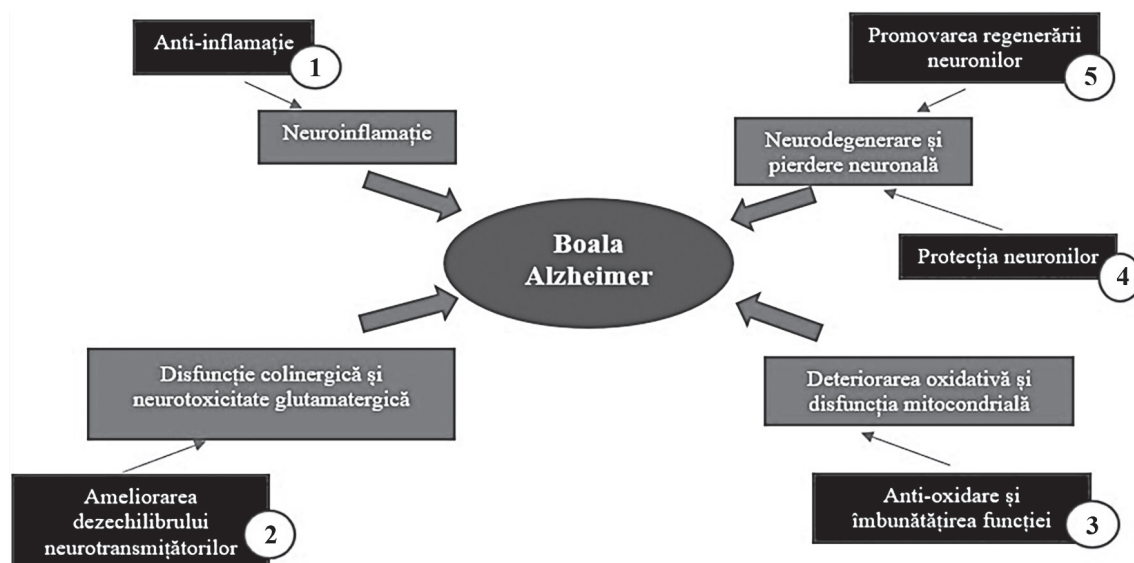


Figura 1. Mecanismele patologice posibile ale bolii Alzheimer și strategiile de tratament medicamentos [27].

(1): antiinflamator; (2): îmbunătățirea dezechilibrului neurotransmițătorilor; (3): antioxidant și îmbunătățirea funcției mitocondriale; (4): neuroprotecție; (5): promovarea regenerării neuronale.

Studiile la nivelul genomului (GWAS) au sugerat, că există cel puțin 20 de gene care contribuie la debutul și evoluția BA. Apolipoproteina E (ApoE), una dintre cele mai bine cunoscute gene din BA prin izoformele sale poate: regla agregarea și clearance-ul  $\beta A$  în creier; participă la reglarea metabolismului glucozei și semnalizării neuronale; reglementa integritatea joncțiunilor; deregla funcționalitatea barierei hematoencefalice (BHE). Gena ABCA7 poate influența acumularea excesivă de peptide amiloide, în timp ce scăderea expresiei genei ABCA7 ar putea afecta schimburile de colesterol și amiloid la nivelul BHE. [25].

### Farmacoterapia bolii Alzheimer. Inhibitori acetilcolinerazei (IACE).

Elaborarea medicamentelor din clasa IACE a constituit una din cele mai esențiale direcții farmacoterapeutice. Deficitul colinergic determină dezvoltarea simptomelor demenței, în special dificultățile de învățare. Tacrina, ca primul IACE, datorită timpului de înjumătățire scurt și hepatotoxicității înalte, a fost retras de pe piață. Printre IACE, disponibili în prezent pe piață, sunt donepezilul, rivastigmina și galantamina [13].

Meta-analizele au arătat că IACE întârzie scăderea funcției cognitive și activităților de zi cu zi, și apariția efectelor adverse în medie cu 6 - 12 luni. Reacțiile adverse semnificative includ simptome gastrointestinale, amețeli, vertij, oboseală, insomnie, halucinații, bradicardie, sincopă și crampe musculare. Donepezilul este IACE reversibil necompetitiv, care s-a dovedit a influența funcția cognitivă, activitățile zilnice și starea clinică generală. Beneficiile mai mari s-au constatat pentru doza de 10 mg comparativ cu cea de 5 mg, iar pentru doza mai mare de 23 mg, avantajele clinice sunt contrare. Rivastigmina este

un inhibitor lent reversibil al acetilcolinerazei și butirilcolinerazei datorită legării la două situsuri active ale acetilcolinerazei. Efectele adverse ale preparatului la administrarea orală sunt semnificative, în timp ce forma transdermică este mai bine tolerabilă de pacienți, deși poate provoca reacții dermatologice. Galantamina este un inhibitor competitiv reversibil al acetilcolinerazei și un modulator al receptorilor nicotiniци cu un efect mai mare în zonele creierului cu nivele scăzute de acetilcolină [3].

Memogaina (Gln-1062, 5), un pro-medicament al galantaminei aflat în studii clinice, aprobat pentru tratamentul BA, posedă o lipofilitate și o biodisponibilitate mai mare în creier (de 15 ori mai mare decât galantamina). Preparatul se administrează intranasal pentru a preveni inactivarea în mediul acid al stomacului și de carboxiesterazele din intestin și ficat. Memogaina, după penetrarea în creier, este scindată de o carboxiesterază în galantamina activă cu o creștere de 3-5 ori a potenței, precum și cu mai puține efecte secundare gastrointestinale și periferice în comparație cu doze echivalente de galantamină [1,13].

### Agoniștii receptorilor $\alpha 7$ nicotiniци.

Recent, s-a demonstrat că  $\beta A$  intracelular joacă un rol cheie în patologia AD și este internalizat de receptorii distribuiți pe membrana celulară. Printre acești receptori, s-a demonstrat că receptorul alfa7 nicotinic (RnACh  $\alpha 7$ ), fiind un canal ionic, joacă un rol important în BA și este exprimat în regiunile esențiale ale creierului (cortexul cerebral, hipocamp) responsabile de funcțiile cognitive. Receptorul  $\alpha 7$  nicotinic este localizat presinaptic și postsinaptic, unde activează cascade de semnalizare intracelulară. Spre deosebire de IACE disponibili, tratamentul cu agoniști RnACh

$\alpha 7$  produce un aflux de calciu și activarea sistemelor de mesager secundar și, în cele din urmă, o eliberare a unei varietăți de neurotransmițători, inclusiv glutamatul sau acidul gamma aminobutiric (GABA), evitând astfel efectele secundare asociate cu IACE. Agoniștii receptorului  $\alpha 7$  nicotinic datorită capacității de penetrare prin BHE sunt considerați o modalitate promițătoare de îmbunătățire a funcțiilor cognitive [13,15,21]. Astfel, au fost elaborați un șir de agoniști ai receptorilor  $\alpha 7$  nicotinici precum encenicilina, nelonicilina etc. Encenicilina, un agonist parțial selectiv al receptorilor, a demonstrat efecte pro-cognitive la concentrații nanomolare, iar studiile clinice au demonstrat creșterea performanței memoriei, însă din cauza simptomelor gastrointestinale severe a fost suspendat. Nelonicilina, un modulator alosteric al receptorilor  $\alpha 7$  nicotinici, a fost propus pentru tratamentul deficiențelor cognitive în schizofrenie și BA. Studiile clinice, desi au relatat pentru nelonicilina o tolerabilitate bună cu efecte secundare similare cu donepezilul, au constatat că preparatul manifestă o eficacitate insuficientă [11,13].

#### **Antagoniștii receptorilor de N-metil-D-aspartat.**

Stimularea excesivă a activității glutamatergice în creier determină o supraîncărcare excitotoxică a fluxului de calciu în neuroni prin canalele ionice ale receptorilor N-metil-D-aspartat (NMDA) cu declinul progresiv al funcțiilor cognitive și manifestărilor patologice observate în BA. Receptorii NMDA sunt implicați în: plasticitatea sinaptică, care stă la baza învățării și memoriei; dezvoltarea leziunilor excitotoxice ce survin în timpul patologiilor neurodegenerative cronice. Proprietățile funcționale ale NMDA-receptorilor depind de localizarea lor. Astfel, receptorii sinaptici contribuie la plasticitatea celulară și procese neurotrofice, iar cei extrasinaptici declanșează căile de semnalizare apoptotică. Din aceste considerente există dificultăți în elaborarea de preparate cu influență asupra NMDA-receptorilor, iar o direcționare selectivă a NMDA-receptorilor reprezintă o abordare promițătoare pentru tratarea stărilor neurodegenerative. Memantina, un antagonist al NMDA-receptorului cu afinitate scăzută, modulează NMDA-receptorii pentru a reduce excitotoxicitatea indusă de glutamat și se crede că atenuează declinul cognitiv asociat cu BA. Preparatul acționează ca un blocant al canalelor deschise cu o rată relativ rapidă de inhibare a activității canalului. Memantina, datorită penetrării în canal în condiții de expunere excesivă și prelungită la glutamat, acționează preponderent asupra NMDA-receptorului extrasinaptic/activat tonic față de NMDA-receptorul sinaptic/activat fazic. Acest profil deosebit, permite memantinei să contrasteze excitotoxicitatea, cu păstrarea în același timp a funcționării transmisiei glutamatergice sinaptice, ce poate explica tolerabili-

tatea clinică a medicamentului. Memantina este indicată de FDA pentru BA moderată până la severă. S-a demonstrat că îmbunătățește scorurile activităților de zi cu zi, funcția generală, scorurile de evaluare și stadiul scorurilor de evaluare a demenței. S-a sugerat, de asemenea, că poate fi eficient în reducerea delirului, agitației/agresiunii, dezinhibiție și tulburărilor de ritm diurn. Memantina oferă doar beneficii paliative pacienților. Explicația posibilă pentru această problemă ar putea fi disfuncția complexă a neurotransmițătorilor care caracterizează BA, ceea ce sugerează că modularea unui singur sistem de neurotransmițători nu este adecvată pentru controlul bolii. Există dovezi, care indică o conexiune reciprocă de feedback între sistemele glutamatergic și colinergic, cu influență importantă asupra funcțiilor cognitive. Mai mult, eșecul echilibrului homeostatic de calciu care rezultă din supraactivarea NMDA-receptorilor, precum și dishomeostazia metalelor (Fe, Zn, Cu) ar putea explica mai multe caracteristici patologice, inclusiv deteriorarea oxidativă, neuroinflamația și plierea și agregarea greșită a proteinelor, toate contribuind la neurotoxicitatea mediată de leziuni excitotoxice. Memantina este disponibilă sub forme medicamentoase cu eliberare imediată și prelungită, precum și în combinație cu donepezil. Combinația IACE cu memantină pare să aibă beneficii sinergice, așa că este o practică standard în tratamentul BA moderată până la severă [3,17].

#### **Preparatele cu influență asupra proceselor amiloide.**

Procesele neurodegenerative în BA sunt atribuite parțial efectelor  $\beta A$  și proteinei tau hiperfosforilată. Mai multe forme familiale de BA au fost legate de mutații genetice care modifică producția de amiloid. Studiile cu biomarkeri în lichidul cefalorahidian (LCR) au arătat, de asemenea, că peptidele  $\beta A_{42}$  scad cu 1-2 decenii înainte de apariția simptomelor în BA. Deși s-a demonstrat că agregatele insolubile și dimerii solubili de amiloid provoacă toxicitate sinaptică, se consideră că agregatele solubile corelează mai bine cu simptomele de BA și severitatea bolii. Agenții terapeutici au fost dezvoltați pentru a reduce diferite forme de  $\beta A$  patologic, pentru a întrerupe agregarea  $\beta A$  sau pentru a crește clearance-ul  $\beta A$  din SNC [3].

#### **Inhibitori de $\beta$ -secretază.**

Proteina precursoră a  $\beta$ -amiloidului (PP $\beta A$ ) este o glicoproteină membranară prezentă în neuroni, care prin procesarea enzimatică secvențială de către aspartil proteazele,  $\beta$ - și  $\gamma$ -secretaza, determină creșterea producției de peptide  $\beta$ -amiloide (fig.2). Procesarea PP $\beta A$  poate avea loc pe calea amiloidogenă (prin  $\beta$ -secretază) și nonamiloidogenă (prin  $\alpha$ -secretază și apoi  $\gamma$ -secretază). Prin calea amiloidogenă, PP $\beta A$  este inițial scindată de către  $\beta$ -secretază cu eliberarea unui

fragment de 99 de aminoacizi, care apoi este supus unei serii de scindare de către  $\gamma$ -secretază cu producerea de peptide  $\beta$ -amiloidice de lungimi diferite, dintre care  $\beta$ A38, 40 și 42 sunt cele mai abundente în lichidul cefalorahidian. Calea amiloidogenă este considerată o etapă cheie pentru generarea  $\beta$ A, iar  $\beta$ -secretaza și  $\gamma$ -secretaza sunt considerate a fi ținte terapeutice potențiale pentru a preveni producerea de peptide  $\beta$ -amiloidice toxice. În ciuda multor eforturi depuse pentru a dezvolta inhibitori ai  $\beta$ -secretazei pentru utilizare clinică în BA, dezvoltarea timpurie a acestora a eșuat din cauza biodisponibilității orale scăzute, penetrării reduse a BHE și a toxicității hepatice [13,27].

Au fost elaborați un șir de inhibitori de  $\beta$ -secretază verubecestat, elenbecestat, lanabecestat, umibecestat și atabecestat. Inhibitorii de  $\beta$ -secretază în studiile clinice au demonstrat capacitatea de a reduce nivelul de  $\beta$ A cu 90% în plasmă și cu 60-71% în LCR, dar nu au dovedit că produc beneficii cognitive, clinice sau funcționale în studiile randomizate controlate mari, iar în unele chiar au agravat evoluția BA. Concomitent, inhibitori de  $\beta$ -secretază au avut un profil de siguranță mic (hepatotoxicitate) și un raport risc/beneficiu nefavorabil [5,9,13,22,26].

În prezent s-au evidențiat  $\beta$ -secretaze tip 1 și 2, situsurile active ale cărora sunt structural foarte asemănătoare, iar majoritatea inhibitorilor blochează ambele tipuri. Beta-secretaza tip 2 este exprimată în principal la periferie și joacă un rol important în pancreas, unde controlează proliferarea și activitatea  $\beta$ -celulelor. Mai mult, s-a descoperit că blocarea activității  $\beta$ -secretazei tip 1 determină efecte secundare bazate pe mecanism,

precum și că aceasta scindează o serie de substraturi implicate în mielinizare, circuite neuronale, homeostazia retinei și funcția sinaptică. Pentru a optimiza studiile clinice cu inhibitori de  $\beta$ -secretază tip 1 de generație următoare, ar trebui să fie luate în considerare: raționalitatea biologică pentru  $\beta$ -secretază tip 1 ca țintă farmacologică; 2) acțiunea selectivă  $\beta$ -secretază tip 1/2 a medicamentului și controlul efectului farmacologic prin ajustarea dozei, precum și raportul beneficiu/risc; 3) momentul intervenției cu inhibitorii  $\beta$ -secretazei tip 1 pe parcursul BA [9].

### Modulatori ai $\gamma$ -secretazei.

Gama-secretaza este un complex intramembranar de proteaze, responsabil pentru scindarea PP $\beta$ A și producerea de peptide  $\beta$ -amiloidice neurotoxice. După procesarea PP $\beta$ A de  $\beta$ -secretază tip 1, fragmentul C99 rezultat este scindat de  $\gamma$ -secretază cu generarea de  $\beta$ A40 și  $\beta$ A42. Au fost dezvoltați un număr mare de inhibitori potențiali ai  $\gamma$ -secretazei, inclusiv semagacestat și avagacestat. Studiile experimentale au demonstrat capacitatea acestora de a reduce semnificativ nivelul  $\beta$ A40 în creier, plasmă și lichid cefalorahidian, iar testările clinice nu au arătat o eficacitate evidentă sau chiar au înrăutățit funcția cognitive, precum și o incidență crescută a efectelor adverse. A doua generație de medicamente care vizează  $\gamma$ -secretaza a fost elaborată pentru a îmbunătăți profilul de siguranță prin modificarea activității proteolitice a enzimei, determinând-o să interacționeze cu forme mai scurte de  $\beta$ A. Acești compuși au fost numiți modulatori ai  $\gamma$ -secretazei și oferă o alternativă mai sigură pentru reducerea toxicității  $\beta$ A42 în tratamentul BA [7,24].

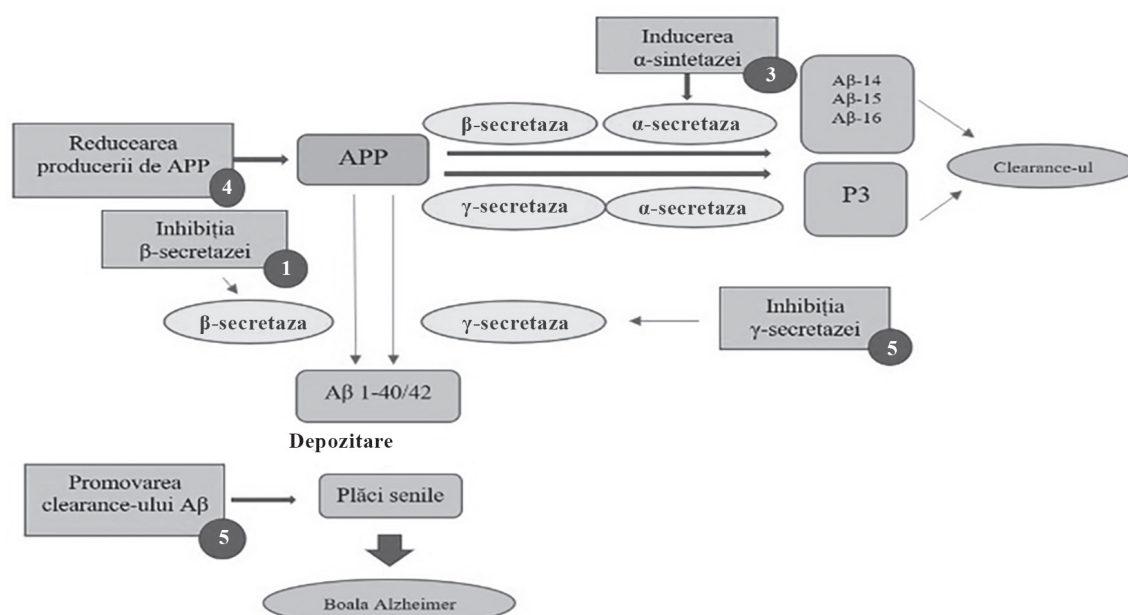


Figura 2. Strategia de dezvoltare a medicamentelor pentru metabolismul  $A\beta$  [27].

- (1) inhibiția  $\beta$ -secretazei; (2) inhibarea  $\gamma$ -secretazei; (3) inducerea  $\alpha$ -secretazei; (4) reducerea producerii de PP $\beta$ A; (5) promovarea clearance-ului  $\beta$ A.

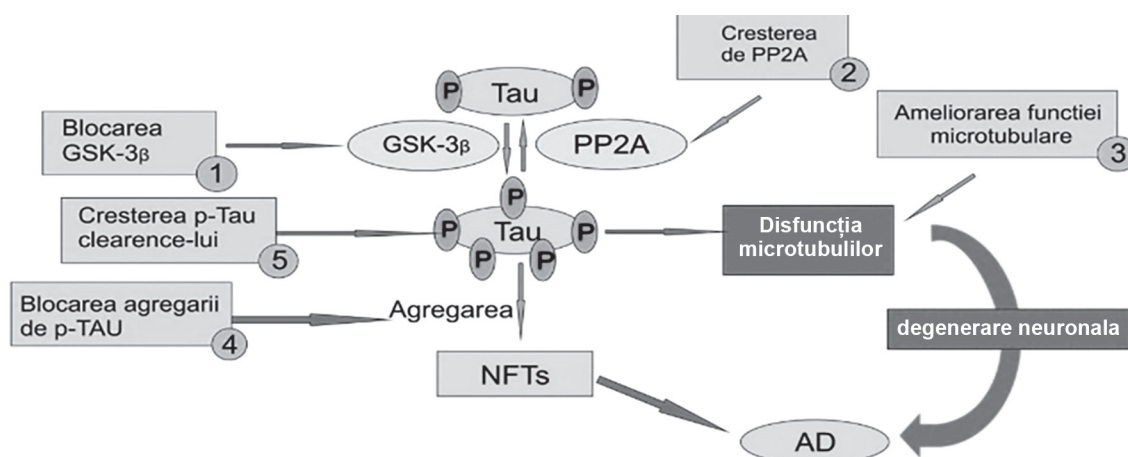


Figura 3. Mecanismul patologic al proteinei tau și strategiile de dezvoltare a medicamentelor [27].

- (1) inhibarea activității GSK-3 $\beta$ ; (2) promovarea activității PP2A; (3) îmbunătățirea funcției microtubulilor; (4) inhibarea agregării proteinei tau; (5) promovarea clearance-ului proteinei tau

**Agenți imunoterapeutici pasivi** (aducanumab, lecanemab, donanemab, gantenerumab, crenezumab). Eșecul inhibitorilor secretazelor în terapia BA au determinat cercetătorii să dezvolte agenți imunoterapeutici pasivi, soluții de anticorpi monoclonali create în sisteme biologice pentru perfuzie pentru a reduce efectele periferice și centrale ale  $\beta$ A42. Aducanumab, un anticorp monoclonal uman anti- $\beta$ A, vizează selectiv formele agregate de  $\beta$ A, inclusiv oligomeri solubili și fibrile insolubile. Aducanumabul, administrat prin perfuzie, penetrează în SNC și scade  $\beta$ A cu o reducere semnificativă a plăcii în BA prodromală sau ușoară într-o manieră dependentă de timp și doză. La subiecții care au primit cea mai mare doză de 10 mg/kg, cercetătorii au raportat o scădere semnificativă a progresiei deficienței cognitive. Aducanumabul a fost aprobat de FDA în iunie 2021 pentru tratamentul BA cu condiția ca un studiu de fază IV să evalueze cu atenție eficacitatea și siguranța acestuia. Ulterior, pe fundalul unor controverse cu privire la procesul de aprobare accelerat care a avut loc în ciuda dovezilor limitate privind beneficiul tratamentului, FDA a revizuit indicația medicamentului pentru a-și direcționa utilizarea către tulburările cognitive ușoare legate de BA sau demența ușoară [3,19].

Lecanemabul, o versiune umanizată IgG1 a unui anticorp monoclonal murin, se leagă selectiv la protofibrile  $\beta$ A solubile mari. S-a dovedit că lecanemabul încetinește declinul cognitiv, crește nivelul de  $\beta$ A în LCR (care scad în BA) și reduce nivelul de PT. Trei studii clinice sunt în curs de desfășurare, care analizează eficacitatea și siguranța în rândul subiecților cu BA timpurie; eficacitate și siguranță în rândul subiecților BA preclinici și preclinici timpurii cu amiloid timpuriu și intermediar; siguranța, eficacitatea și tolerabilitatea diferitor doze la pacienții cu BA precoce [3].

Donanemabul, o imunoglobulină direcționată către o țintă moleculară prezentă numai în plăcile

de amiloid din creier, la subiecții cu BA timpurie, a demonstrat o oarecare îmbunătățire a scorurilor cognitive și a capacității de a face activități de zi cu zi. Un studiu a explorat siguranța și tolerabilitatea la majorarea dozei unice și de doze multiple și a arătat o reducere a amiloidului cu 40-50% și că 90% dintre subiecți au dezvoltat anticorpi împotriva medicamentelor la trei luni după o singură doză [3].

Gantenerumabul, un anticorp monoclonal în faza de cercetare, are o afinitate de 20 de ori mai mare pentru oligomerii decât monomerii  $\beta$ A. Studiile clinice de fază II au relevat efecte dependente de doză care indică faptul că la doze mai mari se poate produce o reducere robustă a amiloidului după doi ani. Studiile în desfășurare evaluează farmacodinamia la administrarea subcutanată, siguranța și tolerabilitatea administrării pe termen lung, siguranța și eficacitatea în rândul subiecților cu BA timpurie, precum și siguranța, tolerabilitatea, biomarkerul și eficacitatea cognitivă în rândul BA cu debut precoce genetic [3].

Crenezumabul, un anticorp monoclonal, se leagă de monomeri și forme agregate de  $\beta$ A, cu o afinitate de 10 ori mai mare pentru oligomeri comparativ cu gantenerumabul. Studiile în desfășurare evaluează crenezumabul și efectul său asupra proteinei tau în rândul purtătorilor și non-purtători ai mutației presenelinei și eficacității în rândul BA preclinic [3].

### Terapii care vizează proteina tau (PT).

Fosforilarea PT pare să reprezinte una dintre cele mai critice etape patogene ale tauopatiei, iar kinazele și fosfatazele implicate în hiperfosforilarea și respectiv defosforilarea PT reprezintă ținte enzimactice excelente pentru terapia anti-tau (fig.3). Printre acestea se pot enumăra: inhibitorii glicogen sintaza kinaza 3 $\beta$ ; promovarea activității PP2A; îmbunătățirea funcției microtubulilor; inhibarea agregării proteinei tau; promovarea clearance-ului proteinei tau [27].

Proteina Tau- proteină de legare a microtubulilor, care formează încurcături neurofibrilare, este un alt semn distinctiv histopatologic care caracterizează BA. S-a descoperit că acumularea PT corelează mai strâns cu severitatea demenței decât încărcarea cu amiloid. Există dovezi că acumularea de  $\beta$ A poate exacerba patologia tau și invers. S-a descoperit că PT mediază cel puțin parțial unele dintre efectele toxice ale  $\beta$ A care duc la pierderea sinapselor, simplificarea dendritică și eventual moartea celulelor în BA. Inițial abordările pentru terapiile pe bază de tau s-au concentrat pe inhibarea kinazelor, agregarea tau sau stabilizarea microtubulilor. Cele mai multe dintre aceste studii au fost întrerupte din cauza toxicității sau a lipsei de eficacitate. Studiile actuale se concentrează pe imunoterapiile tau. Modificările post-tranlaționale și pierderea ulterioară a legării microtubulilor și a plierii greșite a tau duc la niveluri crescute de tau în citosol, făcând aceste procese ținte viabile. Alte ținte semnificative includ perturbarea citoscheletului și deteriorările mecanismelor de degradare a proteinelor [3].

#### **Inhibarea agregării Tau.**

Albastrul de metilen (AM) un medicament utilizat în multe afecțiuni datorită rolului său în promovarea activității mitocondriale, precum și în atenuarea neuroinflamației. În studiile experimentale s-a demonstrat că AM reduce nivelul de  $\beta$ A și îmbunătățește învățarea și memoria prin creșterea clearance-ului  $\beta$ A. S-a descoperit că inversează agregarea tau și promovează clearance-ul filamentelor tau prin inducerea autofagiei. Rezultatele cercetărilor experimentale nu au demonstrat beneficii semnificative în studiile clinice, posibil datorită faptului că AM reduce numărul de fibrile tau, dar crește numărul de oligomeri tau granulari, despre care se crede că sunt esențiali pentru moartea neuronală [3,19].

Curcumina, produs vegetal natural cu proprietati antioxidante și antiinflamatoare, se leagă direct de foile de proteine  $\beta$ -pliate și previne agregarea. În cercetările experimentale s-a demonstrat, că reduce patologia tau și  $\beta$ A și ameliorează deficiturile cognitive, dar care nu au fost confirmate în studiile clinice. Dezvoltarea clinică a curcuminei a fost împiedicată datorită biodisponibilității reduse, solubilității slabe în apă la pH neutru sau acid, instabilității la un pH bazic și glucuronizării intestinale rapide [3].

#### **Modificări post-tranlaționale.**

Proteina fosfataza 2A (PP2A) este o proteină care reglează căile de semnalizare. Selenatul de sodiu este un agent antitumoral care s-a dovedit a fi un activator puternic al PP2A și reduce fosforilarea tau în studiile pe animale în BA. Într-un studiu de fază IIa, s-a dovedit a fi sigur și bine tolerat, dar nu s-a continuat cu studiile ulterioare de eficacitate. Un studiu recent a folosit

selenatul de sodiu ca supliment oral pentru a încetini neurodegenerarea, pe baza ipotezei că aprovizionarea insuficientă cu seleniu pentru enzimele antioxidante poate contribui la dezvoltarea BA.

Glicogen sintaza kinaza 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) este prezentă în creier și o țintă cheie care reglează fosforilarea PT, precum și implicată în procesarea amiloidului și transcripția genelor. Tideglusibul, singurul inhibitor GSK-3 $\beta$  aflat în prezent în studiile clinice de fază II pentru tratamentul BA și al paraliziei supranucleare progresive, reduce fosforilarea PT și previne moartea apoptotică în celulele neuroblastomului uman și 66 de neuroni primari murini. În studiu de fază II pe termen scurt (26 de săptămâni) la pacienți cu BA a fost demonstrat un profil de siguranță acceptabil și a întârziat pierderea volumului creierului, dar nu a produs niciun beneficiu clinic. Litiul, un alt inhibitor al GSK-3 $\beta$ , în studiile la pacienții cu BA a determinat o reducere a nivelurilor de fosfo-tau și stabilizarea simptomelor cognitive. Meta-analiză studiilor clinice referitor la inhibitorii GSK-3 $\beta$  au demonstrate ineficiența acestora în tratarea BA, studiile fiind considerate statistic ne semnificative [3,4,13].

#### **Stabilizarea microtubulilor.**

Compușii care stabilizează microtubulii pot avea potențial terapeutic, deoarece perturbarea mecanismelor de transport bazate pe microtubuli contribuie la degenerarea sinaptică. Epiritona D, o moleculă capabilă să pătrundă prin BHE, s-a dovedit a crește numărul de microtubuli și reduce numărul de axoni în studiile pe animale. Abeotaxanul, un alt compus de stabilizare a microtubulilor, în studiile experimentale a demonstrat proprietăți de a reduce hiperfosforilarea PT în creier și de a îmbunătăți performanța. Studiile clinice la pacienții cu BA, paralizie supranucleară progresivă și sindrom corticobazal au relevat reacții de hipersensibilitate severe și agravări clinice. Davenutida, o peptidă de 8 aminoacizi, derivată din proteina neuroproteotoare dependentă de activitate, în studiile experimentale s-a dovedit că joacă un rol pozitiv în atenuarea deficiturilor induse de  $\beta$ A1-42 în memoria spațială și plasticitatea sinaptică. Preparatul stabilizează microtubulii și reduce nivelul PT hiperfosforilate. Într-un studiu de fază I, s-a constatat că posedă o tolerabilitate bună la administrarea intranasală cu o potențială eficacitate în două teste de memorie și atenție, nu s-a reușit să detecteze o diferență semnificativă statistic asupra scorurilor compozite ale memoriei cognitive [3].

#### **Abordări de imunizare Tau.**

Imunizarea activă și pasivă împotriva peptidelor fosfo-tau au potențialul de a modula patologia tau. Anticorpii trec prin bariera hematoencefalică în creier. Un vaccin candidat activ este AADvac1 care vizează PT nefosforilată. În studiul de fază I, paci-

enților li s-au administrat 3 doze de vaccin. Aproape toți au dezvoltat un răspuns imun IgG. Cel mai frecvent efect advers au fost reacțiile la locul injectării. Nu au existat cazuri de meningoencefalită sau edem vasogenic după administrare. A fost efectuat un studiu de urmărire pe aceeași populație, cu administrarea încă a trei doze, plus două rapeluri, având ca obiectiv principal determinarea siguranței pe termen lung. Cel mai frecvent eveniment advers raportat a fost din nou reacția locală la locul injectării, fără cazuri de meningoencefalită sau edem vasogen. Titrurile de IgG au regresat în timp, indicând necesitatea unor rapeluri mai frecvente. S-a observat o tendință de atrofiere mai lentă la RMN și pare să existe un declin mai lent al evaluării cognitive la cei cu titruri mai mari. ACI-35 este un alt vaccin activ care vizează PT fosforilată. În studiile pe animale, s-a observat o reducere a concentrației solubile și tau insolubil. De asemenea, vaccinul nu a indus o inflamație marcată a SNC în ciuda epitopilor multipli. Un studiu de fază Ib-IIa este în curs de desfășurare pentru a determina siguranța, tolerabilitatea și imunogenitatea vaccinului ACI-35 [3].

#### **Imunizarea pasivă.**

Imunizarea pasivă poate oferi o posibilă soluție la preocupările legate de efectele secundare imunologice ale imunizării active. Există o specificitate mai mare pentru epitopul țintă și este posibil ca efectele imunizării să fie tranzitorii. S-a demonstrat că anticorpii anti-tau pătrund în neuroni și se leagă de un receptor citosol care în cele din urmă duce la degradarea proteozomală a complexului și inhibarea agregării intracelulare tau. Gosuranemabul, o IgG4 monoclonală, recunoaște un situs în regiunea N-terminală. S-a dovedit sigur și bine tolerat, fără efecte adverse. Un studiu de fază II la pacienții cu BA ușoară, evaluează siguranța și tolerabilitatea, imunogenitatea și eficacitatea dozelor multiple de Gosuranemab pentru încetinirea afectării cognitive și funcționale [3,19].

Tilavonemabul, un anticorp IgG4 destinat să funcționeze extracelular, blochează *in vitro* absorbția și inhibă agregarea semînțelor de tau. În studiile de fază I nu au fost raportate reacții adverse, iar în fază II au fost incluși pacienți cu BA, studiul se află încă în curs de desfășurare. Zagotenemabul este o versiune umanizată a anticorpului IgG1 MC-1 cu epitopul său principal localizat în regiunea N-terminală. Studiul inițial de fază I a evaluat siguranța, tolerabilitatea și farmacocinetica la indivizi sănătoși și cei cu BA ușoară până la moderată. Un studiu de fază II este în curs de evaluare a eficacității în rândul pacienților cu BA simptomatică timpurie. Semorinemabul, este un anticorp conceput pentru a lega și intercepta PT în creierul extracelular. Rezultatele inițiale de fază I nu au arătat toxicități limitate de doză și nici efecte adverse grave. Studiul de fază II privind BA prodromală până

la ușoară a vizat măsurile de siguranță, cel de fază II pe BA moderată este încă în desfășurare [3,19].

#### **Imunoterapie anti- $\beta$ A.**

Una dintre cele mai atractive abordări este imunoterapia direcționată anti-amiloid, care este considerată o descoperire majoră. Această abordare include atât imunizarea pasivă, care constă într-o injecție de anticorpi pre-preparați, cât și imunizarea activă în care sistemul imun este stimulat să-și producă proprii anticorpi prin administrarea unui vaccin. S-a raportat că atât imunizarea anti- $\beta$ A activă, cât și pasivă la șoarecii transgenici conduc la îndepărtarea plăcilor amiloide existente și la prevenirea degenerării sinaptice în asocieră cu beneficii cognitive [18].

Primul vaccin A $\beta$  activ, AN1792, a produs titruri de anticorpi anti-A $\beta$  la pacienții cu AD ușoară până la moderată. Din cauza efectelor secundare severe care au inclus meningoencefalită aseptică observată la aproximativ 6% dintre pacienții cu AD vaccinați, studiul de fază II a fost încheiat în ianuarie 2020. Examinarea post-mortem a arătat o încărcare  $\beta$ A scăzută a creierului, cu dovezi că plăcile au fost îndepărtate și proteina tau redusă în procesele neuronale, dar fără dovezi ale unui efect benefic asupra sinapselor, ameliorare clinică semnificativă a cogniției sau a declinului funcțional în comparație cu placebo. Panza F, 2020. În general, reacțiile de meningoencefalită au fost atribuite răspunsului celulelor T. În studiul de fază IIa, în care reacțiile de meningoencefalită au fost mai frecvente decât în studiul de fază I, răspunsurile celulelor T la amiloid au aparținut celulelor Th1 și s-a emis ipoteza că meningoencefalita ar putea fi asociată cu celulele CD4, care sunt proinflamatorii sau cu celule citotoxice CD8. Epitopul anticorpilor a fost similar în studiul de fază I și în faza II. Polisorbitat 80, utilizat în studiul de fază II, a fost considerat o posibilă explicație pentru polarizarea diferită a răspunsului celulelor T în diferite studii [10,16].

S-a dovedit că vaccinul CAD106 de a doua generație dezvoltat ulterior reduce acumularea de  $\beta$ A și induce un răspuns imun substanțial anti- $\beta$ A cu tolerabilitate și siguranță în studiile de fază II. Cu toate acestea, nu au fost detectate modificări semnificative ale nivelurilor de  $\beta$ A în LCR și au fost observate, de asemenea, unele efecte adverse ca rinofaringită și eritem la locul de injectare. În studiul actual de fază IIb, CAD106 a provocat un răspuns imun specific cu activitate în SNC și un profil de siguranță acceptabil [13].

Prin administrarea unui vaccin care conține antigene adecvate, imunoterapia activă a demonstrat efecte benefice asupra clearance-ului amiloidului. Cu toate acestea, unul dintre cele mai mari dezavantaje ale vaccinării active este diversitatea răspunsurilor. Sistemul imun al pacienților vârstnici poate, în loc să producă



anticorpii corespunzători, să genereze efecte secundare autoimune. Imunoterapia pasivă implică administrarea directă de anticorpi anti-Amiloid fără a fi nevoie ca pacienții să dezvolte vreun răspuns cu anticorpi, evitând declanșarea autoimunității mediate de Th1. Ca terapie alternativă, imunizarea pasivă a fost considerată mai sigură și mai controlabilă decât imunizarea activă [13].

### Concluzii.

Boala Alzheimer reprezintă o maladie neurodegenerativă cu o fiziopatologie complexă, iar cauzele declanșării acesteia sunt determinate de mai mulți factori, importanța cărora diferă de la o persoană la alta. Terapiile medicamentoase existente ameliorează parțial simptomele bolii, iar elaborarea medicamentelor capabile să stagneze progresia bolii și să amelioreze semnificativ starea cognitivă a pacienților rămâne un imperativ al timpului. Medicamentele care vizează  $\beta$  amiloidul (formarea, acumularea, clearance-ul) și proteina tau, considerate esențiale în patogenia bolii, sunt în diferite faze ale studiilor clinice, iar raportul beneficiu/risc pentru multe din ele s-a dovedit a fi nefavorabil, iar cercetările în direcția dată continuă. Totodată, imunoterapia pasivă sau activă rămâne o strategie cu rezultate promițătoare, care, de asemenea, necesită cercetări suplimentare și evaluare în timp.

### Bibliografie

- Baakman A.C., Hart E., Kay D.G. et al. *First in human study with a prodrug of galantamine: Improved benefit-risk ratio?*. *Alzheimers Dement* (NY). 2016;2(1):13-22. Published 2016 Jan 20. doi:10.1016/j.trci.2015.12.003
- Boche D., Nicoll J.A.R. *Invited Review – Understanding cause and effect in Alzheimer's pathophysiology: Implications for clinical trials*. *Neuropathology and applied neurobiology*. 2020;46:623-640.
- Bomasang-Layno E., Bronshter R. *Diagnosis and Treatment of Alzheimer's Disease: An Update*. *Dela J Public Health*. 2021 Sep 27;7(4):74-85. doi: 10.32481/djph.2021.09.009.
- Congdon E.E., Sigurdsson E.M. *Tau-targeting therapies for Alzheimer disease*. *Nat Rev Neurol*. 2018 Jul;14(7):399-415. doi: 10.1038/s41582-018-0013-z.
- Egan M.F., Kost J., Voss T. et al. *Randomized Trial of Verubecestat for Prodromal Alzheimer's Disease*. *N Engl J Med*. 2019;380(15):1408-1420. doi:10.1056/NEJMoa1812840
- Folch J., Busquets O., Ettcheto M. et al. *Memantine for the Treatment of Dementia: A Review on its Current and Future Applications*. *J Alzheimers Dis*. 2018;62(3):1223-1240. doi: 10.3233/JAD-170672.
- Golde T.E., Koo E.H., Felsenstein K.M. et al.  *$\gamma$ -Secretase inhibitors and modulators*. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Dec;1828(12):2898-907. doi: 10.1016/j.bbamem.2013.06.005. Epub 2013 Jun 17.
- Graham W.V., Bonito-Oliva A., Sakmar T.P. *Update on Alzheimer's Disease Therapy and Prevention Strategies*. *Annu Rev Med*. 2017 Jan 14;68:413-430. doi: 10.1146/annurev-med-042915-103753.
- Hampel H., Vassar R., De Strooper B. et al. *The  $\beta$ -Secretase BACE1 in Alzheimer's Disease*. *Biol Psychiatry*. 2021 Apr 15;89(8):745-756. doi: 10.1016/j.biopsych.2020.02.001. Epub 2020 Feb 13.
- Hoskin J.L., Al-Hasan Y., Sabbagh M.N. *Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonists for the Treatment of Alzheimer's Dementia: An Update*. *Nicotine Tob Res*. 2019;21(3):370-376. doi:10.1093/ntr/nty116.
- Hoskin J.L., Sabbagh M.N., Al-Hasan Y., Decourt B. *Tau immunotherapies for Alzheimer's disease*. *Expert opinion on investigational drugs*. 2019;28:545-554.
- Huang L.K., Chao S.P., Hu C.J. *Clinical trials of new drugs for Alzheimer disease*. *J Biomed Sci*. 2020;27(1):18. doi:10.1186/s12929-019-0609-7.
- Lao K., Ji N., Zhang X. et al. *Drug development for alzheimer's disease: Review*. *Journal of Drug Targeting*, 2019; 27(2), 164-173. doi.org/10.1080/1061186X.2018.1474361.
- Loera-Valencia R., Cedazo-Minguez A., Kenigsberg P.A. et al. *Current and emerging avenues for Alzheimer's disease drug targets*. *J Intern Med*. 2019 Oct; 286(4):398-437. doi: 10.1111/joim.12959.
- Ma K.G., Qian Y.H. *Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor and its effects on Alzheimer's disease*. *Neuropeptides*. 2019 Feb;73:96-106. doi: 10.1016/j.npep.2018.12.003.
- Mantile F., Prisco A. *Vaccination against  $\beta$ -Amyloid as a Strategy for the Prevention of Alzheimer's Disease*. *Biology*. 2020; 9(12):425. doi.org/10.3390/biology9120425.
- Marotta G., Basagni F., Rosini M., Minarini A. *Memantine Derivatives as Multitarget Agents in Alzheimer's Disease*. *Molecules* (Basel, Switzerland). 2020;25:4005.
- Panza F., Lozupone M., Logroscino G., Imbimbo B.P. *A critical appraisal of amyloid- $\beta$ -targeting therapies for Alzheimer disease*. *Nat Rev Neurol*. 2019 Feb;15(2):73-88. doi: 10.1038/s41582-018-0116-6.
- Parums D.V. *Editorial: Targets for Disease-Modifying Therapies in Alzheimer's Disease, Including Amyloid  $\beta$  and Tau Protein*. *Med Sci Monit*. 2021;27:e934077. doi:10.12659/MSM.934077.
- Pinheiro L., Faustino C. *Therapeutic Strategies Targeting Amyloid- $\beta$  in Alzheimer's Disease*. *Curr Alzheimer Res*. 2019;16(5):418-452. doi: 10.2174/1567205016666190321163438.
- Pohanka M. *Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor is a target in pharmacology and toxicology*. *Int J Mol Sci*. 2012;13(2):2219-2238. doi:10.3390/ijms13022219.
- Sur C., Kost J., Scott D. et al. *BACE inhibition causes rapid, regional, and non-progressive volume reduction in Alzheimer's disease brain*. *Brain*. 2020 Dec 1;143(12):3816-3826. doi: 10.1093/brain/awaa332.
- Toniolo S., Sen A., Husain M. *Modulation of Brain Hyperexcitability: Potential New Therapeutic Approaches in Alzheimer's Disease*. *Int J Mol Sci*. 2020 Dec 7;21(23):9318. doi: 10.3390/ijms21239318.
- Wolfe M.S. *Probing Mechanisms and Therapeutic Potential of  $\gamma$ -Secretase in Alzheimer's Disease*. *Molecules*. 2021 Jan 13;26(2):388. doi: 10.3390/molecules26020388.
- Wong K.H., Riaz M.K., Xie Y. et al. *Review of Current Strategies for Delivering Alzheimer's Disease Drugs across the Blood-Brain Barrier*. *Int J Mol Sci*. 2019 Jan 17;20(2):381. doi: 10.3390/ijms20020381.
- Yiannopoulou K.G., Papageorgiou S.G. *Current and Future Treatments in Alzheimer Disease: An Update*. *J Cent Nerv Syst Dis*. 2020; 12: 1179573520907397. doi:10.1177/1179573520907397.
- Zhu C., Fu S., Chen Y. et al. *Advances in Drug Therapy for Alzheimer's Disease*. *CURR MED SCI* 2020;40,999-1008. doi.org/10.1007/s11596-020-2281-2.