

Promjene inzulinskog signalnog puta u olfaktornom bulbusu eksperimentalnog štakorskog modela sporadične Alzheimerove bolesti

Vađunec, Dalia

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:084701>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Dalia Vadunec

**Promjene inzulinskog signalnog puta u
olfaktornom bulbusu eksperimentalnog
štakorskog modela sporadične Alzheimerove
bolesti**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Farmakologija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Jelene Osmanović Barilar i izv. prof. dr. sc. Lidije Bach-Rojecky sa Zavoda za farmakologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Ovaj diplomski rad posvećen je mojoj baki Marici koja me naučila temeljnim životnim vrijednostima te da prije svega u životu treba biti čovjek.

Prvo želim zahvaliti svojoj obitelji, pogotovo roditeljima, na ljubavi, podršci i vjeri u mene tijekom svih godina mojeg školovanja, posebice studija. Najveće hvala ide mojim nećacima „pikićima“ koji su mi uveseljavali studentske dane i naučili me novoj dimenziji ljubavi. Hvala svim mojim prijateljima, naročito onima koje sam stekla tijekom studija i koji smo se zajedno bo(d)rili, a i onim kolegama koje sam upoznala preko rada u Udruzi i raznih projekata, hvala vam na Kongresu 2016. i svim PCE-ovima!

Zahvaljujem svima koji su pomogli u izradi eksperimentalnog dijela diplomskog rada, Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, osobito komentorici doc. dr. sc. Jeleni Osmanović Barilar na izdvojenom vremenu, strpljenju, volji i žaru u prenošenju znanja i svojih iskustva, ali i učenju raznih metoda u laboratoriju. Hvala i ostalim djelatnicima Zavoda koji su mi prenijeli šarolika znanja te omogućili da se uvijek osjećam ugodno i dobrodošlo.

*Želim zahvaliti i prekrasnom Zavodu za farmakologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta na kojem sam zaista provela najljepše trenutke svojeg studija. Neopisivo i beskrajno hvala mojoj predragoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Lidiji Bach-Rojecky. Ne samo da ste mi kroz kolegij Farmakologija prenijeli znanje i injektirali ljubav prema našoj predivnoj struci, nego i što ste me naučili znanstveno i kritički razmišljati te podržavali i poticali u brojnim idejama. Uza sve to, uvijek ste imali vremena biti oslonac, savjetnik i motivator kad je zapelo. Mogla bih stranice ispisati koliko ste mi dobra donijeli na profesionalnoj i privatnoj razini, zato ću još samo jednom, iskreno iz dubine srca reći: **HVALA!***

I za kraj, hvala mom voljenom Borni na gotovo 12 godina bezuvjetne ljubavi i prekrasnih trenutaka, bez tebe/nas sve ovo ne bi imalo smisla i s tobom je samo nebo granica. Hvala ti na svakom „pogurancu“ kad je bilo teško, na svakoj obrisanoj suzi jer sam „kmečalo“, na svakom izmamljenom osmijehu kad sam „mrgud“ ... „Hvala-molim“ ...

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Povijest i epidemiologija Alzheimerove bolesti	1
1.2. Patofiziologija Alzheimerove bolesti	3
1.2.1. Nasljedna (obiteljska) i sporadična Alzheimerova bolest	3
1.2.2. Histopatološke promjene u Alzheimerovoj bolesti	5
1.2.3. Inzulinsko rezistentno stanje u mozgu	9
1.2.3.1. Inzulin i inzulinski receptor u mozgu.....	9
1.2.3.2. Inzulinska signalizacija u mozgu kod sporadične Alzheimerove bolesti.....	11
1.2.4. Patofiziološke promjene u olfaktornom bulbusu.....	13
1.3. Klinička slika Alzheimerove bolesti	15
1.4. Mogućnosti, ograničenja i izazovi u farmakoterapiji Alzheimerove bolesti	16
1.4.1. Farmakološke mogućnosti – dostupni lijekovi.....	17
1.4.2. Nefarmakološke mjere	17
1.4.3. Liječenje Alzheimerove bolesti u budućnosti	18
2. OBRAZLOŽENJE TEME	20
3. MATERIJALI I METODE	21
3.1. Životinje i tkivo.....	21
3.1.1. Eksperimentalni modeli Alzheimerove bolesti	21
3.1.2. Eksperimentalni protokol – priprema tkiva za <i>Western blot</i> analizu	23
3.2. Korištene kemikalije, reagensi i protutijela	23
3.3. Western blot metoda	26
3.4. Analiza i statistička obrada podataka	30
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	31
4.1. Ekspresija inzulinskog receptora u olfaktornom bulbusu jedan i tri mjeseca nakon STZ-icv primjene u dozama od 0,3 mg/kg, 1,0 mg/kg i 3,0 mg/kg	31

4.2. Ekspresija enzima koji razgrađuje inzulin u olfaktornom bulbusu jedan i tri mjeseca nakon STZ-icv primjene u dozama od 0,3 mg/kg, 1,0 mg/kg i 3,0 mg/kg	33
4.3. Ekspresija ukupnog tau proteina u olfaktornom bulbusu jedan i tri mjeseca nakon STZ-icv primjene u dozama od 0,3 mg/kg, 1,0 mg/kg i 3,0 mg/kg	35
4.4. Ekspresija hiperfosforiliranih oblika tau proteina u olfaktornom bulbusu jedan i tri mjeseca nakon STZ-icv primjene u dozama od 0,3 mg/kg, 1,0 mg/kg i 3,0 mg/kg	37
5. ZAKLJUČCI	42
6. LITERATURA	43
7. SAŽETAK/SUMMARY	49
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO) demencija je definirana kao sindrom praćen pogoršanjem pamćenja, razmišljanja i ponašanja koji rezultiraju smanjenjem sposobnosti osobe u obavljanju svakodnevnih životnih aktivnosti. Premda demencija zahvaća stariju populaciju, ona nije normalna faza procesa starenja. Postoji puno različitih oblika demencija koje su podijeljene s obzirom na patološke promjene, manifestaciju i prevalenciju. Alzheimerova bolest (AB) najčešći je oblik demencije sa zastupljenošću 60-70%. Svakako valja izdvojiti i druge učestale oblike demencija kao što su primjerice vaskularna demencija, demencija s Lewyjevim tjelešcima, frontotemporalna demencija i brojne druge. Osim što demencije, a među njima najviše AB imaju fizički, psihološki i socijalno-ekonomski utjecaj na oboljelog pojedinca, predstavljaju enormni globalni teret budući da je učinak bolesti vidljiv unutar njihovih obitelji, ali i u društvu kao zajednici. (<http://www.who.int/>)

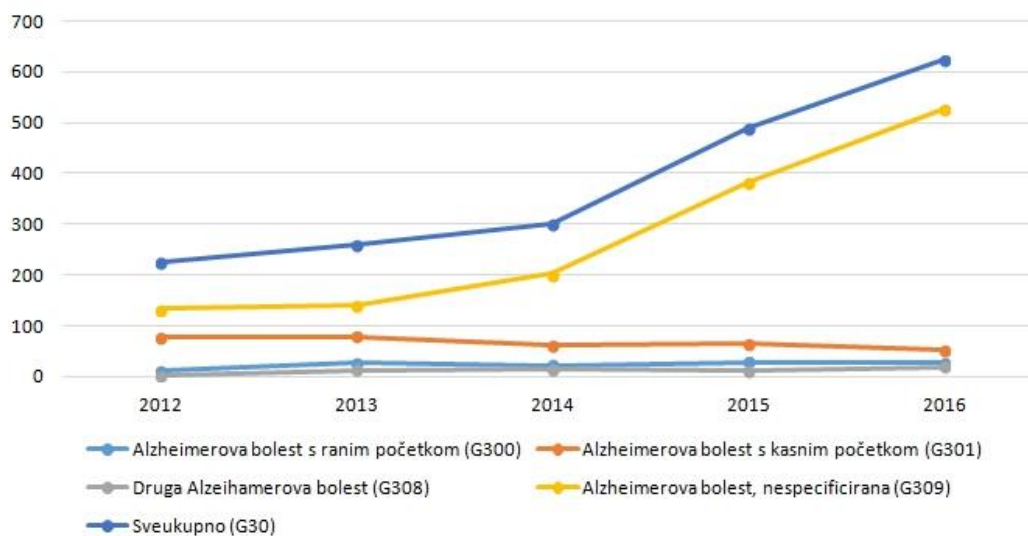
1.1. Povijest i epidemiologija Alzheimerove bolesti

Povijesno gledajući, još su Stari Grci i Rimljani, od Pitagore, Hipokrata, Platona i Aristotela pa preko Cicerona, među prvima pokazali intrigantnost prema procesima starenja, mentalnim bolestima i senilnosti. Prema zapisima može se zaključiti da su zaista bili na tragu neurodegenerativnoj bolesti koju danas nazivamo Alzheimerova bolest. Krajem 19. stoljeća, točnije 1890. godine Alois Alzheimer i Otto Binswanger prvi su najopširnije opisali atrofiju mozga. Alzheimer je *post mortem* analizirao mozak žene preminule od „neuobičajene“ demencije te je po prvi puta opisao neurofibrilarne snopice, senilne (amiloidne) plakove i smrt neurona. Također je zaključio da klinička slika bolesti ne pripada do tada nijednoj poznatoj i opisanoj bolesti u literaturi, stoga je bolest nazvao „nedefiniranom“. Napretkom medicine i dijagnostike, ovaj oblik demencije je bolje istražen i nazvan u čast Alzheimeru kao Alzheimerova bolest. (Berchtold i Cotman, 1998)

Trenutna statistika i brojke oboljelih od različitih oblika demencija su zastrašujuće i zabrinjavajuće. U svijetu od nekog oblika demencije boluje oko 50 milijuna ljudi, a predviđanja su

da će do 2050. godine biti preko 130 milijuna oboljelih. Troškovi pružanja adekvatne zdravstvene skrbi ove godine probili su granicu od trilijun dolara. (<https://www.alz.co.uk/>) Prema podacima iz 2018. godine, trenutno preko 5,7 milijuna Amerikanaca boluje od AB, od čega je oko 200 000 osoba mlađih od 65 godina. Ove brojke su zasigurno puno veće budući da je bolest vrlo često nedijagnosticirana i prolazi „ispod radara“, jer je zasad finalna potvrda dijagnoze jedino moguća *post mortem*. Gledajući na rasnu i etničku pripadnost, Afroamerikanci i Latinoamerikanci obolijevaju više od bijelaca, dok Azijati najmanje. Razlog u tome nije genetika, već socioekonomski faktori, životni stil te predispozicije za obolijevanje od drugih bolesti, primjerice hipertenzije ili dijabetesa koje dodatno doprinose razvoju AB. (Alzheimer's Association, 2018)

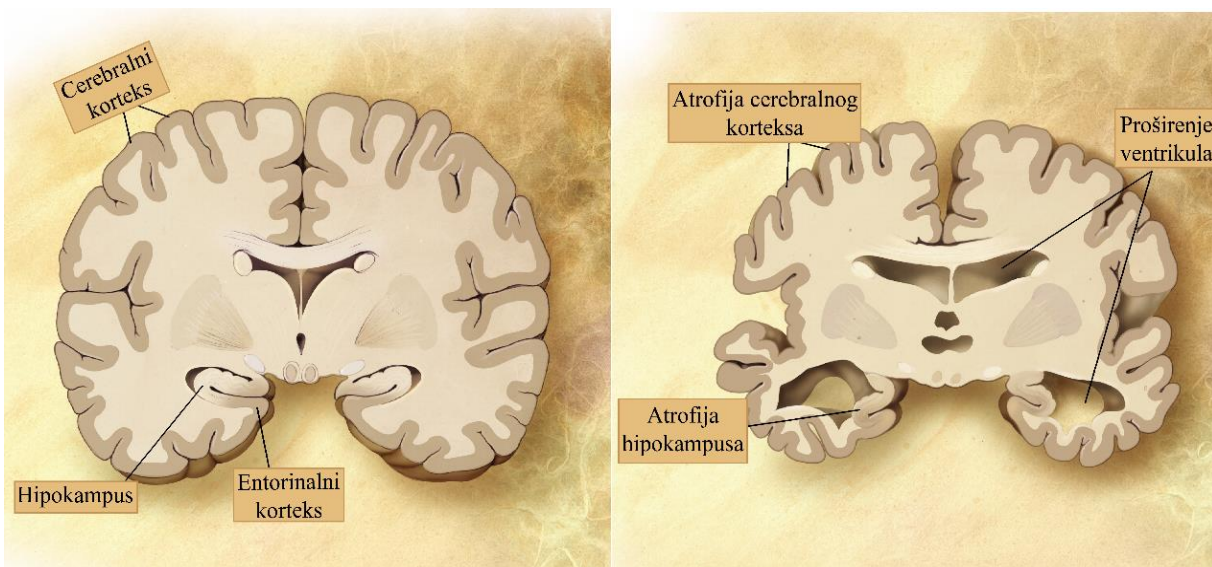
Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo (HZJZ) za 2017. godinu, procjenjuje se da u Republici Hrvatskoj od nekog oblika demencije boluje oko 86 000 osoba. Zabilježen je i broj hospitalizacija pacijenata s dijagnosticiranom AB u razdoblju od 2012. do 2016. godine te je uočen uzlazni trend. Naime, 2012. godine hospitalizirano je 225 pacijenata, dok je u 2016. godini taj broj utrostručen. (Graf 1) Budući da hrvatsko stanovništvo pripada među najstarije u Europi, previđa se da će se ovakva uzlazna krivulja nastaviti u narednim godinama. (<https://www.hzjz.hr/>)



Graf 1: Prikazuje broj hospitalizacija zbog Alzheimerove bolesti u stacionarnim ustanovama tijekom petogodišnjeg razdoblja od 2012. do 2016. godine u Republici Hrvatskoj (Izvor: <https://www.hzjz.hr/>)

1.2. Patofiziologija Alzheimerove bolesti

Alzheimerova bolest je ireverzibilna, progresivna neurodegenerativna bolest kompleksne patogeneze koja u najranijim fazama zahvaća hipokampus i entorinalni korteks mozga. (Slika 1) Uočene su i promjene u tkivu frontalnog i temporalnog režnja, amigdale, hipotalamusa, talamusa te jezgrama moždanog debla (*engl. raphe nucleus*), dok u kasnijim fazama bolesti dolazi do promjena u području neokorteksa. Budući da je hipokampus prvi na „udaru“ te najvažniji za učenje i pamćenje, nastale neurodegenerativne promjene vode do glavnih i karakterističnih simptoma AB, smanjenja sposobnosti učenja i gubitka pamćenja. (Kocahan i Dogan, 2017; Masters i sur., 2015)



Slika 1: Lijevo na slici je prikaz zdravog mozga, dok desno atrofiranog uslijed progresije Alzheimerove bolesti. (Modificirano prema: <https://www.nia.nih.gov/>)

1.2.1. Nasljedna (obiteljska) i sporadična Alzheimerova bolest

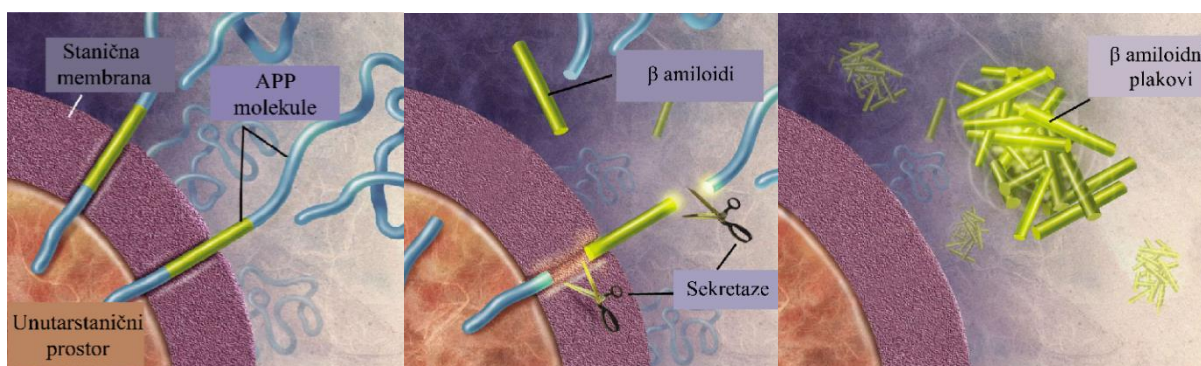
Etiologija AB je kompleksna i nedovoljno razjašnjena, a ugrubo ju možemo podijeliti na nasljednu (obiteljsku) i sporadičnu. Manje od 1% pacijenata oboli od dominantno autosomalne nasljedne AB koju karakterizira rani nastup bolesti (*engl. early onset*) gdje je prosječna dob oboljelih 45 godina. (Masters i sur., 2015) Uzrok su mutacije gena koji kodiraju: APP (*engl. amyloid precursor protein*) na kromosomu 21, PS1 (*engl. presenelin 1*) na kromosomu 14 i PS2

(*engl. presenilin 2*) na kromosomu 1. Fiziološka uloga PS1 i PS2 je aktivacija katalitičke podjedinice γ -sekretaze koja sudjeluje u cijepanju APP na amiloid beta ($A\beta$). Navedene mutacije pojačavaju aktivnost γ -sekretaze što za posljedicu ima povećano stvaranje hidrofobnijih i većih $A\beta$ peptida. (Wang i Reddy, 2017; Scheltens i sur., 2016; Šalković-Petrišić i sur., 2009) Budući da je gen za APP smješten na kromosomu 21, osobe oboljele od Down sindroma (trisomija kromosoma 21) imaju pretjeranu ekspresiju APP zbog koje gotovo svi stariji od 40 godina imaju povećane stvaranje amiloidnih plakova i neurofibrilarnih snopića. Kliničku sliku demencije i AB unutar narednih 20 godina razvije preko dvije trećine oboljelih od Down sindroma. (Wiseman i sur., 2015)

Sporadična AB (sAB) manifestira se u kasnijoj životnoj dobi (*engl. late onset*), nakon 65 godine života, a diljem svijeta geografski je podjednako zastupljena. Potencijalni rizični faktori još nisu u potpunosti utvrđeni, no prema studijama komorbiditeti poput dijabetesa, hipertenzije i pretilosti, a s druge strane smanjena fizička aktivnost, ali i niži stupanj obrazovanja doprinose stvaranju oksidativnog stresa i nastanku sAB. Jedan ključni rizični čimbenik za razvoj sAB ističe se u brojnim studijama, a to je polimorfizam gena koji kodira apolipoprotein E (APOE). (Masters i sur., 2015) APOE gen je smješten na kromosomu broj 19, a kodira istoimeni protein građen od 299 aminokiselina (AK). Dolazi u tri izoforme koje se međusobno razlikuju u jednoj ili dvije AK, a to su: APOE2, APOE3 i APOE4. Od svih izoformi, APOE4 je najčešći uzročnik sAB, a ukoliko je osoba homozigot postoji više od 50% šanse da oboli, dok su te šanse nešto manje kod heterozigota (20-30%). (Scheltens i sur., 2016; Masters i sur., 2015) Fiziološka uloga APOE je sudjelovanje u normalnom katabolizmu lipoproteina obogaćenih trigliceridima, primjerice kolesterola koji je sastavni dio membrana. Time posredno utječe na funkcionalnost staničnih membrana. Za razliku od ostalih izoformi, APOE4 ima manju protektivnu ulogu i lošije regenerativne sposobnosti, primjerice kod oštećenja izazvanih vodikovim peroksidom i njegovim radikalima. (Šalković-Petrišić i sur., 2009) U patologiji AB, uočena je uključenost APOE u imunoreaktivnost koja vodi do smanjene učinkovitosti mikroglije i makrofaga u razgradnji izvanstaničnih $A\beta$ depozita te promjena u tau fosforilaciji i stvaranju neurofibrilarnih snopića. (Scheltens i sur., 2016; Masters i sur., 2015)

1.2.2. Histopatološke promjene u Alzheimerovoj bolesti

Jedna od histopatoloških promjena je povećano stvaranje netopljivih amiloidnih plakova u mozgu, ali i na stijenkama moždanih krvnih žila. Fiziološki A β može biti izgrađen od 38 do 43 AK (Masters i sur., 2015), a nastaje tijekom proteolitičkog cijepanja APP djelovanjem enzima β -sekretaze (BACE1) u prvom koraku i γ -sekretaze (kompleks presenelina – PS1 i PS2) u drugom koraku. (Slika 2)



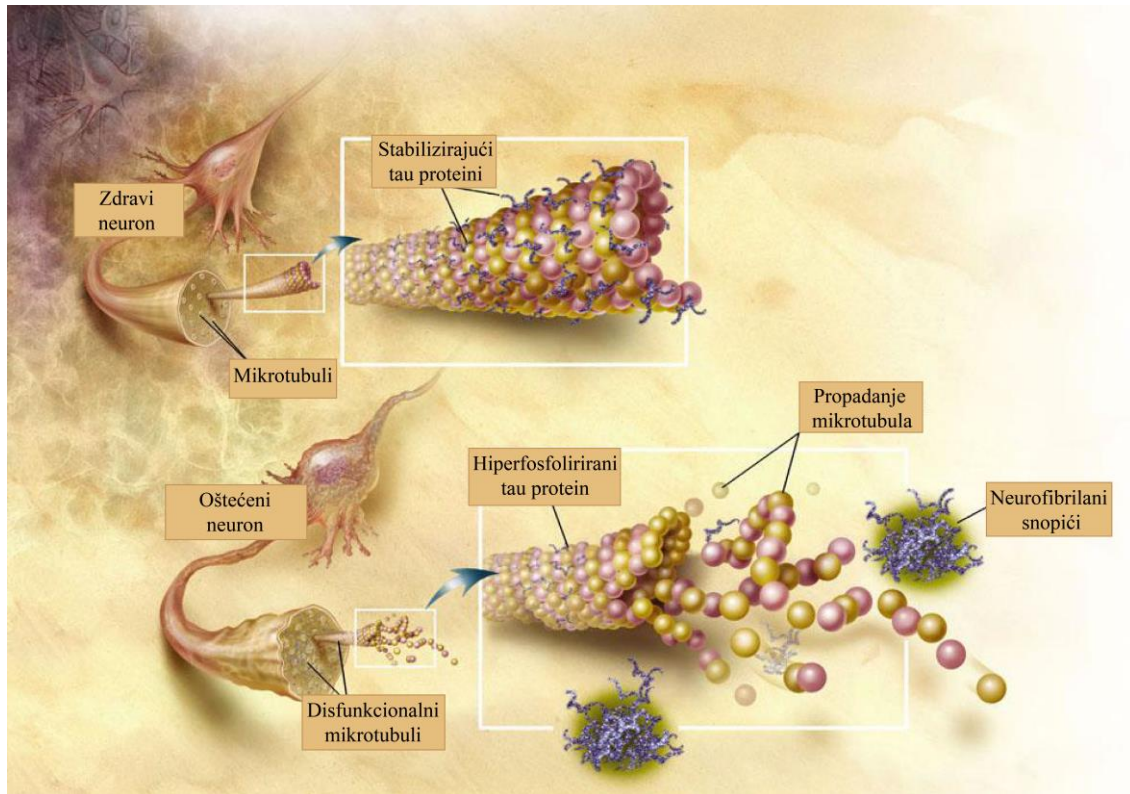
Slika 2: Cijepanje APP sekretazama i nastanak amiloidnih plakova (Modificirano prema: <https://emedicine.medscape.com/article/1134817-clinical#showall>)

APP je veliki transmembranski protein nađen u moždanim stanicama, dakle neuronima, astrocitima i mikrogliji, no nalazi se i u perifernim tkivima i organima kao što su adrenalne žlijezde, bubrezi, srce, jetra, slezena, gušterača, mišići, no i u trombocitima i leukocitima. (Blennow i Zetterberg, 2018; Wang i sur., 2017; Scheltens i sur., 2016) Funkcija APP u mozgu nije do kraja razjašnjena, no pretpostavlja se da je uključen u sinaptičku plastičnost (neuroplastičnost). Nastanak amilodnih plakova rezultat je povećanog stvaranja A β , posebice izoforme od 42 AK (A β ₄₂) koja je posebno sklona agregaciji. (Masters i sur., 2015) Prema istraživanjima, osim što formira plakove, A β ima druge potencijalne funkcije, primjerice, sposobnost aktivacije brojnih kinaza, zaštitu od oksidativnog stresa, sudjeluje u transportu kolesterola i djeluje kao transkripcijski čimbenik. (Osmanović Barilar, 2012) Do prevelikog stvaranja amiloidnih plakova najčešće dolazi uslijed promjena u homeostazi stvaranja i razgradnje A β . U mozgu postoji nekoliko razgradnih putova, primjerice: fagocitoza, endocitoza ili makropinocitoza od strane mikroglije, makrofaga, astrocita, oligodendroglije i neurona; proteolitičko cijepanje brojnim enzimima kao što su nefrilizin, enzim koji razgrađuje inzulin (IDE – *engl. insulin-degrading enzyme*) i metaloproteinaze matriksa.

Također je mogući izlazak (efluks) A β preko krvno moždane barijere u perifernu cirkulaciju. Smatra se da se na ovaj način očisti preko 60% nastalog A β u mozgu. Mehanizam degradacije na periferiji nije u potpunosti razjašnjen, no postoji nekoliko kataboličkih puteva koji uključuju slične mehanizme kao i u mozgu, fagocitozu i endocitozu, samo u ovom slučaju od strane monocita, makrofaga, neutrofila, limfocita i hepatocita. Metabolizam je moguć djelovanjem brojnih enzima, ali i uz pomoć A β vežućih proteina i stanica kao što su: albumin, eritrociti, antritrombin III i APOE. Moguća je i ekskrecija putem žuči ili urina. Zaključak je da su sinergističko djelovanje različitih kataboličkih putova, bilo u mozgu ili na periferiji, ključ uspjeha u uklanjanju fiziološki nastalog A β te da promjene u bilo kojem od ovih putova (ili više njih) doprinose razvoju i progresiji AB zbog neurotoksičnog djelovanja nastalih amiloidnih plakova. (Wang i sur., 2017)

Druga patološka promjena je disfunkcionalnost i agregacija mikrotubula u neofibrilarne snopiće u neuronima uslijed povećane hiperfosforilacije tau proteina. (Congdon i Sigurdsson, 2018; Masters i sur., 2015) Tau protein pripada strukturnim mikrotubularnim proteinima i u normalnim, fiziološkim uvjetima tau se fosforilira, veže za tubulin te stvara i stabilizira mikrotubule duž neurona čime je omogućen aksonalni transport. Kod patoloških promjena u AB proces fosforilacije je gotovo utrostručen, što za posljedicu ima destabilizaciju mikrotubula i njihovo sljubljivanje u neurofibrilarne snopiće s posljedičnom smrću neurona. (Slika 3) (Blennow i Zetterberg, 2018; Osmanović Barilar, 2012) Najčešća mjesta na kojima se tau hiperfosforilira su AT8 (Ser¹⁹⁹⁻²⁰⁰ – Thr²⁰⁵) i PHF-1 (Ser³⁹⁶⁻⁴⁰⁴), a bogata su prolinom ili se nalaze na C-terminalnom dijelu tau proteina. (Mondragón-Rodríguez i sur., 2014) Ovisno o progresiji sAB različita mjesta su hiperfosforilirana, a za kasnije stadije bolesti je najkarakterističnija hiperfosforilacija Ser³⁹⁶. Stupanj hiperfosforilacije uzrokuje promijenjenu aktivnost brojnih protein kinaza i fosfataza koje su u fiziološkim uvjetima odgovorne za ravnotežu u fosforilaciji tau proteina. *Post mortem* analizama tkiva preminulih pacijenata sa sAB utvrđene su povećane razine kinaza: CDK5 (*engl. cyclin-dependent-like kinase 5*) i GSK-3 β (*engl. glycogen synthase-3 β*). Prereaktivna GSK-3 β djeluje proupalno preko nuklearnog faktora κ B (NF- κ B) i na taj način remeti aksonalni transport što uzrokuje oštećenja i apoptozu neurona. Protein fosfataza 2A (PP2A – *engl. protein phosphatase 2A*) je tau fosfataza kojoj je jedna od uloga upravo regulacija aktivnosti CDK5 i GSK-3 β , odnosno održava fosforilaciju i defosforilaciju tau proteina u homeostazi. Progresijom AB snižena je

ekspresija PP2A te dolazi do dodatnog negativnog utjecaja na tau fosforilaciju. (Congdon i Sigurdsson, 2018)



Slika 3: Fiziološki procesi u zdravom neuronu i patofiziološke procese u oštećenom neuronu uslijed hiperfosforilacije tau proteina (Modificirano prema: <https://emedicine.medscape.com/article/1134817-clinical#showall>)

Postoji nekoliko mehanizama nastanka neuropatoloških i neurokemijskih promjena koje rezultiraju smanjenim izlučivanjem pojedinih neurotransmitora, ekscitotoksičnošću, gubitkom sinapsi i propadanjem neurona te generalno i globalno cerebralnom atrofijom. (Kocahan i Dogan, 2017; Masters i sur., 2015) Sve ove navedene promjene na razini sinapse povezane su s učestalijom aktivacijom NMDA receptora (*engl. N-methyl-D-aspartate receptor*) i povećanim oksidativnim stresom kao popratnim rezultatom. (Kamat i sur., 2014)

Glutamat je neurotransmitor važan u prijenosu signala te je uključen u procese učenja i pamćenja. Sintetizira se iz aminokiseline glutamina u presinaptičkom neuronu i skladišti u vezikule. Nakon egzocitoze u sinaptičku pukotinu veže se na ionotropne ili metabotropne receptore

presinaptički, postsinaptički ili na astrocite formirajući „tripartitnu sinapsu“. Vezanjem na astrocite dolazi do mehanizma pozitivne povratne sprege i dodatnog lučenja glutamata. (Zhang i sur., 2016) NMDAR su kationski kanali koji provode Ca^{2+} iz izvanstaničnog u unutarstanični prostor, nakon uklanjanja iona magnezija. (Wang i Reddy, 2017) U patologiji AB, $\text{A}\beta$ potiče izvanstanično gomilanje glutamata i posljedično tome njegovo učestalije vezanje na NMDAR što dovodi do češćeg otvaranja kanala i povećanog unosa Ca^{2+} u postinaptički neuron ili astrocite. Nakupljanje Ca^{2+} u postsinaptičkom neuronu za posljedicu ima disfunkcionalnost mitohondrija zbog povećane permeabilnosti unutrašnje membrane. Time dolazi do poremećaja u prijenosu elektrona što dovodi do povećanog stvaranja ROS (slobodnih kisikovih radikala) i nastanka oksidativnog stresa te smanjene produkcije energije (ATP). Krajnji ishod je ekscitotoksični učinak glutamata uslijed dugotrajne ekscitacije NMDAR. (Zhang i sur., 2016)

S druge pak strane, središnji kolinergički sustav također ima važnu ulogu u procesima učenja i pamćenja, kao i odgovora na stres, ali i cirkardijalni ritam. Poremećaj kolinergičke transmisije i propadanje kolinergičkih neurona progresijom AB praćeno je kognitivnim deficitima, posebice vizualno-spacijalnih sposobnosti, ali i pojavom psihijatrijskih simptoma bolesti. (Ferreira-Vieira i sur., 2016) Uloga ACh u ranoj patogenezi AB još nije sasvim razjašnjena. Naime, uslijed gubitka kolinergičkih neurona teško je zaključiti radi li se o početku AB ili je to normalan proces starenja na što ukazuju brojne studije budući da nakon četrdesete godine života oni počinju blago propadati u hipokampusu. (Craig i sur., 2011)

Učinak acetilkolina (ACh) vidljiv je vezanjem na muskarinske ili nikotinske receptore na postinaptičkom neuronu (Slika 4). Vezanjem na nikotinske receptore (o ligandu ovisni ionski kanal za Na^+), regulira se izlučivanje brojnih drugih neurotransmitora, primjerice: glutamata, dopamina, serotonina, ACh, GABA (*engl. gamma-aminobutyric acid*). Ovisno o vrsti i smještaju muskarinskih receptora, vezanje ACh rezultira inhibitornim djelovanjem ili ekscitacijom (češće). Postsinaptičkim vezanjem, odnosno ekscitacijom dolazi do inhibicije gabanergičke neurotransmisije, a s druge pak strane posredno se poveća aktivnost NMDA receptora. Zaključno, inhibicija gabanergičke, a stimulacija glutamatne neurotransmisije dovode do prekomjerne ekscitacije i prethodno opisane ekscitotoksičnosti glutamata. Zaključak je da su ove dvije promjene

na razini sinapsi usko povezane jedna s drugom i zajedno doprinose razvoju AB. (Ferreira-Vieira i sur., 2016)

1.2.3. Inzulinsko rezistentno stanje u mozgu

Na fenomen inzulinsko rezistentnog stanja u mozgu (IRBS – *engl. insulin-resistant brain state*) upućuje sve više znanstvenih studija podržavajući cerebralni hipometabolizam glukoze kao jednu od temeljnih patoloških promjena odgovornu za nastanak sAB. IRBS na molekularnoj razini karakteriziraju promjene u inzulinskoj signalizaciji, a ugrubo se može definirati kao metabolički sindrom u mozgu koji je povezan s metaboličkim i oksidativnim stresom te neuropalnim promjenama. Također, važno je naglasiti da IRBS može nastati individualno i neovisno o prisutnosti dijabetesa tip 2 za koji je poznato da povećava rizik od nastanka sAB. Spoznaju da promjene u inzulinskoj signalizaciji sudjeluju u patogenezi sAB prvi put je opisao Hoyer pred gotovo 25 godina. (Knezović i sur., 2017; Barilar i sur., 2015; de la Monte, 2012)

1.2.3.1. Inzulin i inzulinski receptor u mozgu

Inzulin je peptidni hormon građen od 51 AK kojeg proizvode β stanice gušterače na podražaj povećane koncentracije glukoze u organizmu. U mozgu je osim u metabolizam glukoze, uključen i u procese učenja i pamćenja. Povrh toga, djeluje neuroprotektivno, a utječe na rast i razvoj neurona. Samim time sudjeluje u procesima sinaptične plastičnosti preko GABA, NMDA i AMPA (α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolepropionska kiselina) receptora, a ima i značajnu ulogu u regulaciji gena važnih za dugoročno pamćenje. (Arnold i sur., 2018; Barilar i sur., 2015) Inzulin u mozak ulazi posebnim transporterima preko endotelnih stanica krvno moždane barijere. Na transport utječu brojni čimbenici kao što su pretilost, upalni procesi, dijabetes i trigliceridi. Posljednjih godina, pojedine studije sugeriraju da se inzulin sintetizira *de novo* u mozgu. Kod štakora i miševa pronađena je ekspresija mRNA koja kodira za inzulin, a potvrđena je i sinteza inzulina u neuronima, no ne i u gliji. (Arnold i sur., 2018; Vieira i sur., 2018) Kod ljudi mRNA koje kodiraju za inzulin dokazane su *post-mortem* analizama u hipokampusu i hipotalamusu, a ono što je posebno zanimljivo – njihova ekspresija je smanjena kod osoba s AB. (Arnold i sur., 2018)

Nekoliko vrsta transportera omogućavaju ulazak glukoze u moždane stanice. Dijelimo ih na: o inzulinu-ovisne transportere glukoze (GLUT2 i GLUT4) i o inzulinu-neovisne transportere glukoze (GLUT1 i GLUT3). Ekspresija i gustoća GLUT3 na somi, dendritima ili aksonu ovisi o energetske potrebama. Budući da GLUT3 ne treba inzulin za transport glukoze, depolarizacijom NMDA receptora stimulira se ulazak glukoze kroz GLUT3 u neurone. GLUT4 su najviše smješteni u hipokampusu, amigdali, cerebralnom korteksu i cerebelumu te samim time su povezani s kognitivnim procesima, dok u hipotalamusu imaju metaboličku ulogu. Aktivira ih inzulin što uzrokuje njihovu translokaciju na staničnu membranu čime je omogućen ulazak glukoze u neurone. Unos glukoze u glija stanice, odnosno astrocite koji čine 20-40% glije odvija se putem GLUT1 te se glukoza metabolizira u laktat koji se potom transportira u neurone gdje ulazi u proces oksidativne fosforilacije u kojem je krajnji korak proizvodnja velika količina ATP. U stanjima hiperinzulinemije dolazi do povećanog stvaranja laktata i poremećaja u metabolizmu, no za razliku od inzulinskih receptora (IR) na neuronima, IR na gliji su regulirani vrlo visokim koncentracijama inzulina. Glavna uloga astrocita na podražaj inzulina je proizvodnja proupalnih citokina čime igraju ulogu u upalnim procesima u mozgu. (Arnold i sur., 2018). GLUT2 se najviše nalazi u neuronima i glija stanicama na području sinapsi što upućuje na njegovu važnost prilikom otpuštanja neurotransmitora. Imunohistokemijskim analizama dokazana je prisutnost u hipokampusu, temporalnom i peririnealnom korteksu, amigdali, talamusu, hipotalamusu i olfaktornom bulbusu. Zanimljiva je spoznaja, ali i razumijevanje da IRBS različito utječe na različite tipove stanica. (Arnold i sur., 2018; Osmanović Barilar, 2012)

U mozgu su IR različito eksprimirani, a najviše ih ima u olfaktornom bulbusu, hipokampusu, cerebralnom korteksu, strijatumu i cerebelumu. Široka rasprostranjenost IR na sinapsama (presinaptički i postsinaptički) neurona, mikrogliji i astrocitima upućuje na vrlo važnu ulogu inzulinske signalizacije u mozgu. (Arnold i sur., 2018; Vieira i sur., 2018) IR spada u skupinu tirozin-kinaznih receptora, a po građi je heterotetramerni transmembranski protein sastavljen od 2α i 2β podjedinice međusobno povezanih disulfidnim vezama. Za razliku od perifernih IR, oni koji su smješteni u mozgu ne podliježu mehanizmu negativne sprege od strane inzulina na način da afinitet vezanja inzulina ovisi o zauzetosti IR (što je zauzetost receptora manja afinitet vezanja inzulina je veći i obratno). Uočena je i međusobna razlika u građi, odnosno veličini α i β podjedinice. Vezno mjesto za inzulin smješteno je na izvanstaničnom dijelu α podjedinice, dok β

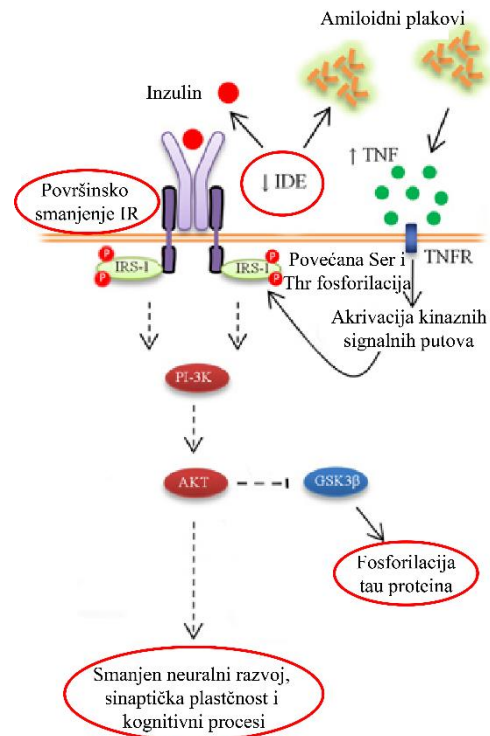
podjedinica ima tirozin kinazna aktivnost budući da se tu nalazi vezno mjesto za ATP kao donora potrebnih fosfata za autofosforilaciju i fosforilaciju supstrata inzulinskog receptora (IRS). (Scapin i sur., 2018; Osmanović Barilar, 2012)

1.2.3.2. Inzulinska signalizacija u mozgu kod sporadične Alzheimerove bolesti

Izvanstanično vezanje inzulina na α podjedinicu IR dovodi do konformacijske promjene receptora čime je omogućena unutarstanična kaskadna reakcija koja započinje vezanjem ATP za β podjedinicu te slijedi autofosforilacija tirozinskih ostataka. Zatim dolazi do nove konformacijske promjene u vidu pomicanja tirozinskog ostatka što omogućava vezanje IRS za β podjedinicu IR. Sve to dovodi do fosforilacije tirozinskih ostataka IRS-1 do IRS-4, od kojih su iz IRS porodice najbolje opisani i za razvoj sAB važni, IRS-1 i IRS-2. Ukoliko je fosforiliran serinski ostatak IRS-1 i IRS-2, oni disociraju s IR i time je daljnji prijenos signala prekinut, stoga je upravo IRS i njegova pravilna fosforilacija ključna za nastavak unutarstaničnog kaskadnog prijenosa signala. (Vieira i sur., 2018; Osmanović Barilar, 2012) IRS-1 i IRS-2 aktiviraju fosfatidil-inozitol-3 kinazu (PI3K – *engl. phosphoinositide 3-kinase*) koja dalje fosforilira i time aktivira protein kinazu B (AKT), kao i protein kinazu C. AKT fosforilira AKT supstrat koji ima ulogu u translokaciji GLUT 4 na staničnu membranu, a uzrokuje i aktivaciju mTOR (*engl. mammalian target of rapamycin*) koji sudjeluje u regulatornim procesima sinteze proteina i lipida te staničnom metabolizmu. AKT fosforilira GSK-3 α izoformu kojoj je supstrat APP te ga metabolizira, dok GSK-3 β izoforma veže tau-protein i time mu regulira fosforilaciju, a uključena je i u brojne procese kao što su stanična proliferacija i migracija, apoptoza i neuroplastičnost. (Slika 5) Osim aktivacije puta preko PI3K, s druge strane dolazi do aktivacije MAPK (*engl. mitogen-activated protein kinase*) puta koji je važan u regulaciji CREB (*engl. cAMP response element-binding protein*), c-FOS, ali i procesima staničnog rasta i razvoja, imunskih reakcija i neuroplastičnosti. Svi zajedno, AKT, GSK-3 β , mTOR i MAPK sudjeluju u autoregulaciji IRS-1 i IRS-2 djelujući inhibitorno fosforilacijom već spomenutog serinskog ostatka. (Arnold i sur., 2018)

Sama aktivnost IR regulirana je protektivnim mehanizmom uz enzim protein tirozin fosfatazu (PTP – *engl. protein tyrosine phosphatase*) koja ga defosforilira i time inaktivira unutarstanični signalni put. Ukoliko je prisutan oksidativni stres, odnosno povećana stanična produkcija H₂O₂ i

ROS, koji uz glukokortikoide djeluju inhibitorno na PTP dolazi do prevelike aktivnosti fosfotirozin kinaze i fosforilacije IR što povećava aktivnost unutarstanične signalizacije. U posljednje vrijeme uočena je još jedna zanimljiva promjena vezana uz IR u IRBS, a to je da se IR veže na druge mikrodomene stanične membrane što dodatno doprinosi njihovoj disfunkcionalnosti. (Vieira i sur., 2018; Šalković-Petrišić, 2009)



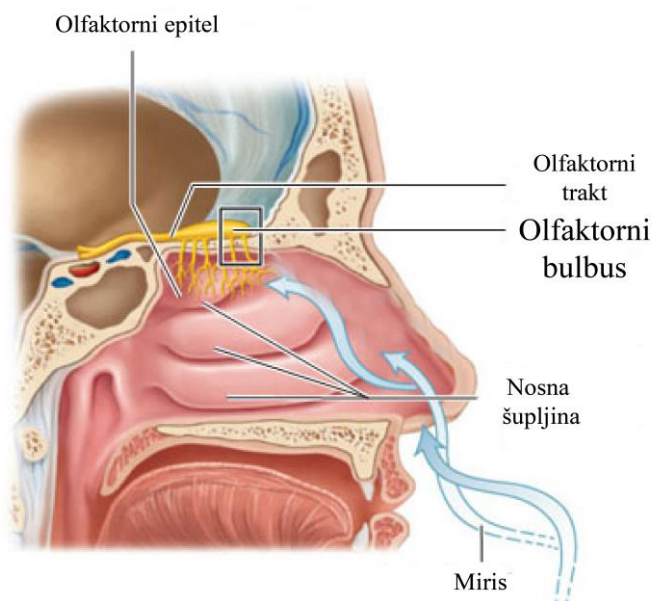
Slika 4: Prikaz patofizioloških promjena inzulinskog signalnog puta u mozgu kod SAB (Modificirano prema: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2015.00204/full>)

Važnu ulogu u regulaciji inzulinske signalizacije preko PI3K ima enzim IDE koji je citosolna metaloendopeptidaza čija je aktivnost ovisna o Zn^{2+} , a glavna funkcija je razgradnja inzulina. (Osmanović Barilar i sur., 2015) No, osim inzulina, IDE razgrađuje brojne druge supstrate, primjerice atrijski natriuretski peptid, glukagon, epidermalni faktor rasta, ali i ono najvažnije $A\beta$ i time prevenira neurotoksične učinke te na taj način održava homeostazu $A\beta$ metabolizma. Katalitička aktivnost enzima regulirana je dugolančanim masnim kiselinama i vodikovim peroksidom (H_2O_2) gdje potonji uz ROS djeluje inhibitorno na PTP i na taj se način smanjuje

aktivnost IDE budući da najvjerojatnije potiču njegov prijelaz u zatvorenu konformaciju. (Šalković-Petrišić i sur., 2009; Im i sur., 2007) Osim ovog načina regulacije, IDE je aktiviran inzulinom, a inhibiran A β koji se veže na enzim i tako stvara ireverzibilni kompleks. (de Tullio i sur., 2008) Koji će od ova dva supstrata IDE vezati ovisi o K_m koja je definirana s nekoliko unutarstaničnih procesa, primjerice pH i razinom ATP. ATP utječe na IDE na način da mu može povećati aktivnost za 300% te se pretpostavlja da bi kod smanjenja ATP došlo do pada aktivnosti enzima. (Šalković-Petrišić i sur., 2009; Im i sur., 2007) Obzirom da je *post mortem* analizom ljudskog tkiva iz hipokampusa i cerebro-kortikalnog dijela mozga IDE nađen smanjen u ranoj fazi sAB može se pretpostaviti da je jedan od uzroka tome hipoenergoza u neuronima. (Šalković-Petrišić, 2008)

1.2.4. Patofiziološke promjene u olfaktornom bulbusu

Olfaktorni sustav dijeli se na periferni dio koji se sastoji od olfaktornog epitela i živca te centralni dio koji uključuje olfaktorni bulbus (OFB), olfaktorni trakt, prednju olfaktornu jezgru, piriformni korteks, amigdalnu, olfaktorni tuberkul, hipokampus, entorinalni i orbitofrontalni korteks. (Slika 6).



Slika 5: Prikaz dijela olfaktornog sustava (Modificirano prema: <http://www.lifeinharmony.me/anatomy-of-the-nose-smell/anatomy-of-the-nose-smell-smellspring13>)

Post mortem histopatološkim analizama olfaktornog sustava kod sAB uočene su veće patofiziološke promjene u centralnom dijelu olfaktornog sustava u usporedbi s perifernim (Vasavada i sur., 2017; Devanand 2016) Odgovor na pitanje koje su patološke promjene, centralne ili periferne odgovornije za olfaktornu disfunkciju kod blagog kognitivnog oštećenja i teškog oblika sAB dobiven je u studiji Vasavada i sur., (2017) fMRI (*engl. functional magnetic resonance imaging*) metodom vizualizacije centralnog i perifernog olfaktornog sustava na 27 kognitivno normalnih dobrovoljaca, 21 pacijenta u MCI fazi i 15 pacijenata u teškoj sAB fazi. Studija je pokazala da su centralne promjene olfaktornog sustava ipak odgovornije za nastanak olfaktorne disfunkcije u obje faze sAB.

Pred gotovo 45 godina opisana je olfaktorna disfunkcija kao jedan od najranijih kliničkih simptoma sAB. Točan patofiziološki mehanizam olfaktorne disfunkcije u sAB još nije do kraja razjašnjen, no dosadašnje studije upućuju da iza promjena u OFB koje se manifestiraju kao smanjenje osjeta njuha stoji hiperfosforilacija tau proteina te posljedično stvaranje neurofibrilnih snopića. (Zou i sur., 2016, Wilson i sur., 2007) S druge strane, nastanak amiloidnih plakova je u manjoj mjeri uključen u patofiziološke procese u OFB. Prema studiji u kojoj je rađena imunohistokemijska analiza mozгова i koja je uzela u obzir kliničke kriterije progresije AB, u pretkliničkoj i ranoj fazi je zaista A β manje zastupljen (kod nekih pacijenata nije niti uočen) nego li u posljednjoj fazi teške AB kada je prisutnost A β detektirana kod gotovo svih pacijenata. Za razliku od A β , hiperfosforilirani tau protein je podjednako zastupljen u prve dvije faze bolesti kod svih pacijenata, no nešto više u trećoj. (Lachen-Montes i sur., 2017b)

Važno je naglasiti da postoje komercijalni testovi osjeta njuha (UPSIT™ i B-SIT™), kojima je moguće ustanoviti koliko je njuh oštećen u raznim stadijima AB, što je svakako korisno za cjelokupno razjašnjenje i povezivanje tog simptoma s patofiziološkim procesima u pozadini AB. (Devanand, 2016)

Prevalencija gubitka njuha uslijed olfaktorne disfunkcije je gotovo 100% kod pacijenata s AB, a vrlo često prolazi nezamijećeno u ranim fazama bolesti bilo od strane pacijenata ili medicinskog osoblja. Obzirom da hiperfosforilacija tau proteina u OFB korelira s progresijom demencije sve se više pobuđuje interes znanstvenika o razjašnjavanju patofizioloških procesa koji leže u pozadini

gubitka njuha i olfaktorne disfunkcije te na koji način nova znanja iskoristiti u svrhu razvoja biomarkera. (Lachén-Montes i sur., 2017a; Zou i sur., 2016)

1.3. Klinička slika Alzheimerove bolesti

Klinička slika AB je vrlo kompleksna i najčešće praćena s progresivnim gubitkom pamćenja. Sama bolest od pojave prvih simptoma pa do terminalne faze traje 8 do 10 godina. Njoj prethodi pretklinička i prodromalna faza koja traje i do 20 godina prije nego li što se pojave prvi simptomi AB. (Masters i sur., 2015) Gubitak pamćenja prate promjene u ponašanju, posebice u jezičnom izražavanju: afazija i anomija (smanjena mogućnost izražavanja i izgovora riječi, odnosno nesposobnost imenovanja predmeta), ali i gubitak vizualno-spacijalnih sposobnosti. Progresijom bolesti i ulaskom u terminalnu fazu kod pacijenata se javljaju ekstrapiramidalni sindrom, parkinsonizam, akatizija, bradikinezija, tremor i tardivna diskinezija.

S obzirom na progresiju i tijek bolesti, NIA-AA (engl. National Institute on Aging - Alzheimers's Association) Alzheimerovu bolest dijeli u tri glavna stadija:

1) Pretklinička asimptomatska faza

Za ovu fazu je karakteristično što pacijenti nemaju poteškoće kod obavljanja svakodnevnih radnji i aktivnosti, a kognitivni testovi ne ukazuju na AB.

2) Prodromalna simptomatska faza karakterizirana umjerenim kognitivnim oštećenjem

U ovoj fazi AB je najčešće dijagnosticirana jer se počinju javljati promjene u ponašanju kao što su: gubitak pamćenja; gubitak prostorne orijentacije (pacijenti se izgube u njima do tada poznatom gradu); smanjenja sposobnost obavljanja svakodnevnih zadataka (plaćanje računa, kuhanje kave); promjene raspoloženja koje vode do anksioznosti i depresije.

Kod pojave umjerenog kognitivnog oštećenja (MCI – *engl. mild cognitive impairment*) bolest je uznapredovala do stadija kada se pojavljuju smetnje u govoru i pisanju; nesposobnost učenja novih pojmova i radnji; poteškoće u suočavanju s novim i neočekivanim situacijama; agitacija; lutanja; halucinacije, deluzije i paranoja; gubitak percepcije. S vremenom pacijenti počinju

pokazivati agresivno ponašanje prema njegovatelju, odbijaju kupanje ili oblačenje odjeće jer ne razumiju i ne znaju što određena radnja znači ili jer se ne sjećaju kako se izvodi. Za takve osobe koje se ne sjećaju prošlosti, kako se izvode brojne aktivnosti te koja je njihova važnost u svakodnevnom životu, a niti shvaćaju budućnost, svijet oko njih se čini čudnim i zastrašujućim, stoga je nužno da su i dalje u njihovim životima prisutna poznata obiteljska i prijateljska lica.

3) Teška Alzheimerova bolest

Uz sve prethodno navedene simptome u posljednjoj fazi bolesti kod pacijenata dolazi do drastičnog gubitka na težini prvenstveno zbog poteškoća s gutanjem, ali i jer jednostavno zaborave jesti. Zbog promjena u cirkardijalnom ritmu učestalo je povećano spavanje, a javlja se i inkontinencija. Uz pothranjenost, najčešći uzrok smrti je sklonost infekcijama kao što su upala pluća i sepsa. (Morris i sur., 2014; <https://emedicine.medscape.com/>; <https://www.nia.nih.gov/>)

1.4. Mogućnosti, ograničenja i izazovi u farmakoterapiji Alzheimerove bolesti

Budući da je učinak lijekova zaista vrlo skroman, a samo liječenje simptomatsko, nažalost, danas ne postoji terapija i lijekovi koji mogu izliječiti AB ili u potpunosti zaustaviti njenu progresiju, no nekim pacijentima privremeno umanje simptome i olakšaju svakodnevni život. Jedan od najvećih problema u liječenju je što velik broj ljudi ne reagira na dostupnu terapiju. Razlog tome, odnosno koja je razlika između ljudi koji reagiraju na terapiju i kod kojih je ona neučinkovita još nije utvrđen. Za uspješno (iz)liječenje važna je rana dijagnostika, a samim time i razvoj pouzdanih biomarkera, ali s druge strane potrebna je i učinkovita strategija o preventivi i liječenju AB. Upravo sve ovo predstavlja najveći izazov znanstvenicima, istraživačima, stratezima i svim zdravstvenim djelatnicima u uspješnoj borbi protiv ove brzo rastuće bolesti među ljudskom populacijom. (Craig i sur., 2011)

1.4.1. Farmakološke mogućnosti – dostupni lijekovi

Spomenute promjene u kolinergičkoj sinapsi definiraju kolinergičku hipotezu nastanka AB koja je pogodovala razvoju lijekova iz skupine inhibitora acetilkolin esteraze. U toj skupini nalaze su tri lijeka: donepezil, rivastigmin i galantamin. Lijekovi ne izazivaju dramatično poboljšanje simptoma, već samo uspore kliničku progresiju bolesti za 6 do 12 mjeseci nakon čega se pogoršanje nastavlja. Prema mehanizmu djelovanja, za razliku od nekompetitivnih inhibitora AChE – donepezila i rivastigmina, galantamin djeluje kao kompetitivni inhibitor AChE, ali i alosterički modulator nikotinskih receptora. Prednost rivastigmina ispred ostala dva iz ove skupine je što djeluje i na butirilkolin esterazu (BuChE) koja također razgrađuje ACh. Važno je naglasiti da jedino donepezil ima učinak u posljednjoj fazi bolesti. (Roberson, 2018) Obzirom da se ovi lijekovi pretežno izlučuju urinom, potrebna je prilagodba doze i pojačan oprez kod pacijenata s renalnim oštećenjima. Nuspojave pogađaju 5-20% posto pacijenata te su tipične kolinergičke, od kojih su najviše izraženi povraćanje, anoreksija, nadutost, dijareja i abdominalni grčevi. (Atri i sur., 2017)

Druga skupina lijekova prema mehanizmu djelovanja su antagonisti NMDA receptora, odnosno memantin kao jedini predstavnik skupine. Svojom mehanizmom blokira toksične učinke glutamata i time odgađa pogoršanje kliničke slike. Najčešće se koristi kao monoterapija ili suportivna terapija uz inhibitore AChE u kasnijim fazama bolesti, budući da je vrlo malo dokaza za njegovu učinkovitost u ranijim fazama bolesti. Nuspojave su gotovo identične lijekovima iz skupine AChE inhibitora. (Roberson, 2018)

U Republici Hrvatskoj na tržištu nema galantamina, dok donepezil i memantin dolaze u obliku tableta, a rivastigmin u obliku oralne otopine. (<http://www.hzzo.hr/>)

1.4.2. Nefarmakološke mjere

S obzirom na oskudni farmakološki portfolio dostupnih lijekova, brojne nefarmakološke mjere imaju veliku ulogu u terapiji AB. Ukoliko Ako u obiteljskoj anamnezi postoje oboljeli od AB, važno preporuča se napraviti genetsko testiranje (određivanje APOE). Pacijenti koji boluju od

kardiovaskularnih oboljenja i dijabetesa moraju biti pod nadzorom te također biti upoznati s rizicima koje njihove bolesti donose. Jednom kad osoba oboli odrazvije demenciju koja potom napreduje u AD važno je da obitelj/njegovatelj prepoznaju bihevioralne promjene, kao što su deluzije, halucinacije, depresivno ponašanje i promjene u cirkardijalnom ritmu kako bi se omogućila dodatna terapija. Budući da kod oboljelih osoba dolazi do smanjenja osjeta njuha, neka hrana im postane „drugačija i čudna“ te je odbijaju, a nerijetko i zaborave jesti. Stoga je važna pravilna ishrana, uporaba dodataka prehrani i enteralnih pripravaka, ali i druge intervencije poput uporabe stimulansa apetita budući da je upravo malnutricija najčešće povezana sa visokim mortalitetom. (<https://www.uptodate.com/>)

1.4.3. Liječenje Alzheimerove bolesti u budućnosti

Što se tiče budućnosti terapije i liječenja, trenutno je u raznim fazama istraživanja 105 molekula različitog profila i mehanizama djelovanja, od neuroprotektiva i protuupalnih lijekova, do imunoterapije. (Cummings i sur., 2017) Najveći uspjeh bilježi protutijelo aducanumab koji je izoliran iz ljudskih autoprotutijela koja djeluju protiv A β plakova ovisnih o Cu²⁺, a koji su najviše neurotoksični od svih oblika A β . Trenutno je protutijelo u trećoj fazi kliničkih istraživanja. (Wang i sur., 2017)

U današnje vrijeme postoji nekoliko tehnika i metoda koje omogućavaju ranu dijagnostiku AD, a to je mjerenje biomarkera iz cerebrospinalne tekućine (CSF – engl. cerebrospinal fluid). Kao što su A β 42, total tau (t-tau) i fosforilirani tau (p-tau – engl. phosphorylated tau). Kod detekcije biomarkera iz CSF, bilježi se omjer p-tau i t-tau, gdje je p-tau mjeren kao hiperfosforilirana Thr181 podjedinica. Prema studijama, t-tau i p-tau su umjerno povišeni. Postoje još imaging metode, a su PET (pozitronska emisijska tomografija) koja mjeri ulazak glukoze u neurone i gliju (metoda je vrlo osjetljiva na sinaptičku disfunkcionalnost), te MRI (magnetska rezonancija). (Scheltens i sur., 2016; Masters i sur., 2015) Budući da su sve navedene metode invazivne, skupe i dugotrajne, u cilju je omogućiti neinvazivnu i relativno jeftinu detekciju biomarkera u krvi. To predstavlja veliki izazov jer su biomarkeri u krvi prisutni u jako niskim koncentracijama. Nedavno je uspješno detektiran omjer APP:A β 1-42 i A β 1-40:A β 1-42 u krvi uz pomoć imunoprecipitacije-masene spektrometrije (IP-MS) umjesto ELISA (engl. enzyme-linked immunosorbent assay)

metode koja se koristi kao standard za detekciju. Rezultati su uspoređivani s PET i razinom A β u CSF te je uočena korelacija. Ovo istraživanje je zaista prijelomno u razvoju automatizirane, brze, jednostavne i svima dostupne metode detekcije ranih biomarkera AB. (Nakamura i sur., 2018)

Uz postojeću farmakoterapiju i pravilne nefarmokološke mjere, samo zajedničkim djelovanjem svih dionika zdravstvenog sustava u suradnji s oboljelima, njihovim obiteljima i njegovateljima može se omogućiti razumijevanje ove teške bolesti, a potom i borba, koja je za neke više, a druge manje uspješna, no koja nažalost u konačnici još uvijek vodi do istog, fatalnog ishoda. Ono čemu još svakako treba težiti je personalizirano liječenje AB, dakle omogućavanje dostupne rane dijagnostike, odabira prave terapije za pravog pacijenta u pravo vrijeme.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Veliki broj istraživanja ističe važnu ulogu IRBS u nastanku sAB. Na eksperimentalnim modelima sAB moguće pokazati nastanak i razvoj te vremenski slijed u promjenama inzulinskog signalnog puta preko inzulinskog receptora u mozgu.

Budući da je gubitak njuha jedan od prvih kliničkih simptoma sAB, danas se više pobuđuje interes znanstvenika na koji način navedenu promjenu iskoristiti u svrhu razvoja biomarkera kao dijagnostičkog alata. Poznato je da u pozadini olfaktorne disfunkcije u olfaktornom bulbusu leži hiperfosforilacija tau proteina, no nije poznat vremenski trenutak kad ona nastaje.

Ukoliko bi se utvrdio vremenski period nastalih promjena u olfaktornom bulbusu te točni patofiziološki procesi koji vode do smanjenja osjeta njuha otvorile bi se nove dijagnostičke i terapijske opcije za liječenje AB. Ta činjenica postaje vrlo važna ukoliko se uzme u obzir da trenutno ne postoji zadovoljavajući farmakoterapijski pristup u liječenju AB.

Cilj ovoga rada je istražiti promjene ekspresije proteina koje doprinose patofiziološkim promjenama na štakorskom modelu sAB ovisno o dozi STZ-icv i vremenskom periodu nakon primjene određene doze. Na uzorcima tkiva olfaktornog bulbusa Western blot metodom analizirane su sljedeće promjene ekspresije proteina:

- inzulinskog receptora (IR)
- enzima koji razgrađuje inzulin (IDE)
- tau proteina (t-tau)
- fosforiliranog tau proteina (p-tau)

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Životinje i tkivo

Za potrebe izrade ovog diplomskog rada analizirani su uzorci tkiva olfaktornog bulbosa pokusnih životinja, odnosno mužjaka štakora soja Wistar starosti 1 i 3 mjeseca u težini od 300 do 400 g. Štakori su bili uzgojeni na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Nakon bihevioralnih mjerenja, koje su provele osobe osposobljene za rad s pokusnim životinjama, životinje su anestetizirane, a mozak je izvađen i podijeljen na regije od interesa. Tijekom izvođenja pokusa na laboratorijskim životinjama poštivao se Zakon o zaštiti životinja (NN 102/17). Za izvođenje pokusa na projektu UKF (64-10) pod voditeljstvom prof. dr. sc. Melite Šalković-Petrišić, čiji je ovaj diplomski rad dio, dobivena je dozvola Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

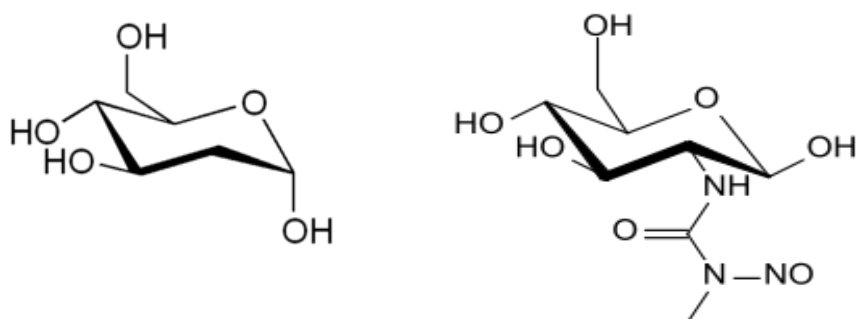
3.1.1. Eksperimentalni modeli Alzheimerove bolesti

Obzirom na specifičnu prirodu i tijek AB veliki je izazov napraviti animalni eksperimentalni model koji bi pouzdano odgovarao bolesti u ljudi. U literaturi su najčešće opisani eksperimentalni modeli koji se temelje na genetskim mutacijama čime predstavljaju model za obiteljski tip AB. (Yamada i Nabeshima, 2000) Možemo ih podijeliti na modele s mutacijom gena za: APP, presenilin i tau protein, no postoje i kombinirani modeli s više mutacija. (Hsiao i sur., 1996) Budući da se ovaj diplomski rad temelji na ispitivanju patoloških promjena u inzulinskoj signalizaciji kod sAB, ovi modeli nisu prikladni za istraživanje.

Budući da se sAB bolest sve više povezuje s nastankom IRBS u mozgu kao patofiziološkim uzrokom bolesti, intracerebroventrikularnom (icv) primjenom niskih doza, čak do 100 puta nižih od one pri perifernoj primjeni (0,5-3,0 mg/kg) streptozotocina (STZ), odnosno 2-deoksi-2-3(metil-3-nitroziureid)-D-glukopiranoze u lateralne moždane komore štakora dobiva se eksperimentalni model sAB kojemu je glavna karakteristika upravo IRBS. (Osmanovic Barilar i sur., 2015,

Knezovic i sur., 2017) Važno je naglasiti da primjenom niskih doza STZ u CNS ne dolazi do razvoja sistemske hiperglikemije.

STZ je derivat nitrozoureje te spada u skupinu alkilirajućih protutumorskih lijekova. Molekula STZ je strukturno slična 2-deoksi-D-glukozi, no ono što ih razlikuje je N-metil-N-nitrozourejna skupina na C-2 položaju (Slika 7) koja je odgovorna za nastanak NO i H₂O₂ u stanicama te posljedični oksidativni stres kao jedan od mehanizama koji doprinose nastanku sAB. (Osmanović Barilar, 2012)



Slika 6: Lijevo na slici je prikazana molekula glukoze, a desno streptozotocina

Mehanizam djelovanja STZ u mozgu nije do kraja razjašnjen, no budući da je molekula strukturno slična molekuli glukozi, samim time djeluje kao selektivni supstrat i ima veliki afinitet vezanja za GLUT2 preko kojeg ulazi u stanice. Posljedica ulaska STZ u stanice preko GLUT2 je smanjena proteinska ekspresija GLUT2 na membranama, ali pozadinski mehanizmi kojima dolazi do tog procesa u mozgu još nisu u potpunosti istraženi. (Knezovic i sur., 2017) Poznato je da kada STZ uđe u stanicu alkilira DNK, oštećuje ju što za posljedicu ima smanjeno stvaranje ATP i smrt stanice bilo apoptozom ili nekrozom. Kada se STZ metabolizira, obzirom na strukturu dolazi do stvaranja NO i H₂O₂ i nastanka oksidativnog stresa koji još dodatno doprinose smanjenju ATP. (Szkudelski, 2001)

Osim što su bihevioralnim testovima uočene promjene u kognitivnom ponašanju i procesima učenja, STZ-icv primjenom kod štakora dokazane su i promjene na molekularnoj razini koje su odgovorne za nastanak IRBS i sAB. Dolazi do smanjenog metabolizma glukoze što za posljedicu

ima već spomenuti oksidativni stresa koji vodi do smanjenje produkcije ATP, no dokazana je smanjena funkcija IR i kolinergička transmisija. S druge strane povećani su neuropsihikalni procesi, hiperfosforilacija tau proteina i stvaranje A β plakova. (Knezovic i sur., 2017) Morfološke promjene koje su nađene kod STZ-icv modela odgovaraju onima kod ljudi, a to su astroglioza, gubitak neurona i proširenje ventrikula. (Osmanović Barilar, 2012)

3.1.2. Eksperimentalni protokol – priprema tkiva za *Western blot* analizu

Eksperiment se sastojao 4 skupine životinja, od čega je u svakoj skupini bilo po 6 štakora. Za potrebe Western blot analize u pokusima je korišten STZ (Streptozotocin®, Fluka, Švicarska) primijenjen icv (u lateralne moždane komore) u sljedećim dozama:

0,3 mg/kg za prvu skupinu životinja;

1,0 mg/kg za drugu skupinu životinja; i

3,0 mg/kg (u dva navrata po 1,5 mg/kg s razmakom od 2 dana) za treću skupinu životinja otopljenih u 0,05 M citratnom puferu (pH 4,5). Četvrta skupina životinja, ujedno i kontrola bila je icv tretirana citratnom puferom. Nakon 1 i 3 mjeseca od početka tretmana životinje su žrtvovane, a olfaktorni bulbus je izvađen i brzo smrznut u tekućem dušiku te pohranjen na -80°C do upotrebe, odnosno homogeniziranja u Lysis puferu s dodanim inhibitorima proteaza.

3.2. Korištene kemikalije, reagensi i protutijela

Za **pred obradu i pripremu uzoraka te u izradi gela i pufera** u postupcima elektroforeze i Western blot analize, korišteno je sljedeće:

Kemikalije:

2-merkaptetanol (MERCK-Schurcharadt, Njemačka)

akrilamid (Acrylamide, Sigma, SAD)

amonij persulfat (Sigma, SAD)

apsolutni etanol (Kemika, Hrvatska)

bakrov (II) sulfat pentahidrat (T.T.T. doo, Sv. Nedjelja, Hrvatska)
boja Ponceau (Sigma-SAD)
bromfenol modriilo (Sigma, SAD)
DTT (DL-Dithiotheital, Fluka, Švicarska)
EDTA (Etilendiamintetraoctena kiselina, Kemika, Hrvatska)
folin-ciocalteu reagens (Kemika, Hrvatska)
glicerol (Fluka, BioChemika Švicarska)
glicin (Sigma-SAD)
inhibitori proteaza (Sigma, SAD)
klorovodična kiselina (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Njemačka)
metanol (T.T.T. doo, Sv. Nedjelja, Hrvatska)
mlijeko u prahu (Vindija, Hrvatska)
N, N'-metilenbisakrilamid (Sigma, SAD)
NaCl (Kemika, Hrvatska)
natrij deoksikolat (AppliChem, Njemačka)
natrij kalij tartarat (MERCK – Alkaloid, Makedonija)
natrij vanadat (Aldrich, USA)
natrijev hidroksid (T.T.T. doo, Sv. Nedjelja, Hrvatska)
natrijev karbonat (T.T.T. doo, Sv. Nedjelja, Hrvatska)
NP-40 (Nonidet™ P 40 Substitute, Sigma, USA)
TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilenamid) (Sigma, SAD)
Tris (TRIZMA® base, Sigma, SAD)

Deterdženti:

SDS (Sodium dodecil sulphate, Sigma, SAD)
Tween 20 (Sigma, SAD)

Reagensi (kitovi) za kemiluminescentnu detekciju proteina:

Clarity Max™ Western ECL Substrate – Luminol Solution (BIO-RAD, Njemačka)

Clarity Max™ Western ECL Substrate – Peroxide Solution (BIO-RAD, Njemačka)

Luminata™ Forte Western HRP Substrate (Millipore, SAD)

Ostalo:

centrifuga – Biofuge fresco (Heraeus Instruments, Njemačka)

homogenizator – Microson™ ultrasonic cell disruptor (Misonix, SAD)

kamera za detekciju signala – MicroChemi (DNR Bio-Imaging Systems Ltd., Jerusalem)

magnetska miješalica – IKA® C-MAG HS7 (IKA, Njemačka)

nitrocelulozne membrane veličine pora 0,45 µm (Amersham, Njemačka)

pipete i nastavci raznih volumena (Eppendorf, Njemačka)

set za Western blot – Mini-PROTEAN® Tetra Cell (BIO-RAD, SAD)

spektrofotometar – HPV220 (Iskra, Slovenija)

standard za određivanje molekulskih masa - Precision Plus Protein™, All Blue Standards (BIO-RAD, Njemačka)

uređaj za termičku obradu proteina – Rotilabo®-Block Heater H250 (Roth Karlsruhe, Njemačka)

vibraciona miješalica – IKA® Vibrax VXR basic (IKA, Njemačka)

vortex – Ika-vibro-fix (IKA WERK, Njemačka)

Western blot uređaj – PowerPac™ Basic Power Supply (BIO-RAD, SAD)

U postupcima Western blot imunodetekcije korištena su sljedeća **protutijela:**

Primarna:

1. Anti-Insulin receptor (β -subunit), clone CT-3, mouse monoclonal (Millipore, SAD)
2. Anti-IDE, N-terminal (97-273), rabbit pAb (Calbiochem, Njemačka)
3. Anti-phospho-Tau (pSer⁴⁰⁴), antibody produced in rabbit (Sigma, SAD)
4. Phospho-Tau (Ser396) (PHF-13), mouse mAb (Cell Signaling, SAD)

5. Monoclonal Anti-Tau antibody produced in mouse (Sigma-Aldrich, SAD)
6. Monoclonal Anti- β -Actin antibody produced in mouse, monoclonal AC-15 (Sigma-Aldrich, SAD)
7. Anti-GAPDH, rabbit IgG (Imgenex, USA).

Sekundarna:

1. Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody (Cell Signaling Technology, SAD)
2. Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (Cell Signaling Technology, SAD)

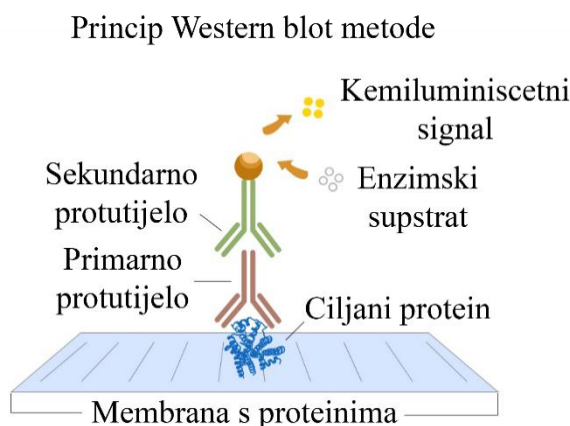
3.3. Western blot metoda

Postupak:

- I. Homogeniziranje uzoraka olfaktornog bulbusa u Lysis puferu za homogeniziranje
- II. Određivanja koncentracije proteina metodom po Lowryju
- III. Priprema 9%-tnog donjeg i gornjeg SDS-PAGE (*engl. Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) gela
- IV. Nanošenje uzoraka na gel u različitim količinama (μ l) sukladno molekulskoj masi ispitivanog proteina

KORAK:	KEMIKA LIJE:	VRIJEME:
1. Elektroforeza proteina na 150V	9% SDS-PAGE gel, uz pufer za razdvajanje	60'
2. Prijenos na membrane na 100 V	Pufer za prijenos pH 8,8	60'
3. Bojanje membrana	Ponceau boja	1-3'
4. Ispiranje membrana	LSWB	3x5'
5. Blokiranje nespecifičnog vezanja	LSWB/5% nemasno mlijeko/0,5%Tween 20	60'
6. Ispiranje membrana	LSWB	3x5'
7. Inkubacija u primarnom protutijelu:		
I. <i>Anti-Insulin receptor (β-subunit), clone CT-3, mouse monoclonal (Millipore, SAD);</i>		
II. <i>Anti-IDE, N-terminal (97-273), rabbit pAb (Calbiochem, Njemačka);</i>		
III. <i>Anti-phospho-Tau (pSer404), antibody produced in rabbit (Sigma, SAD)</i>	Razrjeđenja protutijela (μ l) u puferu za blokiranje:	
IV. <i>Phospho-Tau (Ser396) (PHF-13), mouse mAb (Cell Signaling, SAD)</i>	I. Protutijelo 1:1000	
V. <i>Monoclonal Anti-Tau antibody produced in mouse (Sigma-Aldrich, SAD)</i>	II. Protutijelo 1:2000	
VI. <i>Monoclonal Anti-β-Actin antibody produced in mouse, monoclonal AC-15 (Sigma-Aldrich, SAD)</i>	III. Protutijelo 1:1000	Preko noći na +4 °C
VII. <i>Anti-GAPDH, rabbit IgG (Imgenex USA)</i>	IV. Protutijelo 1:500	
	V. Protutijelo 1:1000	
	VI. Protutijelo 1:5000	
	VII. Protutijelo 1:2000	
8. Ispiranje membrana	LSWB	3x5'
9. Inkubacija u sekundarnom protutijelu		
I. <i>Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody (Cell Signaling Technology, SAD)</i>	Razrjeđenje oba protutijela (μ l) u puferu za blokiranje:	60'
II. <i>Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (Cell Signaling Technology, SAD)</i>	1:5000	
10. Ispiranje membrana	LSWB	3x5'
11. Izlaganje kemiluminescentu	Luminol	2'
12. Ekspozicija	Detekcija kamerom	1-180"

Nakon elektroforeze proteina iz tkiva olfaktornog bulbosa čime se proteini različite molekularne mase razdvoje putujući kroz 9% SDS-PAGE gel uz pufer za razdvajanje (pH 8,3), slijedi prijenos na nitroceluloznu membranu uz pufer za prijenos. Postupak se nastavlja blokiranjem membrana u 5%-tnoj otopini nemasnog mlijeka (da se smanji nespecifično vezanje) i inkubiranjem s odgovarajućim primarnim protutijelom za: IR, IDE, tau, p-tau preko noći na +4°C.



Slika 7: Princip Western blot metode (Modificirano prema: https://www.elabscience.com/western_blot-introduction_and_principles_of_western_blot-306.html)

Nakon ispiranja u puferu (LSWB), membrane su inkubirane na sobnoj temperaturi sa sekundarnim protutijelom. Nakon završnog ispiranja u puferu (LSWB) koristi se kemiluminescent za finalno inkubiranje membrana pri čemu dolazi do oksidacije luminola kataliziranog peroksidazom. Dobiveni signal vizualizira se pomoću kemiluminiscentnog Western blot detekcijskog kita i bilježi video kamerom u programu GelCapture. (Slika 8)

Propisi za pripremanje otopina, pufera i gelova:

LYSIS PUFER za homogeniziranje uzoraka sastoji se od:

- 50mM Tris, pH 8
- 150mM NaCl
- 0.5mM EDTA (engl. *EthyleneDiamineTetraacetic Acid*)
- 1mM DTT (engl. *DiThioThreitol*)
- 0.01M natrijev vanadat
- 0.5% natrijev deoksikolat

1% NP-40

0.1% SDS (*engl. Sodium Dodecyl Sulfate*)

Otopina za određivanje koncentracije proteina po Lowryju sastoji se od:

Bisakrilamid

0,1 M HCl

2 % Na₂CO₃

0,1 M NaOH

1 % CuSO₄·5H₂O

2 % NaK tartarat

folin-ciocalteu reagens

DONJI GEL (SEPARATING) 9% sastoji se od:

Tris Cl/SDS pH 8,8

30 % akrilamid/0,8% bisakrilamid

10 % amonij persulfat

TEMED (**TE**tra**M**ethyl**E**thylene**D**iamine)

dd H₂O

GORNJI GEL sastoji se od:

Tris Cl/SDS pH 6,8

30% akrilamid/0,8% bisakrilamid

10% amonij persulfat

TEMED

dd H₂O

LSWB pufer (*engl. Low Salt Washing Buffer*) sastoji se od:

0,5 mM Tris baza

7,5 mM NaCl

pH 7,4

Pufer za blokiranje sastoji se od:

Mlijeko u prahu

Tween 20

LSWB

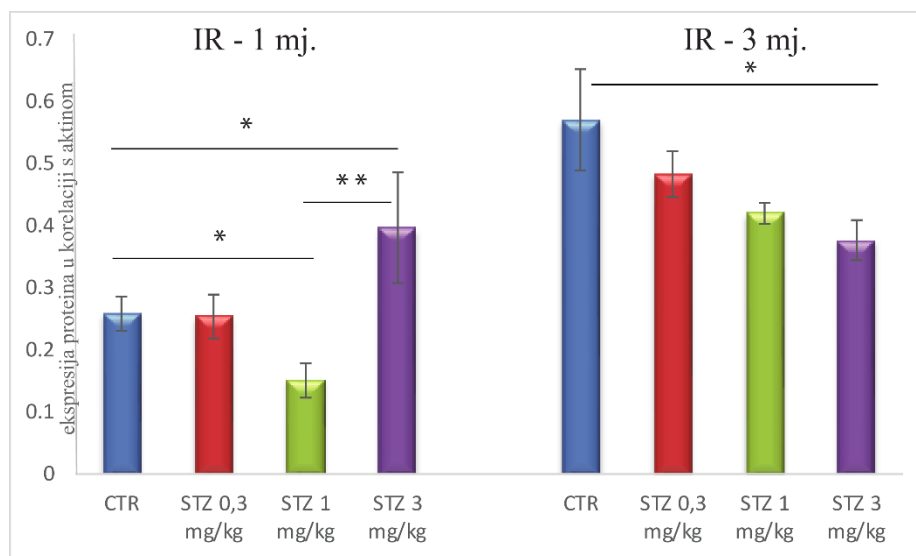
3.4. Analiza i statistička obrada podataka

Slike uslikane kamerom kao prikaz rezultata Western blot metode prvotno su obrađene i analizirane u *ImageJ* programu. Potom su dobiveni podaci statistički obrađeni *Kruskal-Wallis* metodom i neparametrijskim *Mann-Whitney U testom* u programu *StatView* kako bi se međusobno usporedile razlike među ispitivanim grupama. Svi kvantitativni rezultati koji su dobiveni u ovom eksperimentu izraženi su kao aritmetička sredina $\pm$ standardna srednja pogreška (SEM, *engl. standard error of mean*) i prikazani u obliku grafikona sa stupcima. Kao statistički značajna, uzeta je vrijednost $p < 0,05$.

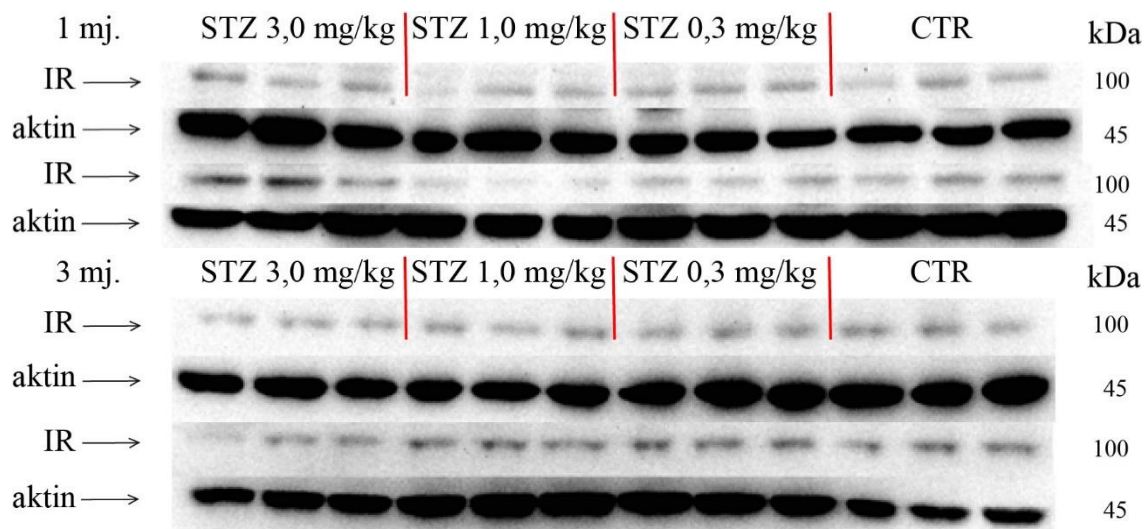
4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom diplomskom radu Western blot metodom istraživale su se neurokemijske promjene ekspresije proteina i enzima u inzulinskom sustavu mozga kod STZ-icv štakora, te ovisnost o dozi i vremenu proteklom nakon STZ-icv primjene. Imunodetekcijom proteina u olfaktornom bulbusu istraživana je ekspresija slijedećih proteina: IR, IDE, t-tau i p-tau. Ekspresija svih proteina rađena je jedan mjesec (1 mj.) i tri mjeseca (3 mj.) nakon STZ-icv primjene u dozama od 0,3 mg/kg, 1,0 mg/kg i 3,0 mg/kg. Rezultati su izneseni u obliku grafova, a slike dobivene Western blotom prikazane su samo za vremenska razdoblja i doze kod kojih je nađena statistički značajna promjena u ekspresiji proteina ($p < 0,05$).

4.1. Ekspresija inzulinskog receptora u olfaktornom bulbusu jedan i tri mjeseca nakon STZ-icv primjene u dozama od 0,3 mg/kg, 1,0 mg/kg i 3,0 mg/kg



Graf 2: Ekspresija proteina, odnosno inzulinskog receptora (IR) u korelaciji s aktinom ovisno o dozi i dužini primjene; CTR = kontrola, STZ = streptozotocin



Slika 8: Prikaz Western blot slike korištene za analizu ekspresije inzulinskog receptora (IR) u olfaktornom bulbusu 1 i 3 mjeseca nakon STZ-icv primjene. IR je protein koji se nalazi na ≈ 91 kDa, dok aktin na ≈ 45 kDa. Aktin je korišten kao kontrola unesenog uzorka. CTR-kontrolna skupina, STZ-streptozotocin icv štakori. Brojevi s desne strane slike označavaju kiloDaltone.

Ekspresija proteina, odnosno IR u olfaktornom bulbusu:

- a) **1 mjesec nakon STZ-icv primjene** u odnosu na kontrolnu skupinu životinja kod doze 1 mg/kg bila je smanjena 41,5% ($p=0,02$) dok kod doze 3 mg/kg povećana 52,8% ($p=0,03$). Uočene su razlike među grupama ovisno od dozi, stoga je u odnosu na dozu 1 mg/kg ekspresija IR kod 3 mg/kg povećana 161,4% ($p=0,004$). (Graf 2 i slika 9)
- b) **3 mjeseca nakon STZ-icv primjene** u odnosu na kontrolnu skupinu životinja kod doze 3 mg/kg bila je smanjena 33,9% ($p=0,044$). (Graf 2 i slika 9)

S obzirom da je ekspresija IR kod primijenjene doze od 3mg/kg STZ-icv statistički znatno povećana nakon mjesec dana, a snižena nakon tri mjeseca (Graf 2), možemo pretpostaviti da je prvo došlo do povećane ekspresije IR na membranama kako bi se zadovoljile potrebe organizma budući da STZ uzrokuje hiperinzulinemiju zbog strukturne sličnosti s glukozom i ulaskom kroz GLUT2 u stanice. (Knezovic i sur., 2017) Nakon određenog vremena, lučenje velikih količina inzulina prestaje, IR propadaju zbog patofizioloških promjena uslijed progresije AB. U radu

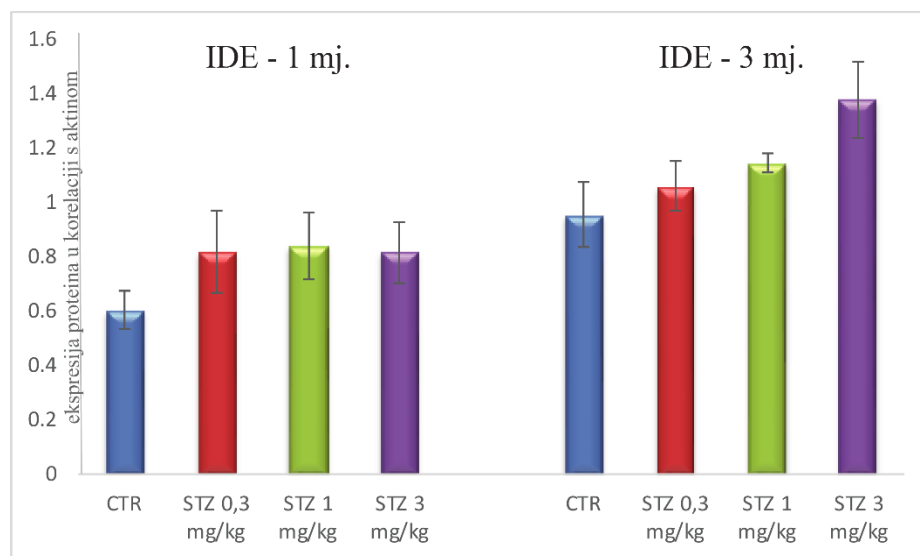
Arnold i sur., (2018) ističu da povećana ekspresija IR zbog hiperinzulinemije nije uočena na neuronima već samo na glija stanicama.

Analizirajući i diskutirajući rezultate postavlja se pitanje zašto je nakon mjesec dana od STZ-icv primjene u dozi od 1mg/kg ekspresija IR snižena, dok kod doze od 3mg/kg povećana. (Graf 2) Pretpostavka je da primjenom niže doze STZ ne dolazi do tako nagle hiperinzulinemije koja uzrokuje početno povećanje IR, već STZ patofiziološkim mehanizmima utječe na IR i remeti unutarstanični signalni put.

Uspoređujući dobivene rezultate s rezultatima ekspresije IR koje je Osmanović Barilar (2012, godina) dokazala u drugim moždanim regijama koje su zahvaćene AB, primjerice hipokampus (HPC), parijentalni korteks (PC), frontalni korteks (FC) i hipotalamus (HPT) u primijenjenoj dozi STZ-icv od 3mg/kg kod štakora uočeno je sljedeće: ekspresija IR u HPC bila je snižena nakon 1 mj. i 3 mj., dok u PC samo nakon 1 mj., a u FC i HPT nije zabilježena nikakva promjena nakon oba vremenska perioda. Ovi podaci daju nam uvid da su poremećaji na razini receptora u mozgu regionalno i vremenski specifični.

4.2. Ekspresija enzima koji razgrađuje inzulin u olfaktornom bulbusu jedan i tri mjeseca nakon STZ-icv primjene u dozama od 0,3 mg/kg, 1,0 mg/kg i 3,0 mg/kg

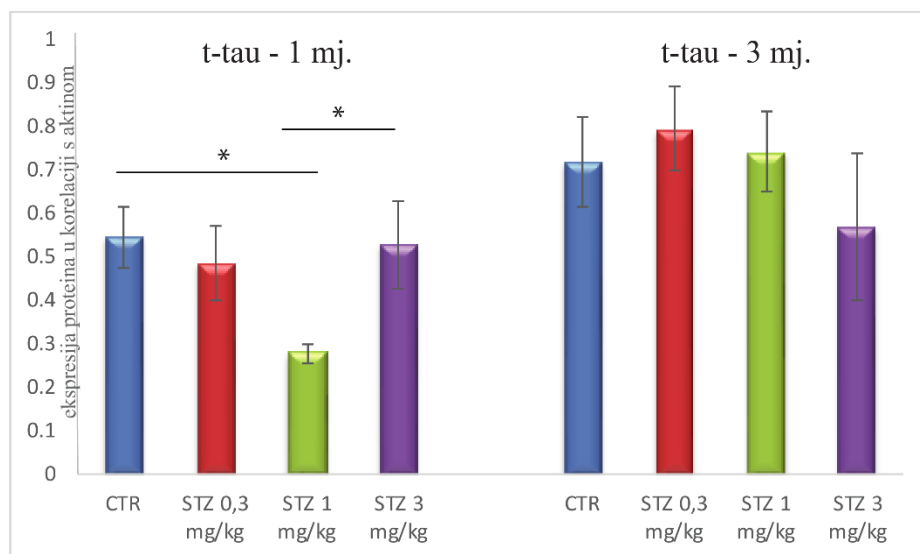
Ekspresija proteina, odnosno IDE u olfaktornom bulbusu kod STZ-icv tretiranih štakora u odnosu na kontrolnu skupinu životinja nije bila promijenjena kod nijedne dozi u niti jednoj od ispitivanih vremenskih točaka. (Graf 3)



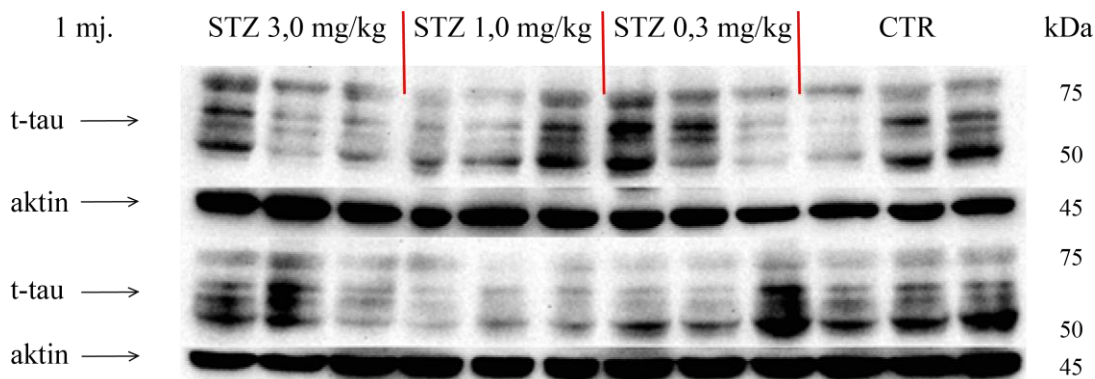
Graf 3: Ekspresija proteina (IDE) u korelaciji s aktinom ovisno u dozi i dužini primjene

Budući da je ekspresija IDE nepromijenjena (Graf 3), a uzevši u obzir funkciju i ulogu enzima u fiziološkim uvjetima, ali i patofiziološkim procesima sAB gdje sudjeluje razgradnji inzulina i A β plakova, može se nagađati da uzrok leži u tome da hiperinzulinemija nije bila toliko jaka da bi aktivirala povećano stvaranje IDE jer je bio uključen kompenzatorni mehanizam povećanog stvaranja IR kao odgovora na povećano lučenje inzulina uslijed STZ-icv primjene. U *post mortem* istraživanju imunohistokemijskim analizama kod pacijenata koji su bolovali od AB, Lachen-Montens i sur., (2017) dokazali su da u OFB u ranijim fazama bolesti nije drastično povećana koncentracija A β plakova. S oprezom možemo pretpostaviti da je to također jedan od razloga zašto nije došlo do promjena u ekspresiji IDE. No, važno je napomenuti da je ova studija rađena na preminulim pacijentima, te je potreban oprez u korelacijama rezultata dobivenih na animalnim modelima i na *post mortem* ljudskim tkivima, no svakako treba pokušati logično povezivati nastale promjene.

4.3. Ekspresija ukupnog tau proteina u olfaktornom bulbusu jedan i tri mjeseca nakon STZ-icv primjene u dozama od 0,3 mg/kg, 1,0 mg/kg i 3,0 mg/kg



Graf 4: Ekspresija proteina (t-tau) u korelaciji s aktinom ovisno u dozi i dužini primjene



Slika 9: Prikaz Western blot slike korištene za analizu ekspresije ukupnog tau proteina (t-tau) u olfaktornom bulbusu 1 i 3 mjeseca nakon STZ-icv primjene. T-tau je protein koji se nalazi na $\approx 50-75$ kDa, dok aktin na ≈ 51 kDa. Aktin je korišten kao kontrola unesenog uzorka. CTR-kontrolna skupina, STZ-streptozotocin icv štakori. Brojevi s desne strane slike označavaju kiloDaltone.

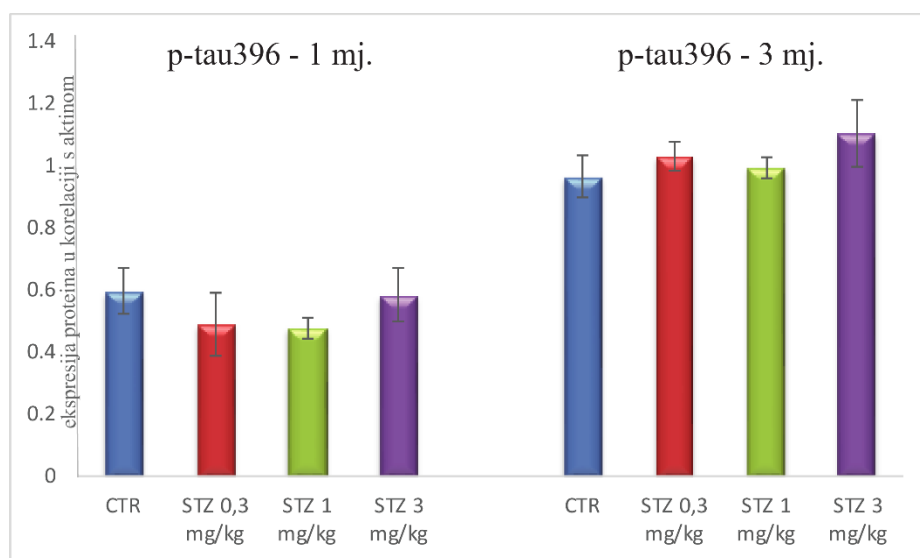
Ekspresija proteina, odnosno t-tau u olfaktornom bulbusu:

- a) **1 mjesec nakon STZ-icv primjene** u odnosu na kontrolnu skupinu životinja kod doze 1 mg/kg bila je smanjena 49% ($p=0,01$). Uočene su razlike među grupama ovisno od dozi, stoga je u odnosu na dozu 1mg/kg ekspresija t-tau kod 3 mg/kg povećana 89,5% ($p=0,004$). (Graf 4 i slika 10)
- b) **3 mjeseca nakon STZ-icv primjene** u odnosu na kontrolnu skupinu životinja nije bila promijenjena kod nijedne dozi. (Graf 4)

U dobivenim rezultatima uočavamo da je t-tau samo akutno snižen jedan mjesec nakon primijenjene doze od 1 mg/kg STZ-icv (Graf 4) što se može povezati i korelirati sa sniženom ekspresijom IR u istom vremenskom periodu kod iste doze STZ. Uspoređujući dobivene rezultate s rezultatima ekspresije t-tau koje je Osmanović Barilar (2012), dokazala u drugim moždanim regijama koje su zahvaćene AB, kao što su HPC, PC, FC i HPT u primijenjenoj dozi STZ-icv od 3mg/kg kod štakora nisu uočene nikakve promjena nakon oba vremenska perioda. Ovi podaci nam daju na uvid da je ekspresija ukupnog tau proteina kod doze od 3 mg/kg uniformna, odnosno nepromijenjena u svim navedenim regijama pa tako i olfaktornom bulbusu.

4.4. Ekspresija hiperfosforiliranih oblika tau proteina u olfaktornom bulbusu jedan i tri mjeseca nakon STZ-icv primjene u dozama od 0,3 mg/kg, 1,0 mg/kg i 3,0 mg/kg

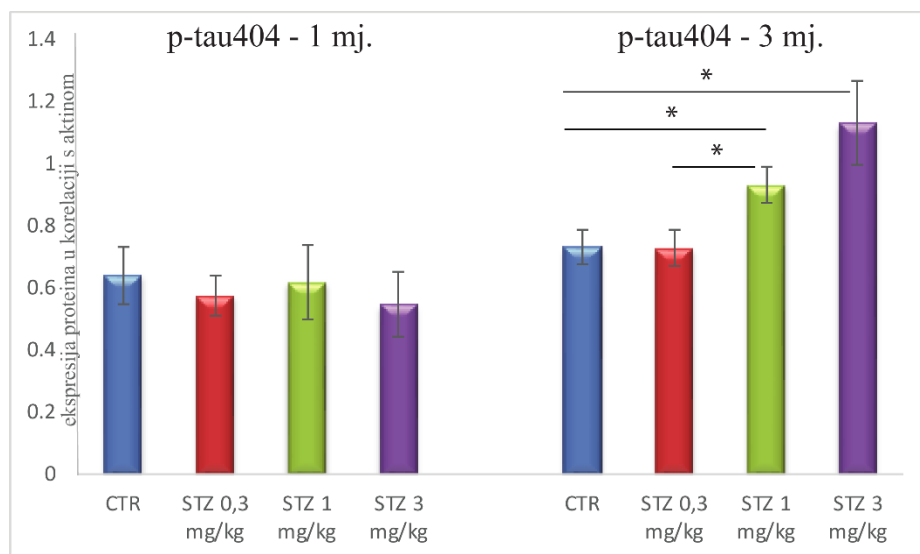
I. Hiperfosforilirani tau protein na aminokiselinskom ostatku Ser³⁹⁶



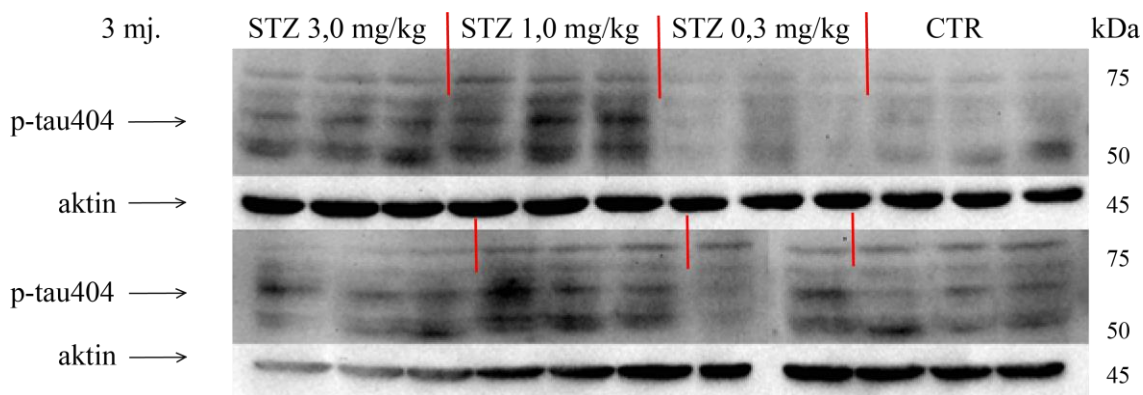
Graf 5: Ekspresija proteina (p-tau396) u korelaciji s aktinom ovisno u dozi i dužini primjene

Ekspresija proteina, odnosno p-tau396 u olfaktornom bulbusu kod STZ-icv tretiranih štakora u odnosu na kontrolnu skupinu životinja nije bila promijenjena kod nijedne dozi u niti jednoj od ispitivanih vremenskih točaka. (Graf 5)

II. Hiperfosforilirani tau protein na aminokiselinskom ostatku Ser⁴⁰⁴



Graf 6: Ekspresija proteina (p-tau404) u korelaciji s aktinom ovisno u dozi i dužini primjene



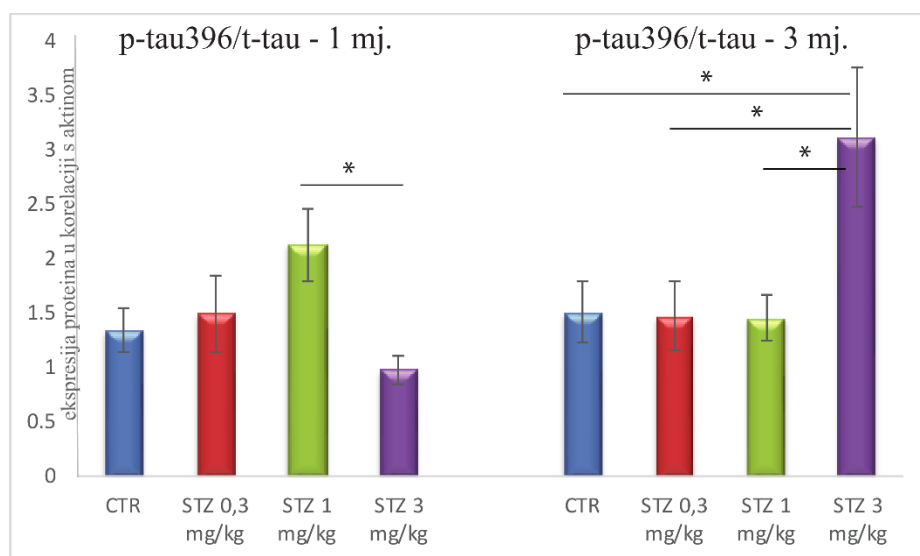
Slika 10: Prikaz Western blot slike korištene za analizu ekspresije fosforiliranog tau proteina (p-tau404) u olfaktornom bulbusu 1 i 3 mjeseca nakon STZ-icv primjene. T-tau je protein koji se nalazi na ≈ 50 -75 kDa, dok aktin na ≈ 51 kDa. Aktin je korišten kao kontrola unesenog uzorka. CTR-kontrolna skupina, STZ-streptozotocin icv štakori. Brojevi s desne strane slike označavaju kiloDaltone.

Ekspresija proteina, odnosno p-tau404 u olfaktornom bulbusu:

- a) 1 mjesec nakon STZ-icv primjene u odnosu na kontrolnu skupinu životinja nije bila promijenjena kod nijedne dozi. (Graf 6)

- b) 3 mjeseca nakon STZ-icv primjene** u odnosu na kontrolnu skupinu životinja kod doze 1 mg/kg i 3 mg/kg bila je povećana 27,2% ($p=0,02$), odnosno 54,4% ($p=0,05$). Uočene su razlike među grupama ovisno od dozi, stoga je u odnosu na dozu 0,3 mg/kg ekspresija p-tau404 kod 1 mg/kg povećana 28% ($p=0,044$). (Graf 6 i slika 11)

III. Omjer hiperfosforiliranog tau proteina na aminokiselinskom ostatku Ser³⁹⁶ u odnosu na ukupni tau protein



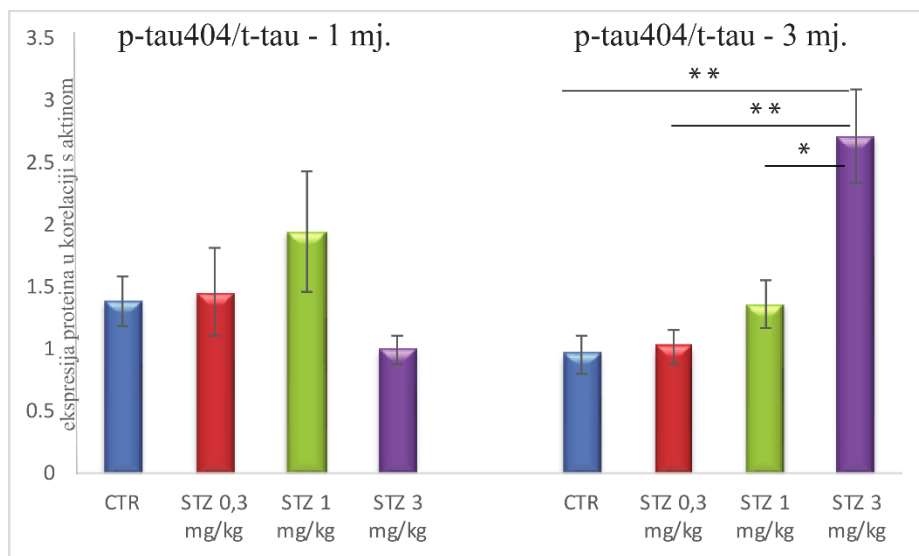
Graf 7: Ekspresija proteina (omjer p-tau396/t-tau) u korelaciji s aktinom ovisno u dozi i dužini primjene

Ekspresija proteina, odnosno omjera p-tau396/t-tau u olfaktornom bulbusu:

- a) 1 mjesec nakon STZ-icv primjene** u odnosu na kontrolnu skupinu životinja nije bila promijenjena kod nijedne dozi. Uočene su razlike među grupama ovisno od dozi, stoga je u odnosu na dozu 1 mg/kg ekspresija omjera p-tau396/t-tau kod 3 mg/kg smanjena 53,7% ($p=0,028$). (Graf 7)
- b) 3 mjeseca nakon STZ-icv primjene** u odnosu na kontrolnu skupinu životinja kod doze 3 mg/kg bila je povećana 105,9 ($p=0,045$). Uočene su razlike među grupama ovisno od dozi,

stoga je u odnosu na dozu 0,3 mg/kg i 1 mg/kg ekspresija omjera p-tau396/t-tau kod 3 mg/kg povećana 110,8% ($p=0,018$), odnosno 113,6% ($p=0,044$). (Graf 7)

IV. Omjer hiperfosforiliranog tau proteina na aminokiselinskom ostatku Ser⁴⁰⁴ u odnosu na ukupni tau protein



Graf 8: Ekspresija proteina (omjer p-tau404/t-tau) u korelaciji s aktinom ovisno u dozi i dužini primjene

Ekspresija proteina, odnosno omjera p-tau404/t-tau u olfaktornom bulbusu:

- 1 mjesec nakon STZ-icv primjene** u odnosu na kontrolnu skupinu životinja nije bila promijenjena kod nijedne dozi. (Graf 8)
- 3 mjeseca nakon STZ-icv primjene** u odnosu na kontrolnu skupinu životinja kod doze 3 mg/kg bila je povećana 183,7 ($p=0,009$). Uočene su razlike među grupama ovisno od dozi, stoga je u odnosu na dozu 0,3 mg/kg i 1 mg/kg ekspresija omjera p-tau404/t-tau kod 3 mg/kg povećana 166,8% ($p=0,009$), odnosno 100,2% ($p=0,018$). (Graf 8)

Kod svih primijenjenih doza STZ-icv i u svim vremenskim točkama p-tau396 (Graf 5) je bio nepromijenjen. S druge pak strane, p-tau404 je bio povećan 3 mjeseca nakon STZ-icv primjene u dozama od 1 mg/kg i 3 mg/kg. (Graf 6) Budući da smo statistički obradili p-tau396/t-tau (Graf 7) i p-tau404/t-tau (Graf 8), kod oba je dokazano povećanje 3 mjeseca nakon primjene STZ-icv u dozi od 3 mg/kg. Promjene u vidu povećanja hiperfosforilacije tau proteina na oba serinska ostatka koreliraju s rezultatom smanjene ekspresije IR. Upravo poznavanjem kaskadne reakcije inzulinske signalizacije te činjenice da smanjenje ekspresije IR vodi do hiperfosforilacije tau proteina i stvaranju neurofibrilarnih snopića dodatno potvrđujemo naše dobivene rezultate da su nastale promjene zaista procesi uključeni u patofiziološku pozadinu sAB u OFB. Rezultati ekspresije p-tau396/404 koje je Osmanović Barilar (2012) dokazala u drugim moždanim regijama koje su zahvaćene u sAB (HPC, PC, FC i HPT) 3 mjeseca nakon primijenjene doze STZ-icv od 3mg/kg kod štakora su povećanje p-tau u HPC, a smanjenje u PC. Ovi podaci nam dokazuju i povezuju da promjene u hiperfosforilaciji tau proteina, bilo na Ser³⁹⁶ ili Ser⁴⁰⁴ u svim dosad istraživanim regijama pa tako i u OFB nastupaju 3 mjeseca nakon STZ-icv primjene u dozi od 3 mg/kg.

Ono što za kraj možemo istaknuti je da rezultati istraživanja u ovom diplomskom radu pokazuju da su promjene unutarstanične inzulinske signalizacije u olfaktornom bulbusu najizraženije 3 mjeseca nakon primjene STZ-icv u dozi od 3 mg/kg.

5. ZAKLJUČCI

Ovim smo diplomskim radom Western blot metodom ispitivali ekspresiju proteina (IR, IDE, t-tau i p-tau) uključenih u inzulinsku signalizaciju na štakorskom modelu sAB.

Eksperimentalna sAB je uzrokovana primjenom STZ-icv u dozama od 0,3 mg/kg, 1,0 mg/kg i 3,0 mg/kg. Nakon jednog i tri mjeseca u olfaktornom bulbusu dokazali smo da:

- 1) Istraživane promjene u ekspresiji proteina su ovisne o dozi i vremenu;
- 2) Snižena ekspresija IR u olfaktornom bulbusu tijekom vremena dovodi do povišene hiperfosforilacije tau proteina;
- 3) Rezultati nam omogućuju bolje razumijevanje pozadine patofizioloških mehanizama u olfaktornom bulbusu sporadične Alzheimerove bolesti;
- 4) Olfaktorni bulbus treba nastaviti istraživati kao potencijalno mjesto djelovanja budućih lijekova u liječenju Alzheimerove bolesti;
- 5) Rezultati podupiru pretpostavku da navedene promjene mogu biti iskorištene u svrhu razvoja kliničkih biomarkera.

6. LITERATURA

Alzheimer Disease Clinical Presentation, 2018., <https://emedicine.medscape.com/>, pristupljeno 29.7.2018.

Alzheimer's Association. Alzheimer's Association Report 2018 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia* 2018, 14, 367-429.

Alzheimerova bolest, 2017., <https://www.hzjz.hr/>, pristupljeno 28.7.2018.

Arnold SE, Arvanitakis Z, Macauley-Rambach SL, Koenig AM, Wang HY, Ahima RS, Craft S, Gandy S, Buettner C, Stoeckel LE, Holtzman DM, Nathan DM. Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer disease: concepts and conundrums. *Nat Rev Neurol*. 2018, 14(3), 168-181.

Atri A, Chang MS, Strichartz GR. Cholinergic Pharmacology. U: Principles of Pharmacology The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy. Golan DE, Armstrong EJ, Armstrong AW, urednici, Philadelphia, Walters Kluwer, 2017, str. 139.

Barilar JO, Knezović A, Grünblatt E, Riederer P, Šalković-Petrišić M. Nine-month follow-up of the insulin receptor signalling cascade in the brain of streptozotocin rat model of sporadic Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna)*. 2015, 122(4), 565-576.

Berchtold NC, Cotman CW. Evolution in the Conceptualization of Dementia and Alzheimer's Disease: Greco-Roman Period to the 1960s. *Neurobiol Aging*, 1998, 19(3), 173-189.

Blennow K, Zetterberg H. Biomarkers for Alzheimer disease - current status and prospects for the future. *J Intern Med*. 2018, doi: 10.1111/joim.12816.[Epub ahead of print]

Colin L. Masters, Randall Bateman, Kaj Blennow, Christopher C. Rowe, Reisa A. Sperling and Jeffrey L. Cummings. Alzheimer's disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2015, 1, 1-18.

Congdon EE and Sigurdsson EM. Tau-targeting therapies for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. 2018, *Nature Reviews Neurology*. 2018, 14, 399-415.

Craig LA, Hong NS, McDonald RJ. Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. *Neurosci Biobehav Rev*. 2011, 35(6), 1397-1409.

Cummings J, Lee G, Mortsdorf T, Ritter A, Zhong K. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2017. *Alzheimers Dement (NY)*. 2017, 3(3), 367-384.

de la Monte SM. Brain insulin resistance and deficiency as therapeutic targets in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 2012, 9, 35-66.

de Tullio MB, Morelli L, Castaño EM. The irreversible binding of amyloid peptide substrates to insulin-degrading enzyme: A biological perspective. *Prion*. 2008, 2(2), 51-56.

Dementia, 2017., <http://www.who.int/>, pristupljeno 29.7.2018.

Devand DP. Olfactory Identification Deficits, Cognitive Decline, and Dementia in Older Adults. *Am J Geriatr Psychiatry*. 2016, 24(12), 1151-1157.

Ferreira-Vieira TH, Guimaraes IM, Silva FR, Ribeiro FM. Alzheimer's Disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr Neuropharmacol*. 2016, 14(1), 101–115.

Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F. Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*. 1996, 274, 99-102.

Im H, Manolopoulou M, Malito E, Shen Y, Zhao J, Neant-Fery M, Sun CY, Meredith SC, Sisodia SS, Leissring MA, Tang WJ. Structure of substrate-free human insulin-degrading enzyme (IDE) and biophysical analysis of ATP-induced conformational switch of IDE. *J Biol Chem*. 2007, 282(35), 25453-25463.

Kamat PK, Kalani A, Rai S, Swarnkar S, Tota S, Nath C, Tyagi N. Mechanism of Oxidative Stress and Synapse Dysfunction in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: Understanding the Therapeutics Strategies. *Mol Neurobiol*. 2016, 53(1), 648-661.

Kamat PK, Kalani A, Rai S, Swarnkar S, Tota S, Wang R, Reddy PH. Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2017, 57(4), 1041–1048.

Knezović A, Loncar A, Homolak J, Smailović U, Osmanović Barilar J, Ganoci L, Božina N, Riederer P, Šalković-Petrišić M. Rat brain glucose transporter-2, insulin receptor and glial expression are acute targets of intracerebroventricular streptozotocin: risk factors for sporadic Alzheimer's disease? *J Neural Transm (Vienna)*. 2017, 124(6), 695-708.

Kocahan S, Doğan Z. Mechanisms of Alzheimer's Disease Pathogenesis and Prevention: The Brain, Neural Pathology, N-methyl-D-aspartate Receptors, Tau Protein and Other Risk Factors. *Clin Psychopharmacol Neurosci*. 2017, 15(1), 1–8.

Lachén-Montes M, González-Morales A, Zelaya MV, Pérez-Valderrama E, Ausín K, Ferrer I, Fernández-Irigoyen J, Santamaría E. Olfactory bulb neuroproteomics reveals a chronological perturbation of survival routes and a disruption of prohibitin complex during Alzheimer's disease progression. *Sci Rep*. 2017a, 7(1), 9115.

Lachen-Montes M, Zelaya MV, Segura V, Fernández-Irigoyen J, Santamaría E. Progressive modulation of the human olfactory bulb transcriptome during Alzheimer's disease evolution: novel insights into the olfactory signaling across proteinopathies. *Oncotarget*. 2017b, 8(41), 69663–69679.

Mondragón-Rodríguez S, Perry G, Luna-Muñoz J, Acevedo-Aquino MC, Williams S. Phosphorylation of tau protein at sites Ser(396-404) is one of the earliest events in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2014, 40(2), 121-135.

Morris JC, Blennow K, Froelich L, Nordberg A, Soininen H, Waldemar G, Wahlund LO, Dubois B. Harmonized diagnostic criteria for Alzheimer's disease: recommendations. *J Intern Med*. 2014, 275(3), 204-13

Nakamura A, Kaneko N, Villemagne VL, Kato T, Doecke J, Doré V, Fowler C, Li QX, Martins R, Rowe C, Tomita T, Matsuzaki K, Ishii K, Arahata Y, Iwamoto S, Ito K1, Tanaka K, Masters CL, Yanagisawa K. High performance plasma amyloid- β biomarkers for Alzheimer's disease. *Nature*. 2018, 554(7691), 249-254.

Osmanović Barilar Jelena, Inzulinski sustav mozga u eksperimentalnom štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, 2012.

Roberson ED. Treatment of Central Nervous System Degenerative Disorders. U: Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. Brunton LL, Hilal-Dandan R, Knollmann BC, urednici, New York, McGraw-Hill, 2018, str. 333.

Scapin G, Dandey VP, Zhang Z, Prosise W, Hruza A, Kelly T, Mayhood T, Strickland C, Potter CS, Carragher B. Structure of the insulin receptor-insulin complex by single-particle cryo-EM analysis. *Nature*. 2018, 556(7699), 122-125.

Scheltens P, Blennow K, Breteler MM, de Strooper B, Frisoni GB, Salloway S, Van der Flier WM. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2016, 388(10043), 505-517.

Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cell of the rat pancreas. *Physiol Res*. 2001, 50, 537-546.

Šalković-Petrišić M. Amyloid cascade hypothesis: is it true for sporadic Alzheimer's disease. *Periodicum Biologorum*. 2008, 110(1), 17-25.

Šalković-Petrišić M, Osmanovic J, Grünblatt E, Riederer P, Hoyer S. Modeling sporadic Alzheimer's disease: the insulin resistant brain state generates multiple long-term morphobiological

abnormalities including hyperphosphorylated tau protein and amyloid-beta. *J Alzheimers Dis.* 2009, 18(4), 729-750.

Tražilica za lijekove, 2018., <http://www.hzzo.hr/>, pristupljeno 22.8.2018.

Treatment of dementia, 2018., <https://www.uptodate.com/>, pristupljeno 22.8.2018.

Vasavada MM, Martinez B, Wang J, Eslinger PJ, Gill DJ, Sun X, Karunanayaka P, Yang QX. Central Olfactory Dysfunction in Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment: A Functional MRI Study. *J Alzheimers Dis.* 2017, 59(1), 359-368.

Vieira MNN, Lima-Filho RAS, De Felice FG. Connecting Alzheimer's disease to diabetes: Underlying mechanisms and potential therapeutic targets. *Neuropharmacology.* 2018, 136(Pt B), 160-171.

Wang J, Gu BJ, Masters CL, Wang YJ. A systemic view of Alzheimer disease - insights from amyloid- β metabolism beyond the brain. *Nat Rev Neurol.* 2017, 13(10), 612-623.

What Are the Signs of Alzheimer's Disease?, 2017., <https://www.nia.nih.gov/>, pristupljeno 29.7.2018.

Wilson RS, Arnold SE, Schneider JA, Tang Y, Bennett DA. The relationship between cerebral Alzheimer's disease pathology and odour identification in old age. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2007, 78(1), 30-35.

Wiseman FK, Al-Janabi T, Hardy J, Karmiloff-Smith A, Nizetic D, Tybulewicz VLJ, Fisher EMC, Strydom A. A genetic cause of Alzheimer disease: mechanistic insights from Down syndrome. *Nat Rev Neurosci.* 2015, 16(9), 564-574.

World Alzheimer Report, 2015., <https://www.alz.co.uk/>, pristupljeno 28.7.2018.

Yamada K, Nabeshima T. Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs. *Pharm Ther.* 2000, 88, 93-113.

Zhang Y, Li P, Feng J, Wu M. Dysfunction of NMDA receptors in Alzheimer's disease. *Neurol Sci.* 2016, 37, 1039–1047.

Zou Y, Lu D, Liu L, Zhang H, Zhou Y. Olfactory dysfunction in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2016, 12, 869–875.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Prema literaturnim podacima, olfaktorna disfunkcija navodi se kao najraniji klinički simptom u sporadičnoj Alzheimerovoj bolesti (sAB) i može se povezati s hiperfosforilacijom tau proteina. Budući da u potpunosti nije razjašnjen patofiziološki mehanizam olfaktorne disfunkcije u sAB, cilj ovog istraživanja bilo je ispitati mogući odnos u ekspresiji slijedećih proteina: inzulinskog receptora (IR), enzima koji razgrađuje inzulin (IDE), ukupnog tau proteina (t-tau) i fosforiliranog tau proteina (p-tau) u olfaktorskom bulbusu (OFB) u različitim vremenskim periodima i dozama nakon streptozotocin-intracerebroventrikularne (STZ-icv) primjene. STZ-icv je reprezentativni životinjski model sAB.

Muškim Wistar štakorima bio je injiciran STZ-icv (0,3 mg/kg, 1,0 mg/kg, 3,0 mg/kg) ili citratni pufer (kontrolna skupina) te su žrtvovani jedan i tri mjeseca nakon tretmana. Ekspresija proteina mjerena je Western blot metodom. Podaci su analizirani Kruskal-Wallis i Mann-Whitney U testovima ($p < 0,05$).

U dozi od 0,3 mg/kg STZ-icv nije nađena promjena ispitivanih proteina nakon oba vremenska perioda. IDE je ostao nepromijenjen u svim dozama nakon oba vremenska perioda. IR je smanjen kod doze od 1,0 mg/kg 1 mjesec nakon STZ-icv, dok je doza od 3,0 mg/kg prvo povećala ekspresiju IR nakon 1 mjeseca, a zatim smanjila nakon 3 mjeseca. Nakon 3 mjeseca povećana je ekspresija p-tau/t-tau kod doze od 3,0 mg/kg STZ-icv.

Smanjena ekspresija IR u olfaktornom bulbusu može dovesti do hiperfosforilacije tau proteina. Rezultati pružaju bolji uvid u razumijevanje patofizioloških mehanizama koji stoje u pozadini olfaktorne disfunkcije kod sAB. Promjene u olfaktorskom bulbusu trebale bi se dodatno istražiti kao potencijalno mjesto djelovanja novih lijekova u Alzheimerovoj bolesti.

SUMMARY

According to literature data, olfactory dysfunction could be one of the earliest clinical symptom in Sporadic Alzheimer disease (sAD). The olfactory dysfunction in AD could be associated with hyperphosphorylation of tau protein. Since exact pathophysiological mechanism of olfactory dysfunction in sAD is not fully understood we aimed this study to investigate possible relationship between changes of insulin receptor (IR), insulin degrading enzyme (IDE), tau (t-tau) and phosphorylated tau (p-tau) in olfactory bulb (OFB) at different time points and doses after the streptozotocin-intracerebroventricularly (STZ-icv) treatment. STZ-icv is sAD representative animal model.

Male Wistar rats were injected with STZ-icv (0.3 mg/kg, 1.0 mg/kg, 3.0 mg/kg) or vehicle (controls) and sacrificed one and three months after the treatment. Protein expressions of IR, IDE, tau and p-tau in OFB were measured by Western blot method. Data were analyzed by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U test ($p < 0.05$).

At the dose of 0.3 mg/kg no change of expression of investigated proteins were found after both time points. IDE was unchanged in all applied doses after both time points. IR was decreased at 1.0 mg/kg only 1 month after STZ-icv, while dose of 3.0 mg/kg first increased IR after 1 month then decreased IR after 3 months. After 3 months the increment of p-tau/t-tau ratio was found at 3.0 mg/kg STZ-icv.

Decreased IR could lead to the increased tau phosphorylation in olfactory bulb. These results can provide better understanding of pathophysiological mechanism behind the olfactory dysfunction in sAD. The changes in olfactory bulb should be further explored as potential place for drug targeting in Alzheimer's disease.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmakologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

PROMJENE INZULINSKOG SIGNALNOG PUTA U OLFAKTORNOM BULBUSU EKSPERIMENTALNOG ŠTAKORSKOG MODELA SPORADIČNE ALZHEIMEROVE BOLESTI

Dalia Vađunec

SAŽETAK

Prema literaturnim podacima, olfaktorna disfunkcija navodi se kao najraniji klinički simptom u sporadičnoj Alzheimerovoj bolesti (sAB) i može se povezati s hiperfosforilacijom tau proteina. Budući da u potpunosti nije razjašnjen patofiziološki mehanizam olfaktorne disfunkcije u sAB, cilj ovog istraživanja bilo je ispitati mogući odnos u ekspresiji slijedećih proteina: inzulinskog receptora (IR), enzima koji razgrađuje inzulin (IDE), ukupnog tau proteina (t-tau) i fosforiliranog tau proteina (p-tau) u olfaktorskom bulbusu (OFB) u različitim vremenskim periodima i dozama nakon streptozotocin-intracerebroventrikularne (STZ-icv) primjene. STZ-icv je reprezentativni životinjski model sAB. Muškim Wistar štakorima bio je injiciran STZ-icv (0,3 mg/kg, 1,0 mg/kg, 3,0 mg/kg) ili citratni pufer (kontrolna skupina) te su žrtvovani jedan i tri mjeseca nakon tretmana. Ekspresija proteina mjerena je Western blot metodom. Podaci su analizirani Kruskal-Wallis i Mann-Whitney U testovima ($p < 0,05$). U dozi od 0,3 mg/kg STZ-icv nije nađena promjena ispitivanih proteina nakon oba vremenska perioda. IDE je ostao nepromijenjen u svim dozama nakon oba vremenska perioda. IR je smanjen kod doze od 1,0 mg/kg 1 mjesec nakon STZ-icv, dok je doza od 3,0 mg/kg prvo povećala ekspresiju IR nakon 1 mjeseca, a zatim smanjila nakon 3 mjeseca. Nakon 3 mjeseca povećana je ekspresija p-tau/t-tau kod doze od 3,0 mg/kg STZ-icv. Smanjena ekspresija IR u olfaktornom bulbusu može dovesti do hiperfosforilacije tau proteina. Rezultati pružaju bolji uvid u razumijevanje patofizioloških mehanizama koji stoje u pozadini olfaktorne disfunkcije kod sAB. Promjene u olfaktorskom bulbusu trebale bi se dodatno istražiti kao potencijalno mjesto djelovanja lijekova u Alzheimerovoj bolesti.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 50 stranica, 10 slika, 8 grafičkih prikaza i 47 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Alzheimerova bolest, inzulinski receptor, tau protein, olfaktorni bulbus

Mentorice: **Dr. sc. Jelena Osmanović Barilar**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Medicinskog fakulteta.*

Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Živka Juričić, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Jelena Osmanović Barilar, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Medicinskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2018.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmacology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

TRACING THE INSULIN SIGNALLING CHANGES IN OLFACTORY BULB OF THE RAT MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE

Dalia Vadunec

SUMMARY

According to literature data, olfactory dysfunction could be one of the earliest clinical symptom in Sporadic Alzheimer disease (sAD). The olfactory dysfunction in AD could be associated with hyperphosphorylation of tau protein. Since exact pathophysiological mechanism of olfactory dysfunction in sAD is not fully understood we aimed this study to investigate possible relationship between changes of insulin receptor (IR), insulin degrading enzyme (IDE), tau (t-tau) and phosphorylated tau (p-tau) in olfactory bulb (OFB) at different time points and doses after the streptozotocin-intracerebroventricularly (STZ-icv) treatment. STZ-icv is sAD representative animal model. Male Wistar rats were injected with STZ-icv (0.3 mg/kg, 1.0 mg/kg, 3.0 mg/kg) or vehicle (controls) and sacrificed one and three months after the treatment. Protein expressions of IR, IDE, tau and p-tau in OFB were measured by Western blot method. Data were analyzed by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U test ($p < 0.05$). At the dose of 0.3 mg/kg no change of expression of investigated proteins were found after both time points. IDE was unchanged in all applied doses after both time points. IR was decreased at 1.0 mg/kg only 1 month after STZ-icv, while dose of 3.0 mg/kg first increased IR after 1 month then decreased IR after 3 months. After 3 months the increment of p-tau/t-tau ratio was found at 3.0 mg/kg STZ-icv. Decreased IR could lead to the increased tau phosphorylation in olfactory bulb. These results can provide better understanding of pathophysiological mechanism behind the olfactory dysfunction in sAD. The changes in olfactory bulb should be further explored as potential place for drug targeting in Alzheimer's disease.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 50 pages, 10 pictures, 8 charts and 47 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Alzheimer disease, insulin receptor, tau protein, olfactory bulb

Mentors: **Jelena Osmanović Barilar, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb School of Medicine
Lidija Bach-Rojecky, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Lidija Bach-Rojecky, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Živka Juričić, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Jelena Osmanović Barilar, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb School of Medicine

The thesis was accepted: September 2018.