

# Akutni učinak galaktoze na oksidativni stres i metabolizam u moždanom deblu štakorskog modela sporadične Alzheimerove bolesti

---

Homolak, Jan

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:545016>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-26**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Jan Homolak**

**Akutni učinak galaktoze na oksidativni stres i  
metabolizam u moždanom deblu štakorskog  
modela sporadične Alzheimerove bolesti**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2018.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Jan Homolak**

**Akutni učinak galaktoze na oksidativni stres i  
metabolizam u moždanom deblu štakorskog  
modela sporadične Alzheimerove bolesti**

**DIPLOMSKI RAD**

**Zagreb, 2018.**

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za molekularnu neurofarmakologiju na Zavodu za farmakologiju i Hrvatskom institutu za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorskim vodstvom dr.sc. Ane Knezović u sklopu znanstvenog projekta „Therapeutic potential of oral galactose in experimental Alzheimer’s disease (GALAD)“ financiranog od Hrvatske zaklade za znanost (šifra projekta HRZZ-IP-2014-09-4639, voditelj projekta prof.dr.sc. Melita Šalković-Petrišić) i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2017./2018.

## Popis i objašnjenje korištenih kratica

<b>AD:</b>	Alzheimerova bolest (eng. <i>Alzheimer's disease</i> )
<b>sAD:</b>	sporadični oblik Alzheimerove bolesti (eng. <i>sporadic Alzheimer's disease</i> )
<b>fAD:</b>	obiteljski oblik Alzheimerove bolesti (eng. <i>familial Alzheimer's disease</i> )
<b>A<math>\beta</math>:</b>	$\beta$ -amiloidni peptid
<b>AGE:</b>	napredni krajnji produkti glikacije (eng. <i>advanced glycation end products</i> )
<b>AP:</b>	<i>area postrema</i>
<b>APP:</b>	amiloidni prekursorski protein (eng. <i>amyloid precursor protein</i> )
<b>APS:</b>	amonij persulfat
<b>BS:</b>	moždano deblo (eng. <i>brain stem</i> )
<b>CSF:</b>	cerebrospinalni likvor (eng. <i>cerebrospinal fluid</i> )
<b>DAMP:</b>	molekularni obrazac povezan s ozljedom (eng. <i>damage-associated molecular pattern</i> )
<b>DMNX:</b>	dorzalna motorna jezgra vagusa (eng. <i>dorsal motor nucleus of vagus</i> )
<b>DNA:</b>	deoksiribonukleinska kiselina (eng. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
<b>DPPIV:</b>	dipeptidil peptidaza IV (eng. <i>dipeptidyl peptidase IV</i> )
<b>DTNB:</b>	5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoat)
<b>DVC:</b>	dorzalni vagalni kompleks (eng. <i>dorsal vagal complex</i> )
<b>ELISA:</b>	enzimski imunotest (eng. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
<b>ERK:</b>	kinaza pod kontrolom izvanstaničnih signala (eng. <i>extracellular signal-regulated kinase</i> )
<b>GALE:</b>	uridin difosfat galaktoza 4'-epimeraza (eng. <i>uridine diphosphate galactose 4'-epimerase</i> )
<b>GALK:</b>	galaktokinaza (eng. <i>galactokinase</i> )
<b>GALT:</b>	galaktoza-1-fosfat uridililtransferaza (eng. <i>galactose-1-phosphate uridylyltransferase</i> )

**GFAP:** kiseli vlaknasti protein glije (eng. *glial fibrillary acidic protein*)

**GIP:** o glukozi ovisni inzulintropni polipeptid (eng. *glucose-dependent insulintropic polypeptide*)

**GLP-1:** peptid sličan glukagonu 1 (eng. *glucagon like peptide 1*)

**GLUT1:** transporter za glukozu 1 (eng. *glucose transporter 1*)

**GLUT3:** transporter za glukozu 3 (eng. *glucose transporter 3*)

**GLUT4:** transporter za glukozu 4 (eng. *glucose transporter 4*)

**GLUT8:** transporter za glukozu 8 (eng. *glucose transporter 8*)

**GSK-3 $\beta$ :** glikogen sintaza kinaza 3 $\beta$  (eng. *glycogen synthase kinase 3 $\beta$* )

**IRBS :** inzulinska rezistencija u mozgu (eng. *insulin resistant brain state*)

**IR:** inzulinski receptor (eng. *insulin receptor*)

**IR-A:** izoforma A inzulinskog receptora

**IR-B:** izoforma B inzulinskog receptora

**IRS1:** supstrat 1 inzulinskog receptora (eng. *insulin receptor substrate 1*)

**IRS2:** supstrat 2 inzulinskog receptora (eng. *insulin receptor substrate 2*)

**KPB:** kalijev fosfatni pufer (eng. *potassium phosphate buffer*)

**LC:** *locus coeruleus*

**LDL:** lipoprotein niske gustoće (eng. *low density lipoprotein*)

**LSWB:** pufer za ispiranje s niskom koncentracijom soli (eng. *low salt washing buffer*)

**MDA:** malondialdehid

**mTOR:** meta rapamicina u sisavaca (eng. *mammalian target of rapamycin*)

**NBM:** *nucleus basalis Meynert*

**NDS:** seruma magarca (eng. *normal donkey serum*)

**NMDAR:** receptor za N-metil-D-aspartat (eng. *N-methyl-D-aspartate receptor*)

**NO:** dušični oksid (eng. *nitric oxide*)

**NST:** transporter za nukleotidne šećere (eng. *nucleotide sugar transporter*)

**P70S6K:** beta 1 kinaza ribosomalnog proteina S6 (eng. *ribosomal protein S6 kinase beta-1*)

**PAMP:** molekularni obrazac povezan s patogenima (eng. *pathogen-associated molecular pattern*)

**PFA:** paraformaldehid

**PHF:** filamenti spareni u dvostruku uzvojnici (eng. *paired helical filament*)

**PI3K:** fosfatidilinozitol 3-kinaza (eng. *phosphatidylinositol-3-kinase*)

**pP70S6K:** fosforilirani oblik beta 1 kinaze ribosomalnog proteina S6

**PSEN1:** presenilin 1

**PSEN2:** presenilin 2

**pULK1:** fosforilirani oblik Unc-51-slične kinaze 1 (eng. *Unc-51-like kinase 1*)

**SAD:** Sjedinjene Američke Države

**SEM:** standardna pogreška (eng. *standard error of the mean*)

**SN:** *substantia nigra*

**STZ:** streptozotocin

**STZ-icv:** intracerebroventrikularna administracija streptozotocina

**TNB:** 5-tio-2-nitrobenzoat

**UDP-gal:** uridil difosfat-galaktoza (eng. *uridine diphosphate-galactose*)

**UDP-glc:** uridin difosfat-glukozu (eng. *uridine diphosphate-glucose*)

**ULK1:** Unc-51 slična kinaza 1 koja aktivira autofagiju (eng. *Unc-51 like autophagy activating kinase*)

**VIR:** vagalni upalni reflex (eng. *vagal inflammatory reflex*)

# **SADRŽAJ**

## **SAŽETAK**

## **SUMMARY**

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
1.1. Alzheimerova bolest	1
1.1.1 Epidemiologija	1
1.1.2 Klinička slika	2
1.1.3 Neuropatološka obilježja	2
1.1.4 Etiopatogeneza Alzheimerove bolesti	3
1.2. Moždana inzulinska rezistencija u Alzheimerovoj bolesti	4
1.3. Štakorski model sporadične Alzheimerove bolesti	6
1.4. Moždano deblo u Alzheimerovoj bolesti	7
1.5. Integrativna metabolička i imunoregulatorna uloga dorzalne motorne jezgre vagusa	8
1.6. D-galaktoza	9
1.6.1 Metabolizam D-galaktoze	10
1.6.2 Intraperitonealna primjena D-galaktoze	11
1.6.3 Peroralna primjena D-galaktoze	12
<b>2. HIPOTEZA</b>	<b>14</b>
<b>3. OPĆI CILJ I SPECIFIČNI CILJEVI</b>	<b>14</b>
<b>4. MATERIJALI I METODE</b>	<b>15</b>
4.1. Materijali	15
4.1.1. Kemikalije	15
4.1.2. Životinje	15



<b>4.2.</b>	<b>Metode</b>	<b>16</b>
<b>4.2.1.</b>	<b>Eksperimentalni model sporadične Alzheimerove bolesti</b>	<b>16</b>
<b>4.2.2.</b>	<b>Žrtvovanje i uzimanje biološkog materijala</b>	<b>18</b>
<b>4.2.3.</b>	<b>Homogeniziranje tkiva</b>	<b>18</b>
<b>4.2.4.</b>	<b>Mjerenje koncentracije proteina</b>	<b>19</b>
<b>4.2.5.</b>	<b>Mjerenje glukoze, galaktoze, inzulina i GLP-1</b>	<b>19</b>
<b>4.2.6.</b>	<b>Western blot analiza</b>	<b>20</b>
<b>4.2.7.</b>	<b>Imunofluorescentno bojanje</b>	<b>22</b>
<b>4.2.8.</b>	<b>Mjerenje antioksidativnog kapaciteta i oksidativnog stresa</b>	<b>22</b>
<b>4.2.8.1.</b>	<b>Mjerenje aktivnosti katalaze</b>	<b>23</b>
<b>4.2.8.2.</b>	<b>Mjerenje ukupne količine reduciranog glutationa</b>	<b>23</b>
<b>4.2.8.3.</b>	<b>Mjerenje lipidne peroksidacije</b>	<b>23</b>
<b>4.2.9.</b>	<b>Statistička analiza</b>	<b>24</b>
<b>5.</b>	<b>REZULTATI</b>	<b>25</b>
<b>5.1.</b>	<b>Koncentracija galaktoze u plazmi i cerebrospinalnom likvoru</b>	<b>25</b>
<b>5.2.</b>	<b>Koncentracija glukoze u plazmi i cerebrospinalnom likvoru</b>	<b>27</b>
<b>5.3.</b>	<b>Koncentracija inzulina u plazmi i cerebrospinalnom likvoru</b>	<b>28</b>
<b>5.4.</b>	<b>Oksidativni stres u moždanom deblu</b>	<b>30</b>
<b>5.5.</b>	<b>Metaboličke promjene u moždanom deblu</b>	<b>32</b>
<b>5.6.</b>	<b>Metabolički signalizacijski putevi u DMNX</b>	<b>33</b>
<b>5.6.1.</b>	<b>Ekspresija fosforiliranog supstrata inzulinskog receptora 1 u DMNX</b>	<b>33</b>
<b>5.6.2.</b>	<b>Aktivnost mTOR sustava u DMNX</b>	<b>34</b>
<b>5.6.3.</b>	<b>Aktivnost autofagije u DMNX</b>	<b>35</b>

<b>5.6.4.</b>	<b>Ekspresija fosforilirane kinaze pod kontrolom izvanstaničnih signala u DMNX</b>	<b>37</b>
<b>5.6.5.</b>	<b>Ekspresija transportera glukoze u DMNX</b>	<b>38</b>
<b>5.7.</b>	<b>Učinak akutne peroralne i intraperitonealne administracije galaktoze na GLP-1 sustav</b>	<b>40</b>
<b>5.7.1.</b>	<b>Koncentracija ukupnog GLP-1 u plazmi i cerebrospinalnom likvoru</b>	<b>40</b>
<b>5.7.2.</b>	<b>Koncentracija aktivnog GLP-1 u plazmi</b>	<b>42</b>
<b>5.7.3.</b>	<b>Ekspresija GLP-1 receptora u DMNX</b>	<b>43</b>
<b>6.</b>	<b>RASPRAVA</b>	<b>45</b>
<b>7.</b>	<b>ZAKLJUČCI</b>	<b>52</b>
<b>8.</b>	<b>ZAHVALE</b>	<b>54</b>
<b>9.</b>	<b>POPIS LITERATURE</b>	<b>55</b>
<b>12.</b>	<b>ŽIVOTOPIS</b>	<b>64</b>

## SAŽETAK

### AKUTNI UČINAK GALAKTOZE NA OKSIDATIVNI STRES I METABOLIZAM U MOŽDANOM DEBLU ŠTAKORSKOG MODELA SPORADIČNE ALZHEIMEROVE BOLESTI

Jan Homolak

Kronična peroralna primjena galaktoze sprječava nastanak kognitivnog deficita u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti (sAD) koji se bazira na intracerebroventrikularnoj administraciji streptozotocina (STZ-icv). S druge strane kronična parenteralna primjena galaktoze potiče nastanak patoloških promjena koje se povezuju sa starenjem te se smatra životinjskim modelom ubrzanog starenja. Cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti akutne učinke peroralne i intraperitonealne galaktoze kako bi bolje razumjeli mehanizme koji posreduju štetne i blagotvorne učinke. Budući da se neuropatološke promjene u moždanom debalu u pacijenata sa sAD-om pojavljuju prije nego u supratentorijalnim regijama mozga, te da moždano debalo predstavlja integrativno središte metaboličke i imunološke homeostaze u ovom smo se istraživanju fokusirali na učinke galaktoze na moždano debalo s naglaskom na dorzalnu motornu jezgru vagusa (DMNX). Koncentracija galaktoze i glukoze istražena je u plazmi i cerebrospinalnom likvoru (CSF) nakon akutne primjene galaktoze. Enzimskim imunotestom istražili smo učinak galaktoze na ukupni i aktivni glukagonu sličan peptid 1 (GLP-1) te inzulin u plazmi i likvoru. Promjene parametara povezanih s oksidativnim stresom evaluirali smo esejima za aktivnost katalaze, količinu reduciranog glutaciona te lipidnu peroksidaciju. Ukupne metaboličke promjene moždanog debala istražene su analizom promjene fosforilacije proteina ključnih metaboličkih puteva Western blot metodom. Imunofluorescentnom analizom istražili smo promjene inzulinske signalizacije, autofagije, metabolizma, transporta glukoze i GLP-1 receptora u DMNX-u. Dobiveni rezultati pokazuju da galaktoza akutno utječe na oksidativni stres i metabolizam u moždanom debalu te na lučenje inzulina i GLP-1. Analizirani rezultati ukazuju na postojanje razlika u učinku galaktoze ovisnih o načinu primjene (peroralno ili intraperitonealno) i o prethodnom tretmanu životinje (kontrolne ili životinje tretirane sa STZ-icv) što je potrebno dodatno istražiti.

Ključne riječi: galaktoza, moždano debalo, Alzheimerova bolest, metabolizam, oksidativni stres

## **SUMMARY**

### **EFFECT OF ACUTE GALACTOSE ADMINISTRATION ON OXIDATIVE STRESS AND METABOLISM IN BRAIN STEM OF RAT MODEL OF SPORADIC ALZHEIMER'S DISEASE**

Jan Homolak

Chronic oral galactose treatment prevents cognitive deficit in rat model of sporadic Alzheimer's disease (sAD) induced by intracerebroventricular streptozotocin (STZ-icv) administration. On the contrary, chronic parenteral galactose treatment induces pathological changes associated with aging and it is used as an accelerated aging animal model. The aim of the study was to determine the effect of acute peroral or intraperitoneal galactose in order to elucidate mechanisms responsible for detrimental and beneficial effects. During the development of sAD neuropathological changes occur in brain stem before the ones in supratentorial brain regions. Moreover, brain stem represents an important integrative center of metabolic and immune homeostasis. For this reason, we decided to focus on the brain stem changes, particularly those in the dorsal motor nucleus of the vagus nerve (DMNX). Plasma and cerebrospinal fluid (CSF) glucose and galactose concentration was evaluated after acute galactose administration. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to determine changes in total and active fraction of glucagon-like peptide 1 (GLP-1) and insulin in plasma and CSF of galactose-treated animals. Oxidative stress was evaluated by measurement of catalase activity, reduced glutathion and lipid peroxidation. Metabolic effects in the whole brain stem were assessed by investigation of key metabolic pathway protein phosphorylation changes by western blot. Immunofluorescence was used to determine changes in insulin signaling, autophagy, metabolism, glucose transport and GLP-1 receptor expression in DMNX. Results suggest acute galactose administration modulates oxidative stress and metabolism in brain stem, as well as GLP-1 and insulin secretion. Our research indicates that the effect of galactose is dependant on the route of administration (oral or intraperitoneal) and previous animal treatment (control or STZ-icv treated animas), but further research is needed in order to fully understand the observed differences.

Key words: galactose, brain stem, Alzheimer's disease, metabolism, oxidative stress

## **1. UVOD**

### **1.1. Alzheimerova bolest**

Alzheimerova bolest (eng. *Alzheimer's disease*; AD) neurodegenerativna je bolest okarakterizirana progresivnim propadanjem kognitivnih funkcija i neuropsihijatrijskim simptomima. Smatra se najčešćim uzrokom demencije, a zbog kontinuiranog rasta broja oboljelih i nedovoljno učinkovite dijagnostike i liječenja predstavlja iznimno značajan biomedicinski i socioekonomski problem.

#### **1.1.1. Epidemiologija**

Alzheimerova bolest smatra se najčešćim uzrokom demencije s procijenjenim udjelom između 50 i 70% [1]. Dobno standardizirana prevalencija AD-a u stanovnika Europe starijih od 65 godina iznosi 4.4% [2]. U Sjedinjenim Američkim Državama (SAD), istraživanje na nacionalnom reprezentativnom uzorku stanovnika starijih od 70 godina procjenjuje nešto višu prevalenciju od 9.7% [3]. Procijenjena globalna prevalencija iznosi 3.9% u osoba starijih od 60 godina [4]. Incidencija AD-a kod osoba starijih od 65 godina u Europi iznosi 19.4 na 1000 osoba-godina [5], a u SAD-u na temelju podataka sakupljenih u Seattleu i Baltimoreu 15.0 na 1000 osoba-godina [6]. Incidencija AD-a pokazuje gotovo eksponencijalan rast s porastom dobi do 85. godine [1]. S obzirom na broj oboljelih koji je iznosio oko 40 milijuna 2016. godine i procijenjeni broj od 131 milijuna do 2050. godine (Prince i sur., 2016), te financijske izdatke za demenciju koji su 2010. iznosili 604 milijarde američkih dolara, a smatra se da će doseći čak 1.1 bilijun do 2050. [8], Alzheimerova bolest jedan je od ključnih biomedicinskih i socioekonomskih problema današnjice.

### **1.1.2. Klinička slika**

Alzheimerova bolest okarakterizirana je s 3 skupine simptoma: simptomi kognitivne disfunkcije, neuropsihijatrijski simptomi i simptomi povezani s nemogućnosti obavljanja svakodnevnih aktivnosti [9]. Kognitivno propadanje kod pacijenata očituje se gubitkom pamćenja, slabljenjem jezičnih funkcija, te slabljenjem izvršnih funkcija poput planiranja i koordinacije intelektualnih funkcija. Skupina neuropsihijatrijskih simptoma uključuje depresiju, halucinacije, deluzije i agitaciju. Skupina simptoma koja se odnosi na nemogućnost obavljanja svakodnevnih aktivnosti uključuje čitav niz jednostavnih (odijevanje i hranjenje) i kompleksnih (vožnja i obavljanje kupnje) aktivnosti koje pacijent uz progresivni tijek bolesti sve slabije može obavljati [9].

### **1.1.3. Neuropatološka obilježja**

Alzheimerova bolest praćena je makroskopskim i mikroskopskim neuropatološkim promjenama moždanog tkiva pacijenata. Makroskopske promjene povezane s AD-om uključuju atrofiju frontotemporalne i asocijativne moždane kore, povećanje volumena moždanih komora te smanjenje volumena hipokampusa [10]. Unutarstanični neurofibrilarni snopići i izvanstanični neuritički (senilni) plakovi smatraju se glavnim mikroskopskim promjenama u AD-u. Neurofibrilarni snopići nastaju pojačanom fosforilacijom tau proteina povezanog sa stabilizacijom mikrotubula koja uzrokuje nakupljanje netopljivih agregata. Neuritički plakovi nastaju akumulacijom peptida amiloida  $\beta$  ( $A\beta$ ) oko kojeg se nalaze distrofični neuritički izdanci i vrlo često mikroglijalne stanice ili reaktivni astrociti. Taloženje  $A\beta$  nađeno je i u stijenkama krvnih žila [10].

#### 1.1.4. Etiopatogeneza Alzheimerove bolesti

Uzrok Alzheimerove bolesti nije do kraja razjašnjen osim u 1 - 5% bolesnika s dijagnozom AD koji imaju obiteljski oblik bolesti (eng. *familial Alzheimer's disease*; fAD). Ovaj rijetki oblik bolesti uzrokovan je mutacijom ili duplikacijom u genu za protein amiloidnog prekursora (eng. *amyloid precursor protein*; APP) ili mutacijama gena za presenilin 1 (PSEN1) ili presenilin 2 (PSEN2). Ostalih 95 – 99% pacijenata ima sporadični oblik bolesti (eng. *sporadic Alzheimer's disease*; sAD) nerazjašnjene patofiziološke pozadine obilježene kompleksnom interakcijom brojnih genetskih i okolišnih faktora [11]. Brojne hipoteze generirane su s ciljem razjašnjavanja nastanka bolesti. To su hipoteza amiloidne kaskade, tau hipoteza, upalna hipoteza, hipoteza oksidativnog stresa, vaskularna hipoteza, kolesterolna hipoteza, hipoteza poremećaja homeostaze metalnih iona, inzulinska hipoteza, i druge (Mohandas i sur., 2009). Hipoteza amiloidne kaskade najpoznatija je i najzastupljenija u farmaceutskoj industriji i akademskoj zajednici u posljednjih 25 godina. Zagovaratelji ove hipoteze tvrde da do nastanka AD-a dolazi zbog patološkog nakupljanja A $\beta$  u moždanom parenhimu (Karran i sur., 2011). Iako se povezanost nakupljanja A $\beta$  i AD intenzivno istražuje na ljudima i životinjskim modelima, točan mehanizam kojim bi patološko nakupljanje ovog peptida uzrokovalo nastanak bolesti još nije razjašnjen. Nakupljanje A $\beta$  nije nužno praćeno neurodegeneracijom. Povišene razine A $\beta$  pronađene su i kod kognitivno zdravih starijih osoba [14], a osobe s Downovim sindromom u čijem se moždanom parenhimu često pronalazi patološko nakupljanje A $\beta$  zbog trostruke kopije gena APP ne razvijaju uvijek demenciju [15]. Tau hipoteza okarakterizirana je patološkom fosforilacijom i nakupljanjem tau proteina kao središnjim patofiziološkim događajima u nastanku AD-a. Promjene u fosforilaciji tau proteina mogu biti potaknute raznim unutarstaničnim i izvanstaničnim zbivanjima kao što su oksidativni stress, signalizacija lipoproteinom niske gustoće (eng. *Low density lipoprotein*; LDL), regulacijom kolesterola unutar neuralnih membranskih splavi,

homeostazom željeza i mikroglijalnim faktorima [16]. Patološka fosforilacija tau proteina dovodi do destabilizacije mikrotubula i nastanka neurofibrilarnih snopića koji ometaju homeostatske procese stanice [12]. Upalna hipoteza naglašava važnost upalnih procesa u pokretanju i progresiji bolesti. Upalni signalni putevi pojačano su aktivni u moždanom tkivu pojedinaca s AD, a protuupalni terapijski pristup istražuje se u kontekstu prevencije i usporavanja progresije bolest [17, 18]. Oksidativni stres jedan je od ključnih faktora u patofiziologiji AD-a. Slobodni kisikovi radikali svojevrsni su signalizacijski sustav stanice i usko su regulirani proizvodnjom i eliminacijom pomoću antioksidativnog sustava [19]. U trenutku kad količina slobodnih radikala premaši puferski kapacitet antioksidativnog sustava nastaje oksidacijsko oštećenje staničnih proteina, lipida i DNA (eng. *Deoxyribonucleic acid*; DNA) s posljedičnim narušavanjem funkcionalnog kapaciteta koje može napredovati do smrti stanice [19, 20]. U AD-u pronađena je povećana razina peroksidacije lipida [21] i smanjen kapacitet antioksidacijskih sustava [12]. U vaskularnoj hipotezi AD-a kronična hipoperfuzija mozga navodi se kao pokretač patoloških energetske promjene u mozgu, endotelne disfunkcije, oksidativnog stresa, smanjene sinteze proteina i astrocitoze koji dovode do neurodegeneracije [22]. Uz navedene hipoteze postoje i brojne druge koje pokušavaju objasniti nastanak AD. Jedna od hipoteza koja u kontekstu novih znanstvenih činjenica sve više dobiva na značaju je inzulinska hipoteza AD-a koja patološke procese povezuje s nastankom moždane inzulinske rezistencije.

## **1.2      Moždana inzulinska rezistencija u Alzheimerovoj bolesti**

Iako se mozak dugo smatrao inzulinsko-neovisnim organom, u zadnjih nekoliko desetljeća otkrivene su pleiotropne funkcije inzulina u mozgu ključne za održavanje normalne funkcije. Smatra se da je inzulinska važan za regulaciju metabolizma glukoze, sinaptičke plastičnosti i neuralnog rasta, sa značajnim neuroprotektivnim djelovanjem [23]. Inzulinska se



veže za inzulinski receptor (eng. *insulin receptor*, IR) koji ima dvije glavne izoforme IR-A i IR-B. IR-A ima veći afinitet za inzulin od IR-B i primarno se nalazi u razvijenom živčanom sustavu [24]. IR-B nalazi se u perifernim tkivima poput masnog tkiva i jetre, a u središnjem živčanom sustavu nalazi se na astrocitima [25]. Nakon vezanja za inzulinski receptor, inzulini potiče autofosforilaciju tirozinskih ostataka na beta podjedinici receptora što dovodi do aktivacije signalnih proteina supstrata inzulinskog receptora 1 (eng. *insulin receptor substrate 1*; IRS1) i supstrata inzulinskog receptora 2 (eng. *insulin receptor substrate 2*; IRS 2). Vezanje inzulina na receptor aktivira dvije glavne signalne kaskade – fosfatidilinozitol 3-kinaza (eng. *phosphatidylinositol-3-kinase*; PI3K) /Akt kaskadu ključnu za regulaciju metabolizma i sintezu proteina te Ras /kinaze pod kontrolom izvanstaničnih signala (eng. *extracellular signal-regulated kinases*; ERK)/ kaskadu koja modulira stanični rast i preživljenje [24]. Uz aktivaciju navedenih signalnih puteva, inzulini ostvaruje i neke druge još nedovoljno istražene učinke u mozgu. Pokazano je da uz inzulini-neovisne transportere za glukozu u mozgu – transporter za glukozu 1 (eng. *glucose transporter 1*; GLUT1) i transporter za glukozu 3 (GLUT3), postoje i o inzulini ovisni transporteri poput transportera za glukozu 4 (GLUT4) i transportera za glukozu 8 (GLUT8) u hipokampusu, sensorimotornim područjima moždane kore, hipotalamusu i hipofizi [24]. Osim toga, inzulini regulira ekspresiju receptora za N-metil-D-aspartat (eng. *N-methyl-D-aspartate receptor*, NMDAR) [26], razinu neurotransmitera noradrenalina i acetilkolina [27, 28], te vaskularnu funkciju učinkom na dušični oksid (eng. *nitric oxide*; NO) i endotelin-1 [24]. Ključna regulatorna uloga inzulini u sustavima usko povezanim s patogeneom bolesti govori u prilog hipotezi da je disfunkcija inzulinske signalizacije središnje zbivanje u etiopatogenezi sAD. U teoriji, patološke promjene koje nastaju u sklopu sAD-a mogle bi biti posljedica poremećene inzulinske signalizacije. Inzulini se smatra glavnim regulatorom cerebralnog metabolizma glukoze [23] koji je promijenjen već u ranim stadijima sAD-a [29]. Hipometabolizam uzrokovan narušenom inzulinskom signalizacijom uzrokuje poremećaj sustava regulatorne glikozilacije staničnih proteina, narušava homeostatsku i sinaptičku funkciju te neuronalni citoskelet [30]. Zbog narušene signalizacije PI3K/Akt puta

koja nastaje u stanju moždane inzulinske rezistencije (eng. *insulin resistant brain state*; IRBS) narušeno je preživljavanje neurona i oligodendroglijalnih stanica, neuronalna plastičnost i funkcija mijelina [30]. U IRBS pojačana je aktivnost glikogen sintaze kinaze  $3\beta$  (eng. *glycogen synthase kinase  $3\beta$* ; GSK- $3\beta$ ) i fosfataze koje dodatno negativno utječu na inzulinsku signalizaciju što dovodi do smanjene wnt signalizacije, upale [30]. Zbog inzulinske rezistencije smanjena je ekspresija inzulinom reguliranih gena poput kolin acetiltransferaze i gena povezanih s regulacijom metabolizma glukoze, a reaktivna hiperinzulinemija koja se razvija u stanju rezistencije uzrokuje cerebrovaskularne patofiziološke promjene [30]. Osim što hiperfosforilacija tau proteina s posljedičnom destabilizacijom mikrotubula, oksidativnim stresom i inzulinskom rezistencijom mogu u teoriji objasniti većinu patogenetskih promjena u sAD-u, eksperimentalni podaci potvrđuju ovu hipotezu. U AD-u snižena je razina cerebralnog inzulina i inzulinske mRNA [31, 32] te aktivnost tirozin kinaza [32]. Koncentracija signalnih supstrata (IRS1 i IRS2) inzulinskog receptora smanjena je kao i aktivnost glavnih nizvodnih signalnih puteva PI3K i ERK [33], a progresivno smanjenje proteina povezanih s inzulinskom signalizacijom u korelaciji je sa stadijem bolesti po Braaku [31].

### **1.3 Štakorski model sporadične Alzheimerove bolesti**

S obzirom na nedovoljno razjašnjene mehanizme patogeneze i velike metodološke, tehničke i etičke prepreke u istraživanju početka razvoja bolesti na ljudima, nove znanstvene spoznaje velikim se dijelom temelje na životinjskim eksperimentima. Često se kao modeli AD-a koriste transgenične životinje s pojačanom ekspresijom gena povezanom sa stvaranjem A $\beta$  (Elder i sur., 2010). Kako je podloga nastanka bolesti u ovim modelima genetska, ovakav je pristup opravdan i vrlo vrijedan u razjašnjavanju obiteljskog oblika bolesti, ali ne omogućava nam proučavanje patogeneze znatno češćeg, sporadičnog oblika. Za model sAD-a predložen je ne-transgenični štakorski model AD koji se dobiva intracerebroventrikularnom administracijom streptozotocina (STZ-icv)

(Šalkovic-Petrišić i sur., 2013). Streptozotocin (STZ) betacitotoksični je spoj koji se u istraživanjima na životinjama koristi za generiranje modela šećerne bolesti tipa 1 (periferna administracija visoke doze) i šećerne bolesti tipa 2 (višekratna periferna administracija niskih doza) [36]. Administracija niskih doza STZ-a intracerebroventrikularno dovodi do moždane inzulinske rezistencije (eng. insulin resistant brain state; IRBS) (Agrawal i sur., 2011; Grünblatt i sur., 2007), cerebralnog hipometabolizma (Hoyer i Lannert, 2007), smanjene kolinergične neurotransmisije (Biasibetti i sur., 2017), oksidativnog stresa (Prakash i sur., 2015), neuro-upale (Knezovic i sur., 2017) te uzrokuje neuropatološke promjene slične onima pronađenim u sAD-u poput hiperfosforilacije tau proteina, nastanka neurofibrilarnih promjena (Knezović i sur., 2015) i patološkog nakupljanja A $\beta$  (Knezović i sur., 2015; Šalkovic-Petrišić i sur., 2006). Uz navedene promjene STZ-icv uzrokuje progresivno oštećenje učenja i pamćenja (Knezović i sur., 2015). Zbog navedenih promjena STZ-icv model smatra se prikladnim za istraživanje promjena povezanih sa sAD [23, 35].

#### **1.4 Moždano deblo u Alzheimerovoj bolesti**

Moždano deblo dio je središnjeg živčanog sustava koji kontinuitetom sive i bijele tvari spaja kralježničnu moždinu s velikim i malim mozgom [45]. Moždano deblo od ključnog je značaja za normalno funkcioniranje organizma zbog spojnih i posredničkih i brojnih autonomnih funkcija [45]. Istraživanje struktura moždanog debela (eng. *brain stem*; BS) u AD-u sugerira da bi neuropatološke promjene u ovom području mogle biti uključene u rani razvoj bolesti. Postmortalnim analizama utvrđeno je da se neuropatološke promjene u strukturama BS-a razvijaju prije nego u supratentorijalnim regijama mozga. Neurofibrilarni snopići pojavljuju se u dorzalnim raphe jezgrama prije razvoja patoloških promjena u transentorijalnoj regiji (Grinberg i sur., 2009), a patološke promjene u raphe jezgrama proporcionalne su neuropatološkim promjenama stupnjevanim po Braak klasifikaciji (Rüb

i sur., 2000). Neuropatološke promjene subkortikalnih struktura u AD-u, osim dorzalnih raphe jezgara, zahvaćaju i druge jezgre BS i to primarno *nucleus basalis Meynert* (NBM), *locus coeruleus* (LC) i *substantia nigra* (SN) (Lyness i sur., 2003). U ovom istraživanju odlučili smo se fokusirati na promjene u dorzalnoj motornoj jezgri vagusa (eng. *dorsal motor nucleus of vagus*; DMNX), dijelu moždanog debla ključnom za regulaciju metaboličke homeostaze te sistemske i središnje upale (Pavlov i Tracey, 2012), dvije homeostatske funkcije koje se smatraju važnima u etiopatogenezi sAD.

## **1.5 Integrativna metabolička i imunoregulatorna uloga dorzalne motorne jezgre vagusa**

Dorzalna motorna jezgra vagusa dio je dorzalnog vagalnog kompleksa (eng. *dorsal vagal complex*; DVC) koji se smatra ključnim regulatornim središtem homeostaze kardiovaskularnog, respiratornog, endokrinog i imunološkog sustava organizma. Regulatorna funkcija DVC-a ostvaruje se integracijom uzlaznih interoceptivnih informacija sa silaznim visceromotornim signalima te modulacijom funkcije organa s ciljem sinkronizacije zasebnih sustava na razini organizma [50]. Dorzalna motorna jezgra vagusa eferentni je krak DVC-a putem kojeg se ostvaruje modulatorni učinak vagusa. U kontekstu etiopatogeneze sAD-a promjene DMNX mogle bi predstavljati patofiziološki mehanizam koji posreduje homeostatsku metaboličku i imunosnu disfunkciju organizma. Metabolička regulacija posredovana vagusom zasniva se na integraciji perifernih aferentnih informacija (iz probavnog trakta, jetre i gušterače), centralnih informacija (iz moždane kore i hipotalamusa) i informacija koje pristižu u DMNX neposrednim učinkom na DVC putem fenestriranih kapilara *areae postrema* (AP). Nakon integracije informacija eferentni krak DVC-a, primarno putem DMNX-a, regulira pokretljivost probavnog sustava [51], izlučivanje želučane kiseline [52], egzokrinu [53] i endokrinu [54] funkciju gušterače te jetrenu proizvodnju glukoze [55]. Vagalna regulacije upale posredovana je vagalnim

upalnim refleksom (eng. *vagal inflammatory reflex*; VIR), integriranim fiziološkim mehanizmom čiji aferentni krak sudjeluje u prepoznavanju proupalnih citokina, molekularnih obrazaca povezanih s ozljedom (eng. *damage-associated molecular pattern*; DAMP) i molekularnih obrazaca povezanih s patogenima (eng. *pathogen-associated molecular pattern*; PAMP), a eferentni krak regulira upalni odgovor primarno putem modulacije urođenog imunskog sustava (Chavan i sur., 2017; Pavlov i Tracey, 2012). Oštećenje DMNX u AD-u opisano je na funkcionalnoj (Polak i sur., 2007) i patohistološkoj razini (Parvizi i sur., 2001), a naša pilot istraživanja pokazuju da akutna administracija STZ-icv uzrokuje biokemijske promjene na razini DMNX-a vidljive i mjesec dana nakon intracerebroventrikularnog tretmana (neobjavljeni rezultati). S obzirom na važnu ulogu DMNX-a u fiziološkom metaboličkom odgovoru na nutrijente u ovom radu odlučili smo istražiti postoji li razlika u metaboličkom odgovoru DMNX-a na peroralnu i intraperitonealnu D-galaktozu kod kontrolnih i STZ-icv životinja i mogu li promjene na razini DMNX-a pomoći u razjašnjavanju učinka peroralne i intraperitonealne primjene D-galaktoze.

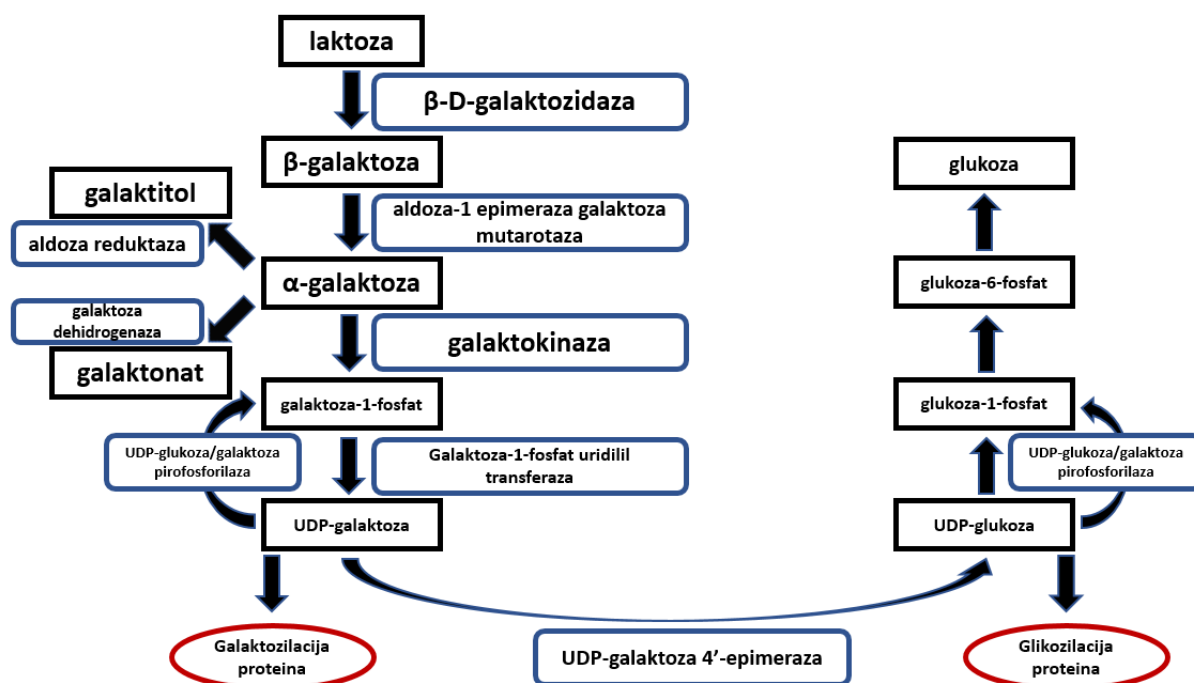
## **1.6 D-galaktoza**

D-galaktoza monosaharidni je šećer prvi put kristaliziran 1856. godine [59] koji se u prirodi kao i većina šećera pojavljuje u D-konfiguraciji. U biološkom svijetu D-galaktoza široko je rasprostranjena i nalazi se u slobodnoj i vezanoj formi u životinjskom, biljnom i bakterijskom svijetu [60]. Iako je strukturalno galaktoza C-4 epimer glukoze koji putem Leloirovog puta može biti metaboliziran u glukozu i iskorišten kao alternativni izvor energije, biološka važnost galaktoze nadilazi potencijalu energetske uloge [60].

### 1.6.1 Metabolizam D-galaktoze

Metabolizmom laktoze nastaje galaktoza u  $\beta$ -konformaciji koju aldoza-1 epimeraza galaktoza mutarotaza pretvara u anomer za koji je specifična struktura  $\alpha$ -piranoze [60]. Galaktoza u  $\alpha$ -konformaciji može biti metabolizirana u Leloirovom putu [60]. Leloirov put sastoji se od postepene pretvorbe  $\alpha$ -galaktoze u uridin difosfat-glukozu (eng. *uridine diphosphate-glucose*; UDP-glc) posredstvom tri enzima: galaktokinaze (eng. *galactokinase*; GALK), galaktoza-1-fosfat uridililtransferaze (eng. *galactose-1-phosphate uridylyltransferase*; GALT) i uridin difosfat galaktoza 4'-epimeraze (eng. *uridine diphosphate galactose 4'-epimerase*; GALE) koja može sudjelovati u energetskom metabolizmu preko glukoza fosfata (slika 1.) [60]. U prvom koraku Leloirovog puta  $\alpha$ -galaktoza pretvara se pomoću GALK-a u galaktoza-1-fosfat. U drugom koraku iz UDP-glc i galaktoza-1-fosfata pomoću enzima GALT nastaju glukoza-1-fosfat i uridil difosfat-galaktoza (eng. *uridine diphosphate-galactose*; UDP-gal). U zadnjem koraku GALE katalizira pretvorbu UDP-gal u UDP-glc (slika 1.) [60]. Ovaj metabolički put galaktoze kojim se galaktoza pretvara u glukozu smatra se glavnim, no postoje i drugi, alternativni metabolički putevi. Alternativni metabolički putevi galaktoze uključuju redukciju galaktoze pomoću enzima aldoza reduktaze kojom nastaje šećerni alkohol galaktitol, oksidaciju galaktoze pomoću galaktoza dehidogenaze uz galaktonat kao produkt reakcije te pirofosforilazni put (slika 1.) [60]. Uz energetski značaj galaktoze ključno je istaknuti važnost UDP-gal kao donora galaktoze u glikozilacijskim reakcijama usko povezanim s cijelim nizom bioloških procesa koji kontroliraju stanični povezanost, metaboličke puteve, aktivaciju receptora, signalne puteve i endocitozu [61]. Nakon proizvodnje UDP-gal u citoplazmi transporteri za nukleotidne šećere (eng. *nucleotide sugar transporters*; NST) aktivnim ju transportom prebacuju u endoplazmatski retikulum i Golgijevo tijelo gdje se iskorištava kao supstrat za glikoziltransferaze [60]. U regulaciji procesa glikozilacije važan je i posljednji enzim Leloirovog puta GALE koji osim već opisane reakcije sudjeluje i u

pretvorbi uridin difosfat-N-acetilglukozamina u uridin difosfat-N-acetilgalaktozamin i obrnuto [60].



Slika 1. Metabolizam galaktoze

### 1.6.2 Intraperitonealna primjena D-galaktoze

Kronična svakodnevna parenteralna primjena D-galaktoze kod miševa i štakora rezultira pojavom degenerativnih promjena povezanih sa starenjem i propadanje kognitivnih funkcija zbog čega se koristi kao životinjski model ubrzanog starenja [62, 63]. Iako mehanizam kojim parenteralna primjena D-galaktoze uzrokuje patološke promjene povezane sa starenjem još nije razjašnjen postoji nekoliko hipoteza. Nakon redukcije D-galaktoze aldosa reduktazom nastaje šećerni alkohol galaktitol koji se zbog slabe difuzije i nemogućnosti daljnjeg metaboliziranja akumulira u stanicama [60, 62]. Akumulacija galaktitola uzrokuje osmotski stres i narušava homeostatske procese stanice što rezultira pojačanim stvaranjem slobodnih radikala i posljedično oksidativnim oštećenjem. Drugi

mehanizam kojim bi galaktoza mogla narušiti staničnu funkciju je ne-enzimatska reakcija s amino skupinama makromolekula uz nastanak naprednih krajnjih produkata glikacije (eng. *advanced glycation end product*; AGE) Maillardovom reakcijom [64].

### 1.6.3 Peroralna primjena D-galaktoze

Suprotno štetnom učinku parenteralne galaktoze, dugotrajna primjena peroralne galaktoze pokazuje zaštitni učinak i sprječava razvoj kognitivnih deficita u štakorskom modelu sAD-a [65, 66]. Mehanizam kojim kronični tretman oralnom galaktozom ostvaruje zaštitni učinak aktivno se istražuje, a trenutno objavljeni rezultati upućuju na nekoliko mogućih objašnjenja. Koncentracija galaktoze u plazmi i cerebrospinalnom likvoru (eng. *cerebrospinal fluid*; CSF) značajno se razlikuje nakon primjene jednake doze peroralno i parenteralno [65, 66]. S obzirom da visoka koncentracija galaktoze može biti štetna za stanice, moguće je da je zaštitni učinak galaktoze dolazi do izražaja isključivo pri niskim koncentracijama koje se postižu nakon peroralne primjene. Pri koncentracijama koje su dovoljno niske da ne oštećuju stanice, galaktoza može ući u stanice inzulin-neovisnim mehanizmom preko GLUT3 i Leloirovim putem ispraviti stanični nedostatak glukoze koji je nastao kao posljedica inzulinske rezistencije u sAD-u, a budući da galaktoza sprječava smanjenje GLUT3 kod životinja tretiranih STZ-icv, moguće je i da je učinak na stanični hipometabolizam posredovan regulacijom transportera za glukozu [65]. Intracelularna galaktoza utječe i na O-glikozilaciju regulatornih proteina koja je promijenjena u AD-u [67]. Galaktoza služi i kao prekursor aminokiselina te njezini pozitivni učinci mogu biti povezani s obnovom aminokiselinskih neurotransmitera i aminokiselina nužnih za održavanje homeostaze metabolizma [68]. Peroralna galaktoza potiče lučenje inkretinskih hormona poput peptida sličnog glukagonu 1 (eng. *glucagon like peptide 1*; GLP-1) i o glukozno ovisnog inzulintropnog polipeptida (eng. *glucose-dependent insulinotropic polypeptide*; GIP) koji imaju neuroprotektivno djelovanje [66]. S obzirom na trenutne obećavajuće rezultate istraživanja koji ukazuju da bi kronični tretman peroralnom galaktozom mogao



ispraviti metabolički deficit povezan s nastankom sAD cilj ovog rada je istražiti akutni učinak peroralne i intraperitonealne galaktoze kako bi dobili bolji uvid u mehanizam djelovanja galaktoze.

## **2 HIPOTEZA**

Učinak akutne administracije galaktoze na strukture moždanog debla ovisan je o načinu primjene i razlikuje se u kontrolnih i STZ-icv životinja.

## **3 OPĆI CILJ I SPECIFIČNI CILJEVI**

### **Opći cilj:**

Opći cilj rada je ispitati učinak akutne peroralne i intraperitonealne administracije galaktoze na moždano deblo kontrolnih i STZ-icv tretiranih životinja.

### **Specifični ciljevi rada:**

- 1) Analizirati koncentraciju galaktoze u plazmi i cerebrospinalnom likvoru nakon peroralne i intraperitonealne administracije galaktoze
- 2) Ispitati utječe li peroralna i intraperitonealna administracija galaktoze na koncentraciju glukoze i inzulina u plazmi i cerebrospinalnom likvoru
- 3) Istražiti promjene moždanog debla povezane s oksidativnim stresom nakon peroralne i intraperitonealne administracije galaktoze
- 4) Analizirati metaboličke promjene u moždanom deblu nakon akutne primjene peroralne i intraperitonealne galaktoze
- 5) Istražiti učinak akutne peroralne i intraperitonealne administracije galaktoze na GLP-1 sustav

## 4 MATERIJALI I METODE

### 4.1 Materijali

#### 4.1.1 Kemikalije

U istraživanju su korišteni streptozotocin, D-galaktoza, koktel inhibitora proteaza, inhibitor fosfataza PhosStop i inhibitor dipeptidil dipeptidaze-4 (Sigma Aldrich, Njemačka), test za kolorimetrijsko mjerenje glukoze Greiner Diagnostic Glucose GOD-PAD-PAP (Dijagnostika, Hrvatska), test za kolorimetrijsko mjerenje galaktoze (Invitrogen, USA), enzimski imunotest (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) za mjerenje inzulina, aktivnog i ukupnog GLP-1 (Merck Millipore, USA). Tijekom istraživanja korištena su i primarna protutijela na GLUT4 (Merck Millipore, SAD), aktin (Sigma Aldrich, Njemačka), antitijelo na fosforiliranu Unc-51-sličnu kinazu (eng. *Unc-51-like kinase 1*, pULK1), fosforilirani protein P70S6 kinazu (pP70S6k), ukupni protein P70S6 kinazu (P70S6k), fosforiliranu kinazu pod kontrolom izvanstaničnih signala (pERK1/2), ukupni protein kinazu pod kontrolom izvanstaničnih signala (ERK1/2), fosforilirani supstrat 1 inzulinskog receptora (pIRS1) (Cell-signaling, SAD), transporter za glukozu 3 (GLUT3), receptor za glukagonu sličan peptid 1 (GLP-1R) (Santa Cruz, SAD). Sekundarna protutijela korištena u istraživanju su mišja i zečja protutijela vezana uz peroksidazu (HRP) (Cell-signaling, SAD) te fluorescentna protutijela AlexaFluor488 i AlexaFluor555 (Invitrogen, SAD). Za dobivanje modela SAD-a korišten je streptozotocin (Sigma-Aldrich, Njemačka).

#### 4.1.2 Životinje

Svi pokusi provedeni su na muškim Wistar štakorima starim 3 mjeseca, tjelesne težine između 250 i 300 g, uzgojenim na Zavodu za Farmakologiju Medicinskog fakulteta

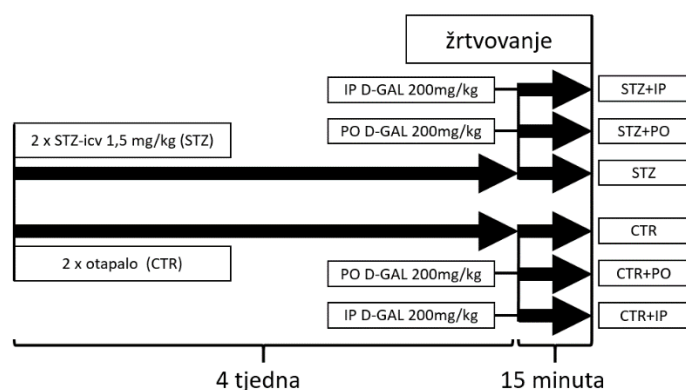
(dozvola br. HR-POK-007). Sva in vivo istraživanja strogo su slijedila smjernice Zakona o zaštiti životinja (NN 135/06), Zakona o izmjenama i dopunama Zakona o zaštiti životinja (NN 37/13) i Pravilnika o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/13). Za obavljanje pokusa na projektu, kojeg je ovaj diplomski rad dio, dobivena je dozvola Ministarstva poljoprivrede (broj UP/I-322-02/15-01/156) i etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Sa životinjama su rukovale isključivo osobe službeno osposobljene za rad sa životinjama.

## **4.2 Metode**

### **4.2.1 Eksperimentalni model sporadične Alzheimerove bolesti**

Štakorski model sporadične Alzheimerove bolesti bazira se na intracerebroventrikularnoj administraciji streptozotocina (STZ-icv). Štakori su anestetizirani ketaminom (60mg/kg) i ksilazinom (5-10mg/kg) i podvrgnuti kratkom kirurškom postupku prvi i treći dan pokusa. Na vrhu glave ošiša se dlaka i napravi rez kože i potkožnog tkiva. Pomoću električne bušilice (NSK Ultimate XL, Hoffman Estates, IL, SAD) napravi se otvor promjera 1mm u parijetalnoj kosti s lijeve i desne strane, na udaljenosti 1,5-2 mm dijagonalno od križanja sagitalnog i koronarnog šava prema ranije opisanom postupku (Noble i sur., 1967). Tanka mikroinjekciona igla uvodi se na dubinu od 4 mm. Nakon što je igla postavljena u lijevu i desnu moždanu komoru polako se daje STZ otopljen u 0,05 M citratnom puferu (pH 4,5) u dozi od 1,5 mg/kg u ukupnom volumenu od 4  $\mu$ L 1. i 3. dan. Kontrolnoj skupini životinja na isti se način u općoj anesteziji administrira samo otapalo.

U ovom istraživanju mjesec dana nakon STZ životinje su tetirane galaktozom (200mg/kg) peroralno pomoću orogastrične sonde ili intraperitonealnom injekcijom. Protokol eksperimenta vizualno je prikazan na slici 2.



**Slika 2. Protokol eksperimenta za evaluaciju subakutnog učinka STZ-icv i akutnog učinka peroralne i intraperitonealne administracije D-galaktoze.** Prvi i treći dan eksperimenta muškim Wistar štakorima intracerebroventrikularno je apliciran STZ (STZ) ili otapalo (CTR). Nakon 4 tjedna svaka je grupa (CTR i STZ) podijeljena u 3 podgrupe od kojih jedna nije dobila nikakav tretman (CTR i STZ), druga je grupa primila 200mg/kg D-galaktoze peroralno putem orogastrične sonde (CTR+PO i STZ+PO), a treća je grupa primila 200mg/kg D-galaktoze intraperitonealno (CTR+IP i STZ+IP). 15 minuta nakon administracije galaktoze životinje su žrtvovane u dubokoj anesteziji, tkivo ekstrahirano i pripremljeno za homogenizaciju (N=6 po grupi ) ili imunohistokemijsku analizu (N=4 po grupi).

#### **4.2.2 Žrtvovanje i uzimanje biološkog materijala**

U svim pokusima životinje su žrtvovane u dubokoj anesteziji (tiopental 60 mg/kg, diazepam 6 mg/kg). Životinje, čije je tkivo predviđeno za western blot analizu i eseje oksidativnog stresa dekapitirane su, nakon čega je tkivo izvađeno, zamrznuto u tekućem dušiku i pohranjeno na -80°C. Preostale životinje u dubokoj su anesteziji podvrgnute transkardijalnoj perfuziji s 4% paraformaldehidom (PFA) otopljenim u fosfatnom puferu (2 g KCl; 11,3 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 90 g NaCl; 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> do 1 L dH<sub>2</sub>O). Nakon što je postignuta dovoljno duboka anestezija, oštrom se škarama napravi rez kroz kožu i mišiće toraksa u medijalnoj aksilarnoj liniji s lijeve i desne strane. Prerežu se dijafragma i lateralni dijelovi rebara, a igla s fiziološkom otopinom (0.9% NaCl) uvede se u lijevu srčanu klijetku. Malim se rezom otvori desna pretklijetka, a fiziološka otopina pusti se kroz iglu za perfuziju. Nakon što koža i sluznice životinje poblijede i fiziološka tekućina počne izlaziti kroz desnu pretklijetku, zaustavlja se tok fiziološke otopine i pušta se PFA. Nakon protoka 250mL PFA tijelo životinje otvrdne. Organi za histološku analizu izvade se i stave u 15% šećer otopljen u 4% puferiranom PFA, nakon čega se prebace u 30% šećer otopljen u fiziološkoj otopini, te nakon što se tkivo prožme s otopinom zamrzne se na -80°C .

#### **4.2.3 Homogeniziranje tkiva**

Za izolaciju proteina, moždano deblo štakora stavili smo u 500 µL otopine pufera za lizu stanica (1 M trisa pH 8,0; 1 M NaCl; 0,005 M EDTA; 1 M DTT; 0,01 M natrij vanadata) i proteaza inhibitora (1:100) na ledu nakon čega je tkivo homogenizirano pomoću sonikatora (Microson Ultrasonic Cell Disruptor XL, Manassas, VA, SAD). Homogenat je centrifugiran 10 minuta na 12 500 g i 4 °C (Biofuge fresco heraeu, Hanau, Njemačka), a dobiveni supernatant alikvotiran u triplikatu i pohranjen na -80 °C do daljnje upotrebe.

#### **4.2.4 Mjerenje koncentracije proteina**

Koncentraciju proteina u uzorcima ukupnog staničnog lizata moždanog debla odredili smo metodom po Lowriju (Lowry i sur., 1951). Pripremili smo uzorak dodavanjem 10  $\mu\text{L}$  ukupnog staničnog lizata u 2 mL reagensa bakrova sulfata (49 mL otopine 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  u 0,1 M NaOH i 1 mL otopine jednake količine 1%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  i 2% NaK tartarata) i ostavili 10 min. Dodali smo 0,2 mL folin reagens (H<sub>2</sub>O i Folin-ciocalteu, 2:1) i uzorke ostavili 30 minuta. Nastalu plavu boju izmjerili smo spektrofotometrijskom analizom pri valnoj duljini od 750 nm (Iskra HPV 220, Slovenija). Koncentraciju proteina izračunali smo na temelju standardne otopine albumina goveđeg seruma koncentracije 15mg/mL. Kao slijepu probu u postupku koristili smo 10  $\mu\text{L}$  0,1 N HCl.

#### **4.2.5. Mjerenju glukoze, galaktoze, inzulina i GLP-1**

Koncentraciju glukoze izmjerili smo kolorimetrijski GOD-POD-PAP metodom [71]. Ukratko, glukoza se otkriva nakon enzimatske oksidacije u prisutstvu glukoza oksidaze. Oksidacijom glukoze nastaje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koji uz pomoć peroksidaze reakcijom s fenolom i 4-aminofenazonom omogućava kolorimetrijsko očitavanje na 500nm. Koncentraciju galaktoze izmjerili smo metodom koja se zasniva na oksidaciji galaktoze pomoću galaktoza oksidaze. Oksidacijom galaktoze nastaje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koji uz pomoć peroksidaze reagira s Amplex Red reagensom uz nastanak resorufina. Koncentraciju galaktoze moguće je izračunati na temelju kolorimetrijske analize koncentracije resorufina koji fluorescira crveno. Koncentraciju inzulina, ukupnog i aktivnog oblika GLP-1 odredili smo komercijalno dostupnim enzimskim imunotestovima (Merck Millipore, SAD) i analizirali kolorimetrijskom analizom pomoću multimodalnog čitača mikropločica Infinite F200 PRO (Tecan, Švicarska) u plazmi i CSF-u. Svi korišteni protokoli strogo su slijedili upute proizvođača testa. Absorbancije inzulina i ukupnog GLP-1 (7-36 i 9-36) izmjerene su na 450 nm s kontrolnim mjerenjem na 590 nm. Koncentracija aktivnog oblika GLP-1 (7-36

amid i 7-37) određena je na fluorescentnom čitaču na ekscitacijsko-emisijskoj valnoj duljini od 355/460 nm.

#### 4.2.6. Western blot analiza

Za analizu promjene fosforilacije pojedinih proteina koristili smo Western blot analizu. Ukratko, proteine smo razdvojili elektroforezom na poliakrilamidnom gelu gdje pod utjecajem napona proteini putuju ovisno o molekularnoj masi. Razdvojeni proteini prenose se na nitrocelulouznu membranu i vizualiziraju obilježavanjem pomoću primarnih i sekundarnih protutijela koja željeni proteini lokalizacijski sprežu s kemiluminiscentnom reakcijom koju je moguće detektirati kamerom. Promjenu fosforilacije proteina moguće je analizirati nakon određivanja omjera fosforiliranog i ukupnog proteina od interesa. Uzorci korišteni u Western blot analizi pripremljeni su uzimanjem jednake količine proteina i pufera za nanošenje na gel (*sample* pufer [2 mL glicerola; 6 mL 10% SDS; 2,5 mL 1 M trisa pH 6,7; 2-4 mg bromfenol plavila] te 10%  $\beta$ -merkaptoetanol). Nakon pripreme uzorke kratko centrifugiramo kako bi svi bili denaturirani u jednakim uvjetima te kuhamo 10 min na 100 °C. U isto vrijeme pripremamo 9%-tni SDS-poliakrilamidni gel za razdvajanje (4,3 mL H<sub>2</sub>O; 2,5 mL trisa pH 8,8; 3 mL 30% akrilamid/bisakrilamida; 100  $\mu$ L 10% APS-a [amonij persulfat] i 6,6  $\mu$ L temeda), te SDS-polikrilamidni gel za sabijanje (3,05 mL H<sub>2</sub>O; 1,25 mL trisa pH 6,8; 0,65 mL 30% akrilamid/bisakrilamida; 40  $\mu$ L 10% APS-a i 5  $\mu$ L temeda). Uzorke centrifugiramo 60 sekundi na 13 000g (Mikro 120, Hettich, Njemačka) kako bi bili maksimalno koncentrirani na dnu tubice nakon čega se nanose na gel u koncentraciji od 35  $\mu$ g. U prvu jažicu stavljamo 2  $\mu$ L proteinskog markera koji služi kao standard molekularnih težina pomoću kojeg ćemo za vrijeme analize moći odrediti molekularnu težinu proteina od interesa. Gelovi se stavljaju u pufer za elektroforezu (10 g SDS-a u 100 mL H<sub>2</sub>O; 30 g trisa i 115,2 g glicina otopljenih u 1 L H<sub>2</sub>O) te se postavke uređaja prilagođavaju ovisno o molekularnoj težini proteina od interesa. U našim analizama koristili smo postavke 150 V i 400 mA tijekom 60 minuta (Bio-Rad PowerPac



Basic, Hercules, CA, SAD). Nakon razdvajanja, proteine smo transferirali na nitroceluloznu membranu pomoću postupka mokrog transfera tijekom 60 min na 100 V i 400 mA u puferu za mokri proteinski transfer sastava: 105 g glicina i 22,32 g trisa otopljenih u 1 L H<sub>2</sub>O. Nakon završenog transfera provjerili smo uspješnost elektroforeze i transfera pomoću reverzibilnog bojanja otopinom Ponceau (0,1% Ponceau S otopina pripravljena u 5%-tnoj octenoj kiselini) te membrane isprali u puferu za ispiranje s niskom koncentracijom soli (eng. *Low-salt washing buffer*, LSWB) puferu (pH 7,5; 1,211 g trisa i 8,766 g NaCl u 1 L H<sub>2</sub>O). Proces blokiranja membrane kojim se sprječava nespecifično vezanje primarnog i sekundarnog protutijela za membranu izveden je inkubacijom membrane u otopini za blokiranje (1 g nemasnog mlijeka u prahu; 20 mL pufera; 100 µL Tween-a) tijekom 1 sata na sobnoj temperaturi. Nakon blokiranja membrane su inkubirane preko noći na 4 °C s protutijelima otopljenima u otopini za blokiranje (razrjeđenja P70S6K, pP70S6K, ULK1, pULK1, ERK1/2, pERK - 1:1000). Idući dan, membrane su tri puta isprane u LSWB puferu i inkubirane 1 sat na sobnoj temperaturi s odgovarajućim sekundarnim protutijelom (anti-mouse 1:2000, anti-rabbit 1:2000) razrijeđenim u otopini za blokiranje. Isprali smo membrane i inkubirali u kemiluminiscentnoj otopini pripravljenoj miješanjem jednakih volumena otopine vodikovog peroksida i luminola (Super Signal West Femto). Proteine smo prikazali i slikali kamerom (DNR Bio-Imaging Systems MicroChem, Jerusalem, Israel). Nakon uspješnog prikazivanja proteina od interesa membrana je inkubirana s protutijelom na β-aktin (1:3000) na 4 °C tijekom 24 sata. Za analizu aktina korišten je isti postupak kao i za primarni protein od interesa. Analizu aktina koristili smo kao kontrolu postupka te su intenziteti proteina izraženi u omjeru prema signalu aktina u istom uzorku na odgovarajućoj membrani. Rezultati promjene fosforilacije izraženi su kao omjer omjera fosforiliranog proteina i odgovarajućeg aktina i ukupnog proteina i odgovarajućeg aktina. Rezultati su prikazani u obliku srednje vrijednosti ± standardna pogreška.

#### **4.2.7. Imunofluorescentno bojenje**

Nakon perfuzije životinja 4% paraformaldehidom (pH 7.4), mozgovi životinja odstranjeni su i krioprezervirani serijskim otopinama saharoze (15 i 30%) te pohranjeni na - 80°C do daljnjeg rukovanja. Moždano deblo odvojeno je od velikog i malog mozga na -25°C nakon čega je tkivo učvršćeno TissueTek otopinom, narezano na kriostatu (Leica SM 2010R, Wetzlar, Njemačka) između područja Bregma -14.04mm i Bregma -14.16mm na prezeze debljine 35 µm te pohranjeno u PBS pH 7.4. Nakon 3 ispiranja otopinom PBS tkivo je blokirano u 10% otopini seruma magarca (eng. *normal donkey serum*; NDS) u PBST-u (0.25% Triton X-100 u PBS-u) 1 sat. Nakon blokiranja prerezi su inkubirani s odgovarajućim koncentracijama primarnog protutijela u 1% NDS PBST puferu na 4°C tijekom 24 sata (razrjeđenja c-fos 1:1000; IR 1:500; pULK1 1:500; GFAP 1:600; pIRS1 1:500; GLUT3 1:500; GLUT4 1:500). Idući dan prerezi su isprani 3 puta u PBS-u i inkubirani s odgovarajućim sekundarnim fluorescentnim protutijelima 2 sata na sobnoj temperaturi u mraku (AlexaFluor488 1:600; AlexaFluor555 1:600). Nakon ispiranja 3 puta u PBS-u prerezi su postavljeni na predmetna stakalca u destiliranoj vodi i ostavljeni da se osuše. Nakon sušenja na svako je predmetno stakalce dodana Fluoroshield otopina i pokrovno stakalce nakon čega su preparati pohranjeni u mraku na 4°C do daljnjeg korištenja. Za vizualizaciju preparata korišteni su Olympus BX51 mikroskop i CellSense Dimension software.

#### **4.2.8. Mjerenje antioksidativnog kapaciteta i oksidativnog stresa**

U svim kolorimetrijskim mjerenjima korišteni su spektrofotometar CamSpec M350 Double Beam UV-Visible Spectrophotometer i standardne kivete od 1cm.

#### 4.2.8.1. Mjerenje aktivnosti katalaze

Aktivnost katalaze mjerena je spektrofotometrijskom metodom po Aebiju [72] (Prabhakar i sur., 2012) uz neke modifikacije. Ukratko, za svaki uzorak pripremljeno je 2mL 0.1M kalijevog fosfatnog pufera (eng. *potassium phosphate buffer*, KPB) pH 7.4. Netom prije mjerenja u kivetu s KPB-om dodano je 424  $\mu\text{L}$  30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Izmjerena je početna apsorbancija nakon koje je u kivetu dodano 10  $\mu\text{L}$  tkivnog homogenata. Promjena apsorbancije na 240 nm praćena je u trajanju od 60 sekundi. Za izračune korišten je ekstinkcijski koeficijent  $43,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Dobiveni rezultati izraženi su kao M  $\text{H}_2\text{O}_2$  razgrađenog po minuti po mililitru po miligramu proteina ( $\text{M H}_2\text{O}_2/\text{min/mL/mg}$ ), a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška (eng. *standard error of the mean*; SEM).

#### 4.2.8.2. Mjerenje ukupne količine reduciranog glutationa

Esej za mjerenje količine reduciranog glutationa zasniva se na reakciji reduciranog glutationa i 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoat)-a (DTNB) u kojoj nastaju oksidirani glutation i 5-tio-2-nitrobenzoat (TNB) kojeg možemo izmjeriti kolorimetrijski. Za mjerenje koristili smo metodu opisanu u članku Prabhakar i suradnika 2012. godine uz neke modifikacije [73]. Ukratko, alikvot od 100  $\mu\text{L}$  tkivnog homogenata inkubiran je u 100  $\mu\text{L}$  4% sulfosalicilata na ledu kroz 1 sat i centrifugiran na 10 000 okretaja 10 minuta. 150  $\mu\text{L}$  supernatanta pomješano je s istim volumenom otopine DTNB (4mg/mL pripremljene u 5% otopini natrijevog citrata) i 1,2 mL 0.1M KPB pH 7.4. Spektrofotometrijska analiza provedena je na 412 nm. Rezultati su izraženi kao nM TNB po miligramu proteina i prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM.

#### 4.2.8.3. Mjerenje lipidne peroksidacije

Količina malondialdehida (MDA), konačnog produkta lipidne peroksidacije izmjerena je metodom opisanom u članku Prabhakar i suradnika uz neke modifikacije (Prabhakar i sur.,

2012). 180  $\mu\text{L}$  alikvota tkivnog homogenata pomiješano je s 2mL 0.375% tiobarbituratne kiseline u 15% otopini trikloracetata. U svaki uzorak dodano je 820  $\mu\text{L}$  destilirane vode nakon čega su na 20 minuta ostavljeni u vodenoj kupelji na 95°C. Uzorci su ohlađeni pod tekućom vodom nakon čega je kompleks TBA-MDA ekstrahiran miješanjem tijekom 30 minuta dodavanjem 2mL n-butanola. Uzorci su centrifugirani na 5000 okretaja tijekom 10 minuta i apsorbancija kompleksa analizirana je u izdvojenoj frakciji n-butanola na 532 nm. Količina MDA izračunata je korištenjem molarnog ekstinkcijskog koeficijenta od  $1.56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Rezultati su izraženi kao nM MDA po miligramu proteina i prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM.

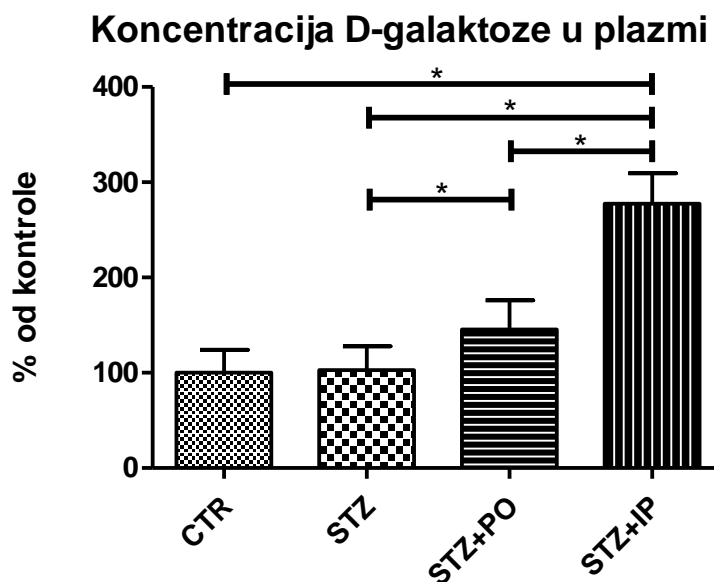
#### **4.2.9. Statistička analiza**

Statistička analiza provedena je Kruskal-Wallis ANOVA median testom za istovremenu usporedbu više od dvije grupe te Mann-Whitney U-testom za usporedbu dvije grupe, uz odabranu razinu značajnosti \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . Za analizu je korišten program GraphPad Prism 5.

## 5. REZULTATI

### 5.1 Koncentracija galaktoze u plazmi i cerebrospinalnom likvoru

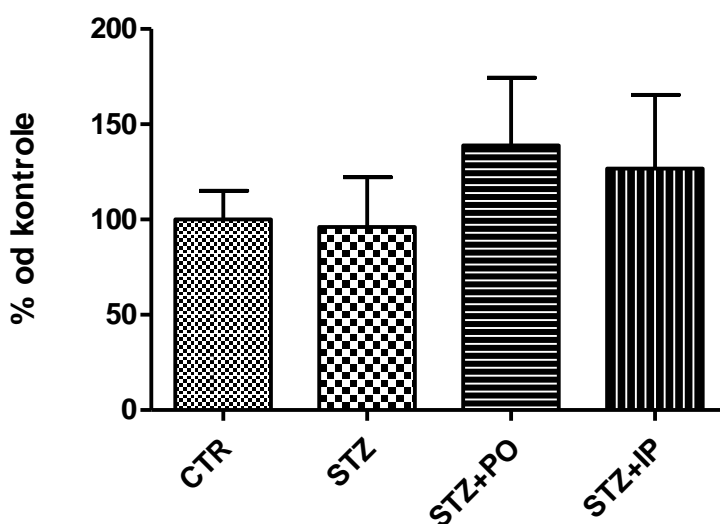
U usporedbi s kontrolnim životinjama ne postoje značajne razlike u koncentraciji bazalne galaktoze u STZ-icv tretiranih životinja (slika 3. i 4.). Peroralna i intraperitonealna primjena galaktoze očekivano povećava koncentraciju galaktoze u plazmi i CSF-u STZ-icv životinja. Nakon peroralne primjene galaktoze (200mg/kg) koncentracija galaktoze u plazmi značajno se povećala za +110,73% ( $p < 0.05$ ), dok u CSF za +38,87% ali bez statističke značajnosti u odnosu na kontrolu (slika 3. i 4.). Intraperitonealna primjena galaktoze povisila je koncentraciju galaktoze u plazmi (+208,46%) u odnosu na kontrolu, dok manje povećanje koncentracije u CSF-u (+26,76%) nije bilo značajno (slika 3. i 4.).



**Slika 3. Koncentracija galaktoze u plazmi 15 minuta nakon peroralne i intraperitonealne primjene galaktoze u štakora intracerebroventrikularno tretiranih streptozotocinom. Životinje su žrtvovane 1 mjesec nakon intracerebroventrikularne**

primjene streptozotocina (STZ; 3mg/kg) ili otapala (CTR). Dvije grupe životinja tretiranih sa STZ-om žrtvovane su 15 minuta nakon peroralne (STZ+PO) ili intraperitonealne (STZ+IP) primjene D-galaktoze (200 mg/kg). Koncentracija D-galaktoze u plazmi mjerena je u svim skupinama i uspoređena s kontrolom. Rezultati su prikazani kao postotna vrijednost u odnosu na kontrolnu skupinu  $\pm$  SEM. Podaci su analizirani neparametrijskim Kruskal-Walis i Mann Whitney U testovima. \* $p < 0,05$ .

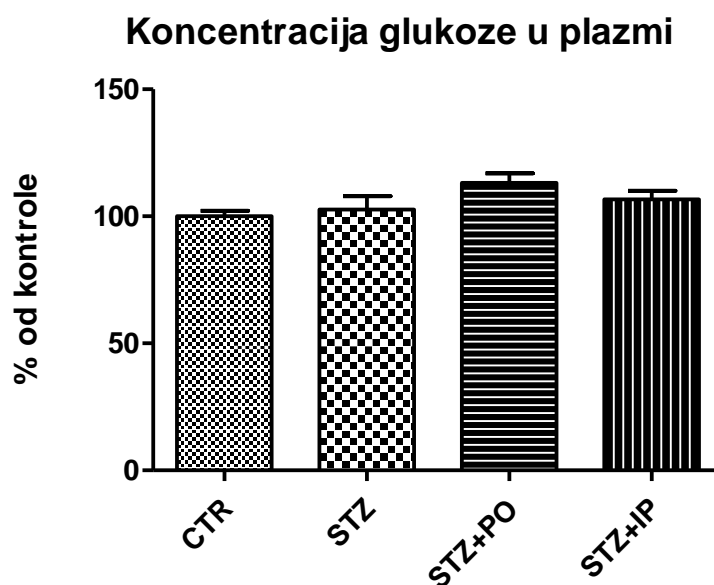
#### Koncentracija D-galaktoze u cerebrospinalnom likvoru



**Slika 4. Koncentracija galaktoze u cerebrospinalnom likvoru 15 minuta nakon peroralne i intraperitonealne primjene galaktoze u štakora tretiranih intracerebroventrikularno streptozotocinom.** Životinje su žrtvovane 1 mjesec nakon intracerebroventrikularne primjene streptozotocina (STZ; 3 mg/kg) ili otapala (CTR). Dvije grupe životinja tretiranih sa STZ-om su žrtvovane 15 minuta nakon peroralne (STZ+PO) ili intraperitonealne (STZ+IP) primjene D-galaktoze (200 mg/kg). Koncentracija D-galaktoze u cerebrospinalnom likvoru mjerena je u svim skupinama i uspoređena s kontrolom. Rezultati su prikazani kao postotna vrijednost u odnosu na kontrolnu skupinu  $\pm$  SEM. Podaci su analizirani neparametrijskim Kruskal-Walis i Mann Whitney U testovima. \* $p < 0,05$ .

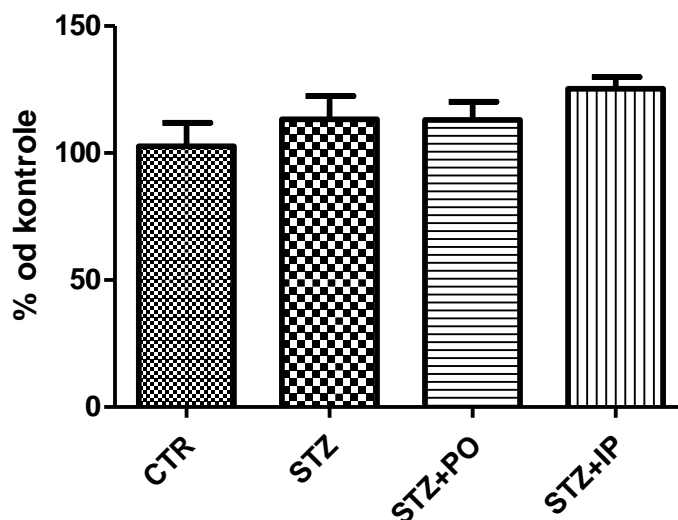
## 5.2 Koncentracija glukoze u plazmi i cerebrospinalnom likvoru

Kako bi utvrdili da ne dolazi do promjena koncentracije glukoze nakon primjene galaktoze izmjerene su vrijednosti glukoze u plazmi i CSF-u. U odnosu na kontrolu nije bilo značajnih razlika između skupina, bez obzira na tretman (peroralna ili intraperitonealna galaktoza) (slika 5. i 6.).



**Slika 5. Koncentracija glukoze u plazmi mjerena 15 minuta nakon peroralne i intraperitonealne primjene galaktoze u štakora tretiranih intracerebroventrikularno streptozotocinom.** Životinje su žrtvovane 1 mjesec nakon intracerebroventrikularne primjene streptozotocina (STZ; 3 mg/kg) ili otapala (CTR). Dvije grupe životinja tretiranih sa STZ-om su žrtvovane 15 minuta nakon peroralne (STZ+PO) ili intraperitonealne (STZ+IP) primjene D-galaktoze (200 mg/kg). Koncentracija glukoze u plazmi mjerena je u svim skupinama i uspoređena s kontrolom. Rezultati su prikazani kao postotna vrijednost u odnosu na kontrolnu skupinu  $\pm$  SEM. Podaci su analizirani neparametrijskim Kruskal-Walis i Mann Whitney U testovima. \* $p < 0,05$ .

## Koncentracija glukoze u cerebrospinalnom likvoru



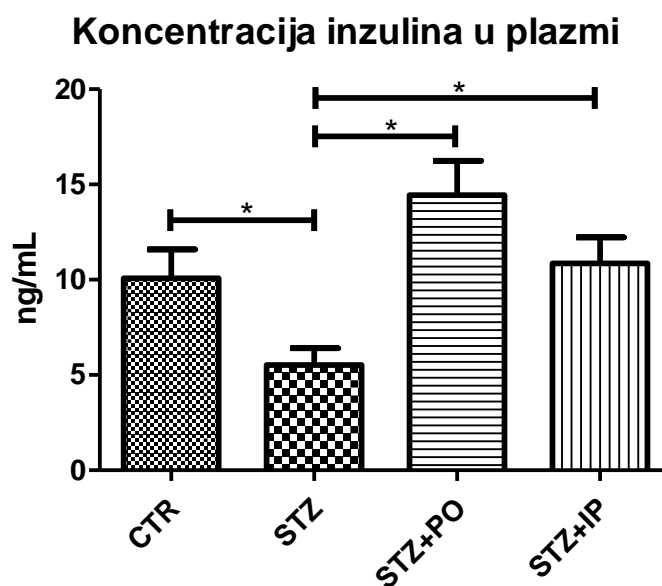
**Slika 6. Koncentracija glukoze u cerebrospinalnom likvoru mjerena 15 minuta nakon peroralne i intraperitonealne primjene galaktoze u štakora tretiranih intracerebroventrikularno streptozotocinom.** Životinje su žrtvovane 1 mjesec nakon intracerebroventrikularne primjene streptozotocina (STZ; 3 mg/kg) ili otapala (CTR). Dvije grupe životinja tretiranih sa STZ-om su žrtvovane 15 minuta nakon peroralne (STZ+PO) ili intraperitonealne (STZ+IP) primjene D-galaktoze (200 mg/kg). Koncentracija glukoze u cerebrospinalnom likvoru mjerena je u svim skupinama i uspoređena s kontrolom. Rezultati su prikazani kao postotna vrijednost u odnosu na kontrolnu skupinu  $\pm$  SEM. Podaci su analizirani neparametrijskim Kruskal-Walis i Mann Whitney U testovima. \* $p < 0,05$ .

### 5.3 Koncentracija inzulina u plazmi i cerebrospinalnom likvoru

Smanjena koncentracija inzulina u plazmi mjerena 1 mjesec nakon STZ-icv primjene (-45,2%,  $p < 0,05$ ) je normalizirana do razine koncentracije inzulina kontrolnih životinja nakon peroralne (+161%, u usporedbi sa STZ skupinom) i intraperitonealne (+96,5%, u usporedbi sa STZ skupinom) primjene jedne doze galaktoze (200 mg/kg) (Slika 7). Nije

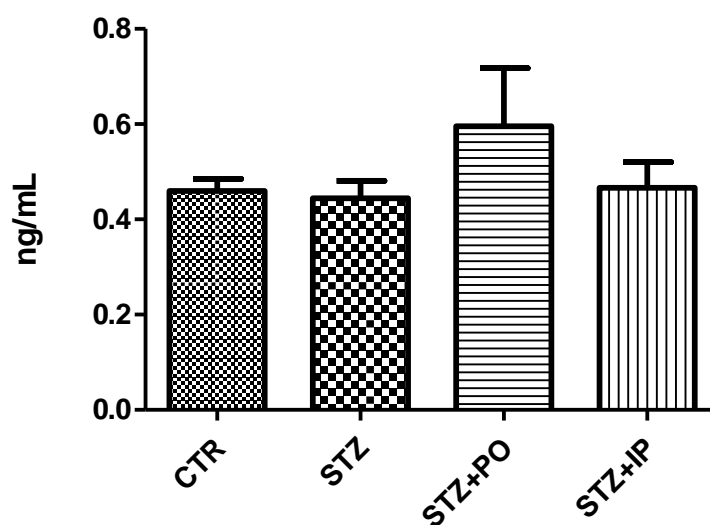


bilo značajnih razlika u koncentraciji inzulina u CSF-u nakon primjene jedne doze galaktoze (Slika 8).



**Slika 7. Koncentracija inzulina u plazmi mjerena 15 minuta nakon peroralne i intraperitonealne primjene galaktoze u štakora tretiranih intracerebroventrikularno streptozotocinom.** Životinje su žrtvovane 1 mjesec nakon intracerebroventrikularne primjene streptozotocina (STZ; 3 mg/kg) ili otapala (CTR). Dvije grupe životinja tretiranih sa STZ-om su žrtvovane 15 minuta nakon peroralne (STZ+PO) ili intraperitonealne (STZ+IP) primjene D-galaktoze (200 mg/kg). Koncentracija inzulina u plazmi mjerena je u svim skupinama i uspoređena s kontrolom. Rezultati su prikazani kao postotna vrijednost u odnosu na kontrolnu skupinu  $\pm$  SEM. Podaci su analizirani neparametrijskim Kruskal-Walis i Mann Whitney U testovima. \* $p < 0,05$ .

## Koncentracija inzulina u cerebrospinalnom likvoru

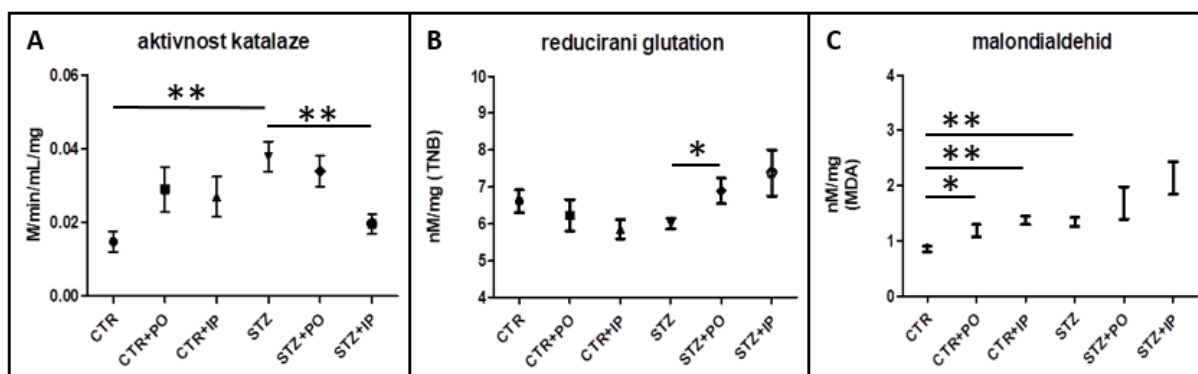


**Slika 8. Koncentracija inzulina u cerebrospinalnom likvoru mjerena 15 minuta nakon peroralne i intraperitonealne primjene galaktoze u štakora tretiranih intracerebroventrikularno streptozotocinom.** Životinje su žrtvovane 1 mjesec nakon intracerebroventrikularne primjene streptozotocina (STZ; 3 mg/kg) ili otapala (CTR). Dvije grupe životinja tretiranih sa STZ-om su žrtvovane 15 minuta nakon peroralne (STZ+PO) ili intraperitonealne (STZ+IP) primjene D-galaktoze (200 mg/kg). Koncentracija inzulina u cerebrospinalnom likvoru mjerena je u svim skupinama i uspoređena s kontrolom. Rezultati su prikazani kao postotna vrijednost u odnosu na kontrolnu skupinu  $\pm$  SEM. Podaci su analizirani neparametrijskim Kruskal-Walis i Mann Whitney U testovima. \* $p < 0,05$ .

### 5.4. Oksidativni stres u moždanom deblu

Kod kontrolnih životinja aktivnost katalaze povećana je nakon peroralne (+95%) i intraperitonealne (+82%) primjene D-galaktoze u odnosu na kontrolu (Slika 9.A). Mjesec dana nakon administracije STZ-icv aktivnost katalaze značajno je povećana u usporedbi s kontrolnim životinjama +154% ( $p < 0,05$ ). Zanimljivo, kod STZ-icv životinja primjena galaktoze smanjuje aktivnost katalaze, pri čemu intraperitonealna primjena (-48%,  $p < 0,01$ ) ima veći učinak od peroralne (-11%) (Slika 9.A). Rezultati analize količine

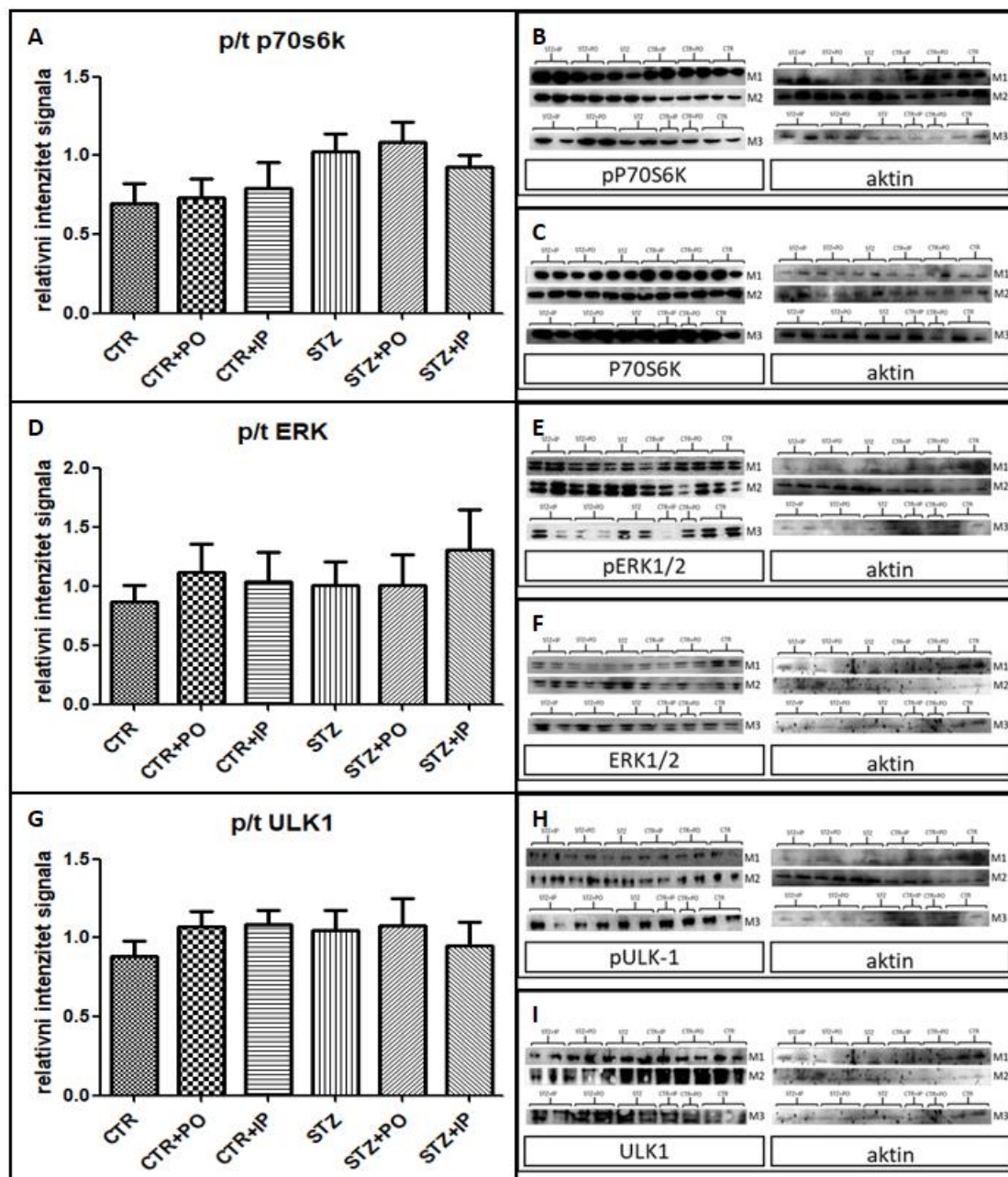
reduciranog glutationa odgovaraju rezultatima dobivenim mjerenjem aktivnosti katalaze. Kod kontrolnih životinja primjena galaktoze smanjuje, a kod STZ-icv tretiranih povećava količinu reduciranog glutationa (Slika 9. **B**). Analiza lipidne peroksidacije govori u prilog povećanja peroksidacije kod primjene galaktoze i kod kontrolnih i kod STZ-icv životinja (Slika 9.**C**). Kod kontrolnih životinja koncentracija MDA povećana je nakon peroralne (+38%,  $p<0,05$ ) i nakon intraperitonealne (+61%,  $p<0,01$ ) administracije galaktoze. U usporedbi s kontrolni životinjama koncentracija MDA povećana je mjesec dana nakon administracije STZ-icv (+57%,  $p<0,01$ ). U STZ-icv životinja peroralna (+25%) i intraperitonealna (+59%) administracija galaktoze povećavaju koncentraciju MDA, ali bez statističke značajnosti u odnosu na STZ-icv.



**Slika 9. Parametri oksidativnog stresa i antioksidativnog kapaciteta mjereni 15 minuta nakon peroralne i intraperitonealne primjene galaktoze u moždanom deblu kontrolnih štakora i štakora tretiranih intracerebroventrikularno streptozotocinom.** Životinje su žrtvovane 15 minuta nakon peroralne (CTR+PO; STZ+PO) i intraperitonealne (CTR+IP; STZ+IP) primjene galaktoze (200 mg/kg) 1 mjesec nakon intracerebroventrikularne administracije streptozotocina (STZ; 3 mg/kg) ili otapala (CTR). Parametri oksidativnog stresa (aktivnost katalaze/A, koncentracije reduciranog glutationa/B i malondialdehida/C) mjereni su u moždanom deblu štakora. Svaka točka predstavlja srednju vrijednost  $\pm$  SEM pojedine skupine. Podaci su analizirani neparametrijskim Kruskal-Wallis i Mann-Whitney U testovima. \* $p<0,05$  ; \*\* $p<0,01$

## 5.5 Metaboličke promjene u moždanom deblu

Western blot analiza ukupne promjene fosforilacije metaboličkih regulatornih proteina u lizatu cijelog moždanog debla kontrolnih i STZ-icv štakora nije pokazala statistički značajne promjene (slika 10.).



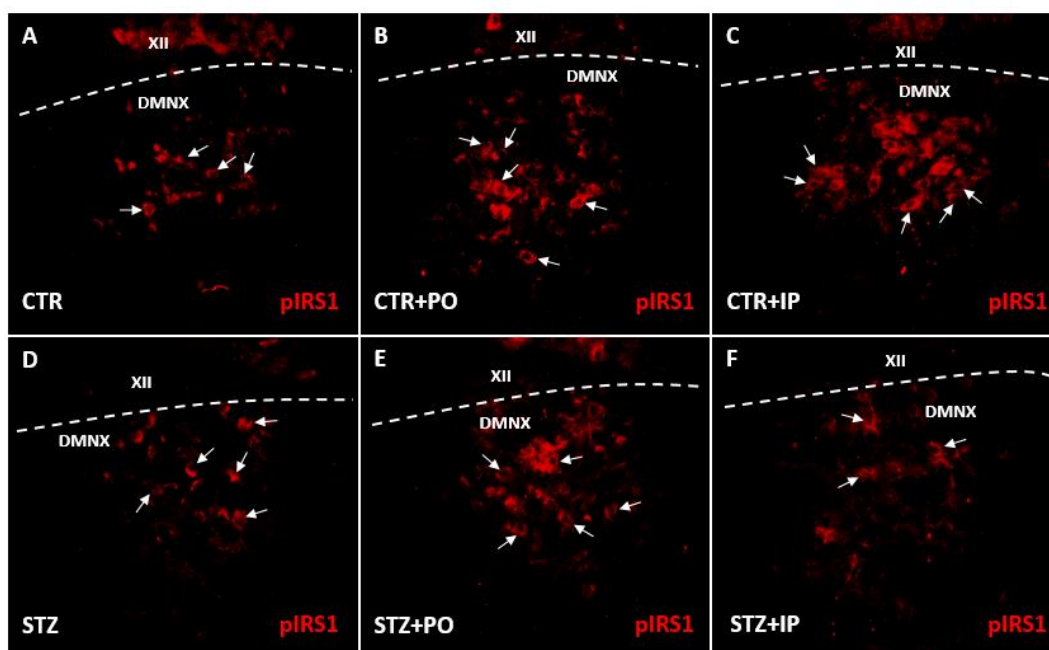
Slika 10. Ekspresija P70S6 kinaze, kinaze pod kontrolom izvanstaničnih signala i Unc-51-slične kinaze u moždanom deblu 15 minuta nakon peroralne i intraperitonealne primjene galaktoze u kontrolnih štakora i štakora tretiranih intracerebroventrikularno streptozotocinom. Životinje su žrtvovane 15 minuta nakon

peroralne (CTR+PO; STZ+PO) i intraperitonealne (CTR+IP; STZ+IP) primjene galaktoze (200 mg/kg) 1 mjesec nakon intracerebroventrikularne administracije streptozotocina (STZ; 3mg/kg) ili otapala (CTR). Proteinska ekspresija fosforilirane i totalne P70S6 kinaze (pP70S6K, P70S6K / **A**), kinaze pod kontrolom izvanstaničnih signala (pERK, ERK / **D**) i Unc-51-slične kinaze (pULK1, ULK / **G**) mjerena je Western blot analizom. Beta-aktin je korišten kao kontrola za nanošenje uzoraka. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti omjera fosforiliranog proteina/aktin i totalnog proteina/aktin  $\pm$  SEM pojedine skupine. Podaci su analizirani neparametrijskim Kruskal-Wallis i Mann-Whitney U testovima.

## 5.6 Metabolički signalizacijski putevi u DMNX

### 5.6.1 Ekspresija fosforiliranog supstrata inzulinskog receptora 1 u DMNX

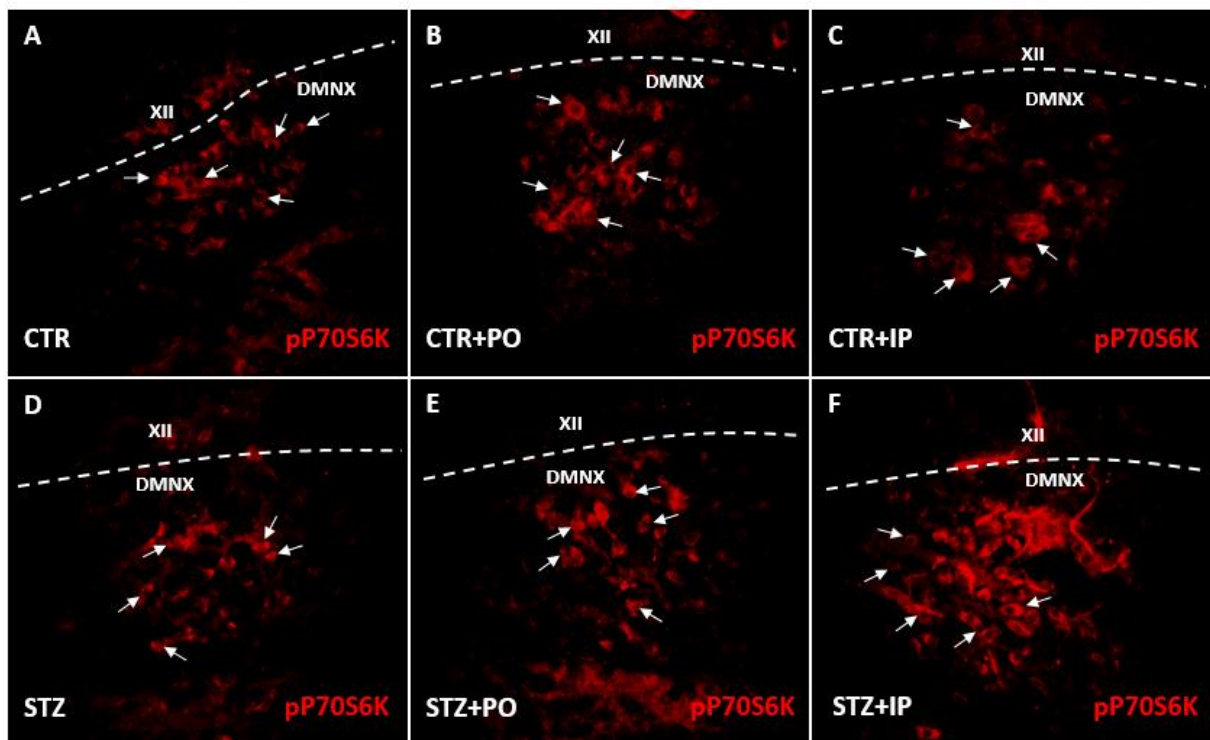
Imunofluorescencijska analiza fosforiliranog IRS1 u stanicama DMNX ne pokazuje očite razlike između kontrolnih (slika 11.**A**) i STZ-icv životinja (slika 11.**D**) bez administracije galaktoze. Peroralna administracija galaktoze povećava pIRS1 signal u DMNX u kontrolnih (slika 11.**B**) i STZ-icv životinja (slika 11.**E**), a intraperitonealna administracija galaktoze pojačava pIRS1 signal samo u kontrolnih životinja (slika 11.**C**).



**Slika 11. Učinak akutne oralne i intraperitonealne galaktoze na ekspresiju fosforiliranog supstrata inzulinskog receptora u dorzalnoj motornoj jezgri vagusa.** Životinje su žrtvovane 15 minuta nakon peroralne (CTR+PO/B; STZ+PO/E) i intraperitonealne (CTR+IP/C; STZ+IP/F) primjene galaktoze (200 mg/kg) 1 mjesec nakon intracerebroventrikularne administracije streptozotocina (STZ/D; 3mg/kg) ili otapala (CTR/A). Ekspresija fosforiliranog supstrata inzulinskog receptora (pIRS1) vidljiva je kao crveno obojenje (označeno strelicama) (A - F). Povećanje 20X (A – F). XII – jezgra hypoglossusa; DMNX – dorzalna motorna jezgra vagusa

### **5.6.2. Aktivnost mTOR sustava u DMNX**

Aktivnost sustava mete rapamicina u sisavaca (eng. mammalian target of rapamycin; mTOR) u stanicama DMNX istražena je pomoću analize fosforilacije P70S6K kinaze. Imunofluorescencijska analiza pP70S6 kinaze pokazuje da akutna peroralna administracija galaktoze povećava fosforilaciju u DMNX u kontrolnih (Slika 12.**B**) i u STZ-icv tretiranih životinja (Slika 12.**E**), no intraperitonealna administracija povećava fosforilaciju samo u STZ-icv životinja (Slika 12.**F**) dok kod kontrolnih dovodi do smanjene fosforilacije p70S6 kinaze (Slika 12.**C**).



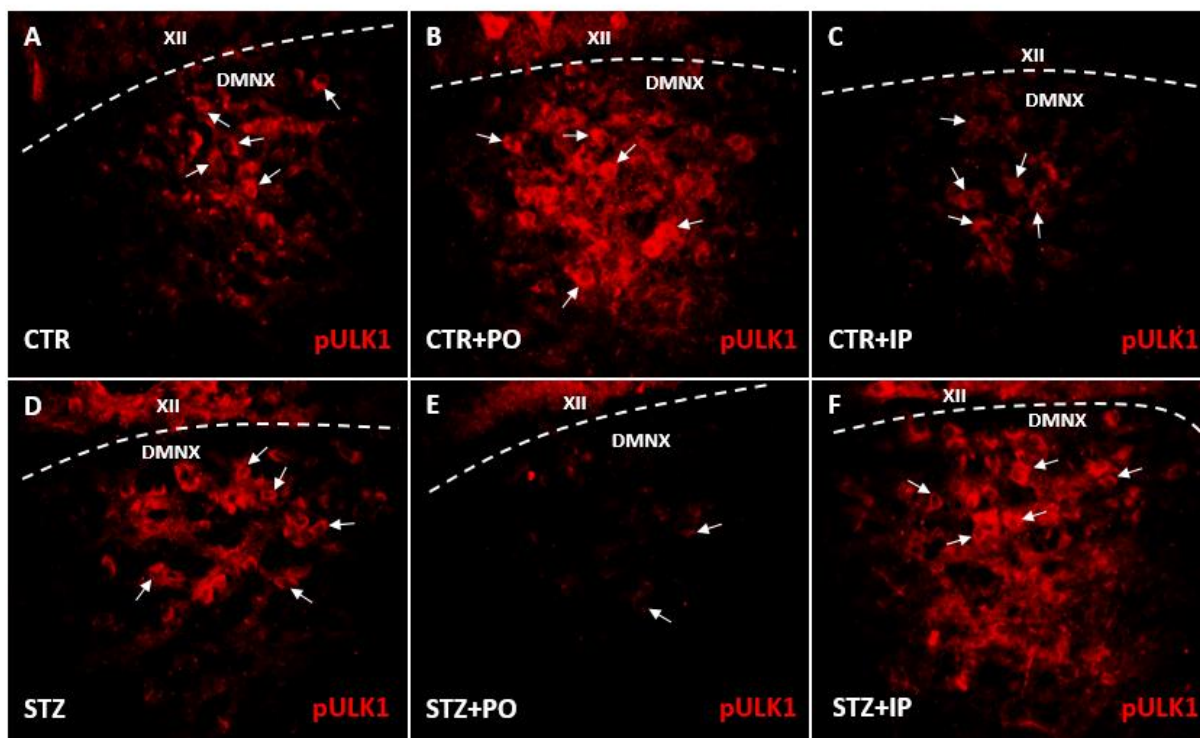
**Slika 12. Učinak akutne oralne i intraperitonealne galaktoze na ekspresiju fosforilirane p70S6 kinaze u dorzalnoj motornoj jezgri vagusa.** Životinje su žrtvovane 15 minuta nakon peroralne (CTR+PO/B; STZ+PO/E) i intraperitonealne (CTR+IP/C; STZ+IP/F) primjene galaktoze (200 mg/kg) 1 mjesec nakon intracerebroventrikularne administracije streptozotocina (STZ/D; 3mg/kg) ili otapala (CTR/A). Ekspresija fosforilirane P70S6 kinaze (pP70S6K) vidljiva je kao crveno obojenje (označeno strelicama) (A - F). Povećanje 20X (A – F). XII – jezgra hypoglossusa; DMNX – dorzalna motorna jezgra vagusa.

### 5.6.3. Aktivnost autofagije u DMNX

Aktivnost autofagije u stanicama DMNX istražena je pomoću analize ekspresije fosforilanog ULK1 na serinu 757. Fosforilacija ULK1 na serinu 757 povezana je s inhibicijom autofagije. Rezultati pokazuju da kod kontrolnih životinja akutna peroralna administracija povećava (slika 13.B), a akutna intraperitonealna administracija D-



galaktoze smanjuje (Slika 13.C) fosforilaciju ULK1 u stanicama DMNX. Čini se da je učinak D-galaktoze obrnut kod STZ-icv tretiranih životinja kod kojih akutna peroralna administracija smanjuje fosforilaciju ULK1 (Slika 13.E), dok intraperitonealna administracija dovodi do povećanja fosforilacije (Slika 13.F).

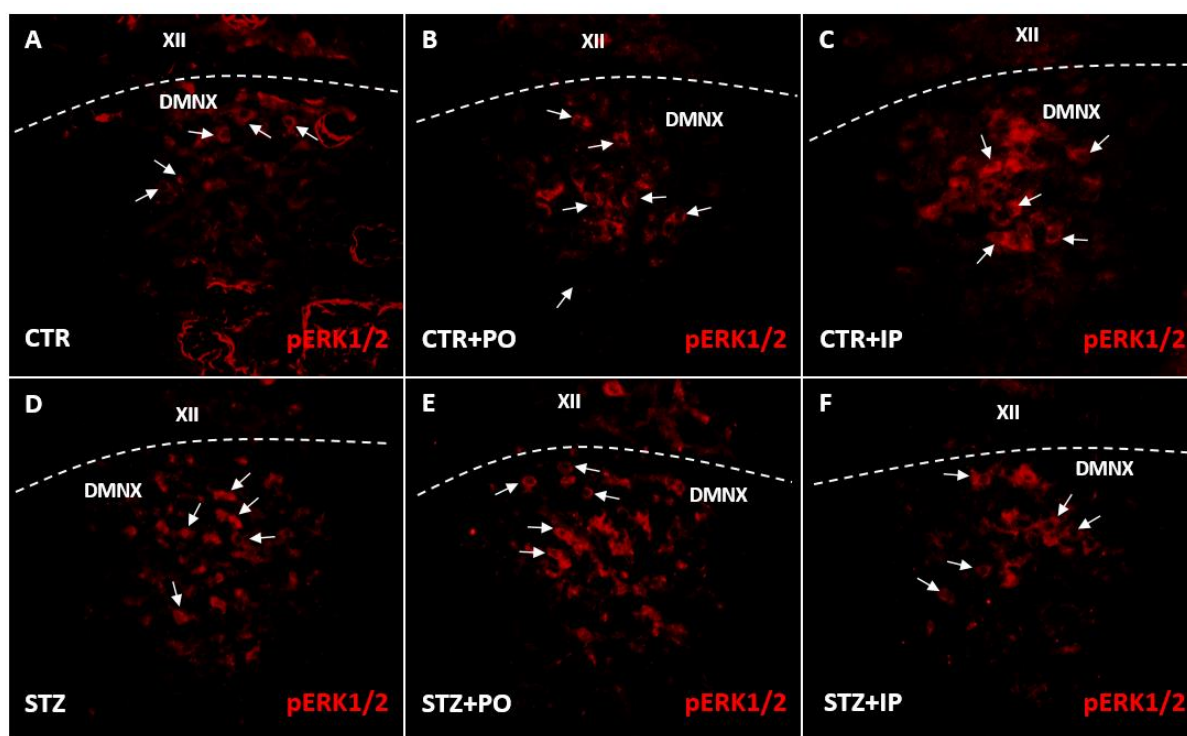


**Slika 13. Učinak akutne oralne i intraperitonealne galaktoze na ekspresiju fosforilirane Unc-51 slične kinaze 1 u dorzalnoj motornoj jezgri vagusa.** Životinje su žrtvovane 15 minuta nakon peroralne (CTR+PO/B; STZ+PO/E) i intraperitonealne (CTR+IP/C; STZ+IP/F) primjene galaktoze (200 mg/kg) 1 mjesec nakon intracerebroventrikularne administracije streptozotocina (STZ/D; 3mg/kg) ili otapala (CTR/A). Ekspresija fosforilirane Unc-51 slične kinaze 1 (pULK1) vidljiva je kao crveno obojenje (označeno strelicama) (A - F). Povećanje 20X (A – F). XII – jezgra hypoglossusa; DMNX – dorzalna motorna jezgra vagusa.



#### 5.6.4. Ekspresija fosforilirane kinaze pod kontrolom izvanstaničnih signala u moždanom deblu

Imunofluorescencijska analiza fosforilacije ERK1/2 pokazuje da akutna peroralna administracija galaktoze ne povećava fosforilaciju u DMNX u kontrolnih životinja (Slika 14.B) Akutna intraperitonealna administracija galaktoze kontrolnim životinjama povećava fosforilaciju ERK1/2 u DMNX (slika 14.C). U DMNX STZ-icv životinja fosforilacija je neznatno povećana (slika 14.D) u usporedbi s kontrolom, a peroralna administracija galaktoze dodatno pojačava intenzitet signala fosforiliranog ERK1/2 (slika 14.E). Intraperitonealna administracija galaktoze ne uzrokuje očito povećanje signala (slika 14.F).

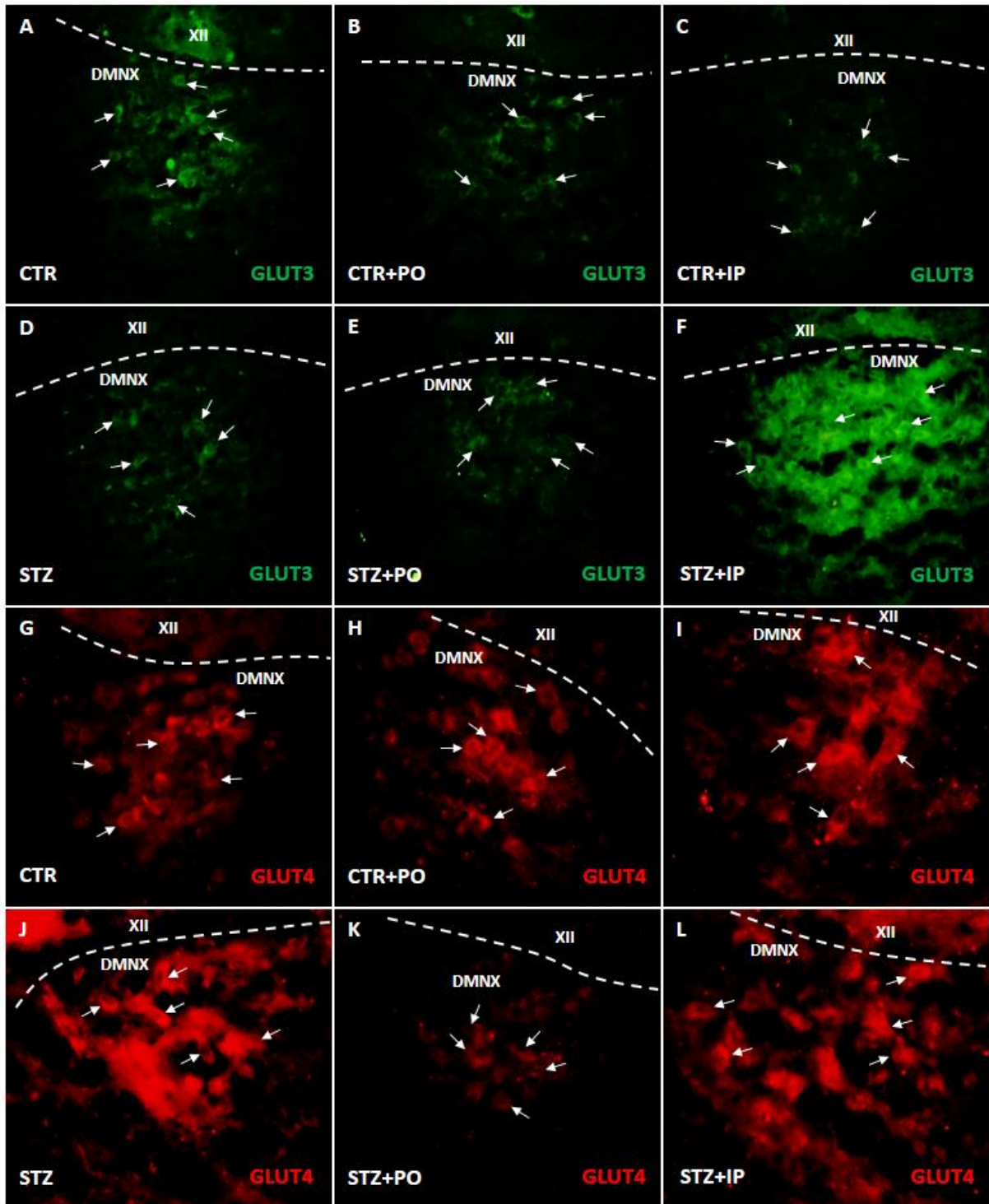


Slika 14. Učinak akutne oralne i intraperitonealne galaktoze na ekspresiju fosforilirane kinaze pod kontrolom izvanstaničnih signala u dorzalnoj motornoj jezgri vagusa. Životinje su žrtvovane 15 minuta nakon peroralne (CTR+PO/B; STZ+PO/E) i intraperitonealne (CTR+IP/C; STZ+IP/F) primjene galaktoze (200 mg/kg) 1 mjesec nakon intracerebroventrikularne administracije streptozotocina (STZ/D; 3mg/kg) ili otapala (CTR/A). Ekspresija fosforilirane kinaze pod kontrolom izvanstaničnih signala

(pERK1/2) vidljiva je kao crveno obojenje (označeno strelicama) (A - F). Povećanje 20X (A – F). XII – jezgra hypoglossusa; DMNX – dorzalna motorna jezgra vagusa.

### **5.6.5. Ekspresija transportera glukoze u moždanom deblu**

Imunofluorescencijska analiza DMNX pokazuje da peroralna i intraperitonealna administracija D-galaktoze smanjuju količinu GLUT3 u kontrolnih životinja (Slika 15. **B** i **C**). U STZ-icv životinja ekspresija GLUT3 u stanicama DMNX smanjena je u usporedbi s kontrolnim životinjama (slika 15.**D**). Akutna peroralna administracija galaktoze ne dovodi do očitih promjena signala GLUT3 u STZ-icv životinja (slika 15.**E**), ali akutna intraperitonealna administracija dovodi do dramatičnog povećanja signala (slika 15.**F**). Imunofluorescentna analiza GLUT4 pokazuje da iako u kontrolnih životinja nema očitih razlika u GLUT4 nakon peroralne i intraperitonealne administracije (Slika 15.**H** i **I**). U DMNX STZ-icv tretiranih životinja povećana je ekspresija GLUT4 (slika 15.**J**) u usporedbi s kontrolnim životinjama, a peroralna administracija dovodi do smanjenja signala (slika 15. **K**).



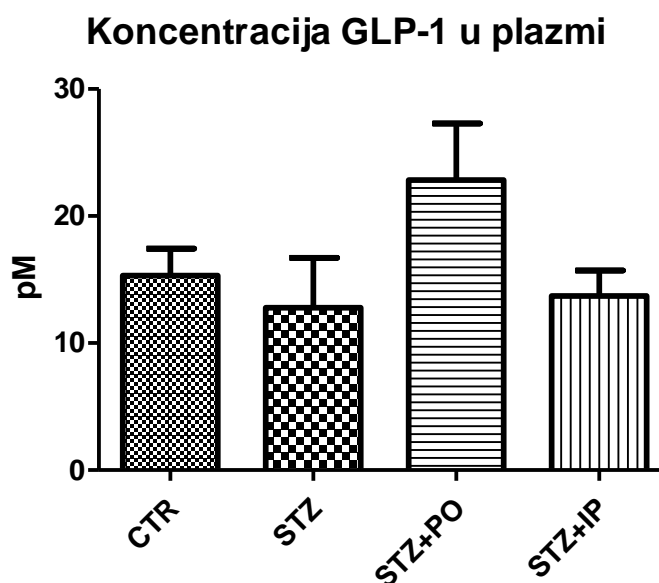
**Slika 15.** Učinak akutne oralne i intraperitonealne galaktoze na ekspresiju nosača za glukozu 3 i 4 u dorzalnoj motornoj jezgri vagusa. Životinje su žrtvovane 15 minuta nakon peroralne (CTR+PO/B, H; STZ+PO/E, K) i intraperitonealne (CTR+IP/C, I; STZ+IP/F, L) primjene galaktoze (200 mg/kg) 1 mjesec nakon intracerebroventrikularne administracije streptozotocina (STZ/D, J; 3mg/kg) ili otapala (CTR/A, G). Ekspresija

nosača za glukozu 3 i 4 (GLUT3 i GLUT4) vidljiva je kao crveno obojenje (označeno strelicama) (A - L). Povećanje 20X (A – F); povećanje 30X (G – L). XII – jezgra hypoglossusa; DMNX – dorzalna motorna jezgra vagusa.

## 5.7. Učinak akutne peroralne i intraperitonealne administracije galaktoze na GLP-1 sustav

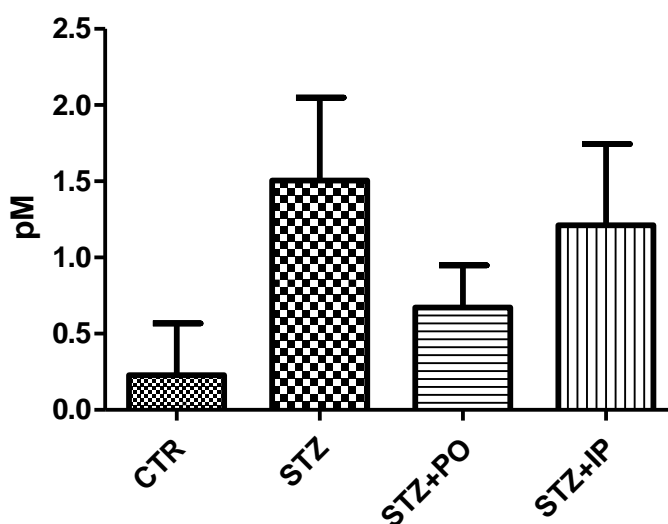
### 5.7.1. Koncentracija ukupnog GLP-1 u plazmi i cerebrospinalnom likvoru

Enzimskim imunotestom izmjerili smo koncentraciju ukupnog GLP-1 (7-36 i 9-36) u plazmi i cerebrospinalnom likvoru kontrolnih i STZ-icv životinja nakon akutne administracije peroralne i intraperitonealne galaktoze. Iako nema statistički značajnih razlika u razini ukupnog GLP-1 u plazmi i cerebrospinalnom likvoru između skupina (Slika 16. i 17.), primjećeno je veliko povećanje koncentracije ukupnog GLP-1 nakon peroralne administracije galaktoze u plazmi (+78%,  $p=0,08$ ) u usporedbi sa STZ skupinom (Slika 16).



**Slika 16. Koncentracija glukagonu sličnog peptida 1 u plazmi 15 nakon peroralne i intraperitonealne primjene galaktoze u štakora tretiranih intracerebroventrikularno streptozotocinom.** Životinje su žrtvovane 1 mjesec nakon intracerebroventrikularne primjene streptozotocina (STZ; 3 mg/kg) ili otapala (CTR). Dvije grupe životinja tretiranih sa STZ-om su žrtvovane 15 minuta nakon peroralne (STZ+PO) ili intraperitonealne (STZ+IP) primjene D-galaktoze (200 mg/kg). Koncentracija glukagonu sličnog peptida 1 (GLP-1) u plazmi izmjerena je pomoću enzimskom imunotesta (ELISA). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM. Podaci su analizirani neparametrijskim Kruskal-Walis i Mann Whitney U testovima. \* $p < 0,05$ .

### Koncentracija GLP-1 u cerebrospinalnom likvoru

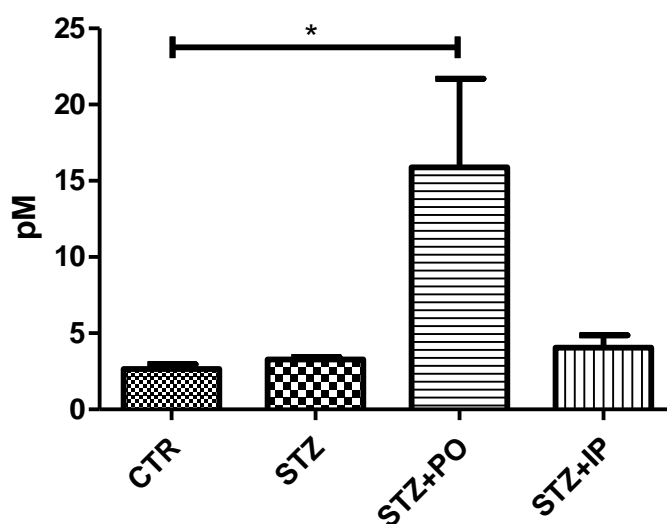


**Slika 17. Koncentracija glukagonu sličnog peptida 1 u cerebrospinalnom likvoru 15 nakon peroralne i intraperitonealne primjene galaktoze u štakora tretiranih intracerebroventrikularno streptozotocinom.** Životinje su žrtvovane 1 mjesec nakon intracerebroventrikularne primjene streptozotocina (STZ; 3 mg/kg) ili otapala (CTR). Dvije grupe životinja tretiranih sa STZ-om su žrtvovane 15 minuta nakon peroralne (STZ+PO) ili intraperitonealne (STZ+IP) primjene D-galaktoze (200 mg/kg). Koncentracija glukagonu sličnog peptida 1 (GLP-1) u cerebrospinalnom likvoru izmjerena je pomoću enzimskog imunotesta (ELISA). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM. Podaci su analizirani neparametrijskim Kruskal-Walis i Mann Whitney U testovima. \* $p < 0,05$ .

### 5.7.2. Koncentracija aktivnog GLP-1 u plazmi

Enzimskim imunotestom izmjerili smo i koncentraciju aktivnog GLP-1 (7-36 amid i 7-37) u plazmi kontrolnih i STZ-icv životinja nakon akutne administracije peroralne i intraperitonealne galaktoze. Nije uočena razlika u razini aktivnog GLP-1 između netretirane CTR i STZ skupine. Akutna doza galaktoze inducirala je veliko povećanje razine aktivnog GLP-1 u STZ-icv tretiranih štakora ali samo nakon oralne primjene (+500 %) u usporedbi s CTR skupinom ( $p < 0,05$ ) (Slika 18). Zbog velike varijabilnosti vrijednosti unutar skupine (STZ + 200 po GAL), razlike nisu doseglye statističku značajnost u usporedbi sa STZ skupinom (+384%;  $p = 0,09$ ) i STZ + 200 ip GAL skupinom (+291%;  $p = 0,07$ ) (Slika 18).

Koncentracija aktivnog GLP-1 u plazmi

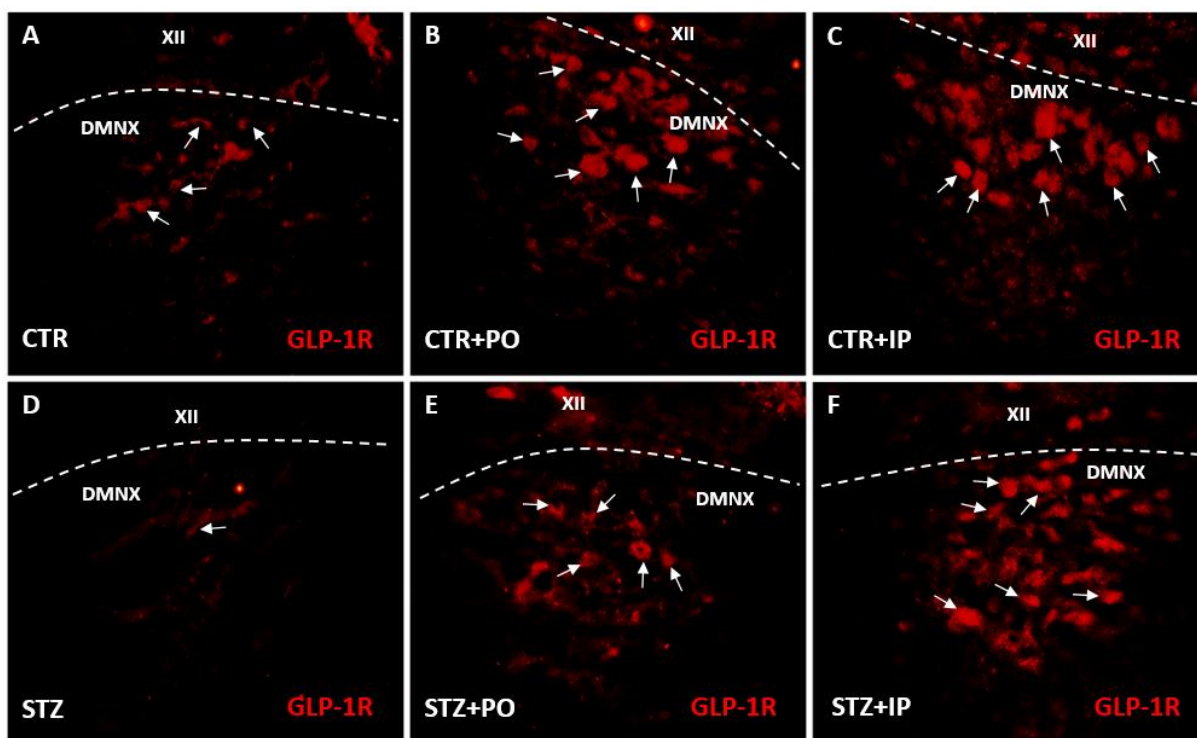


Slika 18. Koncentracija aktivnog glukagonu sličnog peptida 1 u plazmi 15 nakon peroralne i intraperitonealne primjene galaktoze u štakora tretiranih

**intracerebroventrikularno streptozotocinom.** Životinje su žrtvovane 1 mjesec nakon intracerebroventrikularne primjene streptozotocina (STZ; 3 mg/kg) ili otapala (CTR). Dvije grupe životinja tretiranih sa STZ-om su žrtvovane 15 minuta nakon peroralne (STZ+PO) ili intraperitonealne (STZ+IP) primjene D-galaktoze (200 mg/kg). Koncentracija aktivnog glukagonu sličnog peptida 1 (GLP-1) u plazmi izmjerena je pomoću enzimskog imunotesta (ELISA). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM. Podaci su analizirani neparametrijskim Kruskal-Walis i Mann Whitney U testovima. \* $p < 0,05$ .

### 5.7.3. Ekspresija GLP-1 receptora u DMNX

Imunofluorescencijska analiza ekspresije GLP-1 receptora pokazuje da životinje prethodno tretirane STZ-icv imaju smanjenu ekspresiju GLP-1R u stanicama DMNX (Slika 19.D) Akutna peroralna i intraperitonealna administracija galaktoze povećava ekspresiju GLP-1R u stanicama DMNX kontrolnih i STZ-icv životinja (slika 19. B,C,E,F).



**Slika 19. Učinak akutne oralne i intraperitonealne galaktoze na ekspresiju receptora za glukagonu-sličan peptid u dorzalnoj motornoj jezgri vagusa.** Životinje su žrtvovane 15 minuta nakon peroralne (CTR+PO/B; STZ+PO/E) i intraperitonealne (CTR+IP/C; STZ+IP/F) primjene D-galaktoze (200 mg/kg).

STZ+IP/F) primjene galaktoze (200 mg/kg) 1 mjesec nakon intracerebroventrikularne administracije streptozotocina (STZ/D; 3mg/kg) ili otapala (CTR/A). Ekspresija receptora za glukagonu-sličan peptid 1 (GLP-1R) vidljiva je kao crveno obojenje (označeno strelicama) (A - F). Povećanje 20X (A – F). XII – jezgra hypoglossusa; DMNX – dorzalna motorna jezgra vagusa.



## 6. RASPRAVA

Kronična svakodnevna parenteralna administracija D-galaktoze kod miševa i štakora rezultira propadanjem kognitivnih funkcija i koristi se kao model ubrzanog starenja [62, 63]. S druge strane, dugotrajna primjena peroralne galaktoze pokazuje zaštitni učinak i sprječava razvoj kognitivnih deficita u štakorskom modelu sAD-a [65, 66]. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati učinak akutne peroralne i intraperitonealne administracije galaktoze u STZ-icv tretiranih životinja kako bi bolje razumjeli pozadinu štetnih i pozitivnih učinaka galaktoze povezanih s različitim putem primjene. Moguće je da je učinak galaktoze ovisan o dozi te da je koncentracija galaktoze u plazmi i cerebrospinalnom likvoru, koja je veća nakon intraperitonealne administracije u usporedbi s peroralnom, jedan od posrednika štetnih učinaka galaktoze. Ranija istraživanja na zdravim štakorima u kojima je uspoređena koncentracija galaktoze u plazmi i CSF-u nakon administracije 100 mg/kg galaktoze peroralno i intraperitonealno, pokazala su da je koncentracija galaktoze u plazmi i CSF-u viša nakon intraperitonealne administracije u usporedbi s peroralnom [65]. Rezultati našeg istraživanja pokazuju da je koncentracija galaktoze u plazmi viša nakon intraperitonealne primjene kod STZ-icv životinja nakon administracije 200 mg/kg (slika 3.). S druge strane, nema značajne razlike u koncentraciji galaktoze u CSF-u STZ-icv životinja nakon peroralne i intraperitonealne primjene (slika 4.). Ovi rezultati mogli bi odražavati promijenjeni cerebralni metabolički odgovor na galaktozu kod STZ-icv životinja.

Mjesec dana nakon tretmana STZ-icv smanjena je koncentracija inzulina u plazmi u usporedbi s kontrolnim životinjama (slika 7.). Mehanizam kojim bi centralna administracija STZ-a uzrokovala promjene periferne koncentracije inzulina trenutno nije poznat što čini ove rezultate zanimljivima u kontesktu daljnjeg istraživanja mehanizma djelovanja STZ-a. S druge strane, koncentracija inzulina povećana je nakon administracije galaktoze, a povećanje inzulina moglo bi biti povezano s akutnim pozitivnim učinkom kod STZ-icv

životinja (slika 7.). Druga istraživanja pokazala su da kronična primjena galaktoze ne uzrokuje povišene vrijednosti inzulina [66] što sugerira da galaktoza ima normalizirajući učinak. Vrijednosti inzulina u CSF-u nisu u korelaciji s promjenama u plazmi što je u skladu s ranijim istraživanjima [74].

S obzirom da se oksidativni stres smatra jednim od važnih faktora u patogenezi AD-a [75] i važnim posrednikom štetnog učinka parenteralne galaktoze [62, 64], u ovom istraživanju ispitali smo aktivnost katalaze, ukupnu količinu reduciranog glutaciona i koncentraciju MDA u moždanom deblu nakon administracije galaktoze. Katalaza je enzim koji katalizira pretvorbu vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ) u vodu i kisik i smatra se jednim od ključnih enzima koji stanicu štiti od oštećenja nastalih oksidativnim stresom. In vitro i in vivo istraživanja pokazuju da galaktoza povećava aktivnost katalaze u moždanom tkivu [76, 77]. Naši rezultati pokazuju da peroralna i intraperitonealna administracija galaktoze povećava aktivnost katalaze kod kontrolnih životinja (slika 9.) što može biti posljedica neposrednog djelovanja galaktoze na aktivnost katalaze ili reaktivno povećanje aktivnosti nastalo kao odgovor na induciranje oksidativnog stresa. S druge strane peroralna i intraperitonealna administracija galaktoze normalizirala je aktivnost katalaze u STZ-icv životinja kod kojih je aktivnost povećana u usporedbi s kontrolnim životinjama (slika 9.). Glutation je tripeptid koji se smatra najvažnijim staničnim antioksidansom niske molekularne težine. Unutar stanice glutacion postoji u reduciranom (GSH) i oksidiranom (GSSG) stanju [78]. U reduciranom stanju tiolne skupine cisteina doniraju reducirajući ekvivalent drugim molekulama čime neutraliziraju slobodne radikale i održavaju cisteine proteina u reduciranoj formi [78]. Peroralna i intraperitonealna administracija galaktoze smanjuje količinu reduciranog glutaciona kod kontrolnih štakora (slika 9.), dok kod STZ-icv štakora dovodi do povećanja na razine koje su čak više od izmjerenih u kontrolnih životinja (slika 9.). Glutation se smatra važnim faktorom u etiopatogenezi AD-a [79], a progresivno smanjenje reduciranog glutaciona smatra se potencijalnim biomarkerom za napredovanje blagog kognitivnog oštećenja (eng. *mild cognitive impairment*, MCI) u AD [80]. S obzirom

da se povećanje količine reduciranog glutationa predlaže kao moguća terapijska intervencija u AD-u [80], dobiveni rezultati daju dodatnu vrijednost već postojećim dokazima koji govore u prilog istraživanja neuroprotektivnih učinaka galaktoze s potencijalnom terapijskom vrijednosti u sAD-u [65, 66]. Treći parametar oksidativnog stresa analiziran u ovom istraživanju je MDA, visoko reaktivni elektrofilni aldehid koji oštećuje staničnu funkciju, a nastaje kao sekundarni produkt lipidne peroksidacije [81, 82]. Količina MDA i drugih produkata lipidne peroksidacije povećana je u AD-u [81, 83–85]. Analiza lipidne peroksidacije govori u prilog povećane peroksidacije nakon administracije peroralne i intraperitonealne galaktoze pri čemu intraperitonealna galaktoza pokazuje jači učinak (slika 9.). Na temelju ovih rezultata očito je da je učinak galaktoze na oksidativni stres kompleksan i nelinearan te su potrebna daljnja istraživanja kako bi se u potpunosti razjasnila povezanost učinka galaktoze na različite redoks sustave stanice. Budući da su metabolizam i regulacija redoks sustava stanice usko povezani, istražili smo metaboličke promjene u moždanom deblu. S obzirom da su parametri povezani s oksidativnim stresom analizirani u cijelom moždanom deblu, za analizu metabolizma također smo koristili uzorke lizata cijelog moždanog debla. Analizirali smo signalne puteve povezane s oksidativnim stresom i to fosforilaciju ERK [86–88], ULK1 [89, 90] i P70S6 kinaze [91] (slika 10.). Budući da u lizatu cijelog moždanog debla nema statistički značajnih promjena, galaktoza ne uzrokuje oksidativni stres u moždanom deblu modulacijom glavnih metaboličkih puteva ili učinak galaktoze nije nespecifičan.

Dorzalna motorna jezgra vagusa eferentna je vagalna jezgra povezana s regulacijom metabolizma i imunosti. S obzirom da nisu očite promjene metabolizma u cijelom moždanom deblu istražili smo postoje li metaboličke promjene u DMNX. Fosforilacija supstrata 1 inzulinskog receptora, glavnog citosolnog supstrata IR-a koji povezuje fosforilaciju tirozina i aktivaciju proteina koji posjeduju SH2 domene [92], u DMNX pojačana je nakon peroralne i intraperitonealne administracije galaktoze u kontrolnih te nakon peroralne administracije u STZ-icv životinja (slika 11.). Ovi rezultati odgovaraju

trendu promjene inzulina plazmi i CSF-u gdje su najviše vrijednosti inzulina izmjerene nakon peroralne administracije galaktoze (slika 7. i 8.). Iako uloga inzulinske signalizacije u DVC-u nije do kraja razjašnjena intenzivno se istražuje u kontekstu regulacije homeostaze energije. Aktivacija inzulinskog receptora u DVC signalizacijskim putem ovisnim o ERK1/2, a neovisnim o PI3K smanjuje proizvodnju glukoze i unos hrane [93]. Promjena fosforilacije ERK1/2 pokazuje da je kod kontrolnih životinja ovaj signalni put aktiviran intraperitonealnom primjenom galaktoze, a kod STZ-icv životinja, iako je u usporedbi s kontrolnim životinjama pojačano aktiviran, peroralna administracija galaktoze uzrokuje dodatno povećanje fosforilacije dok ga intraperitonealna smanjuje (slika 14.). S obzirom da je fosforilacija ERK1/2 najmanje izražena u STZ-icv životinja nakon intraperitonealne administracije galaktoze, gdje je dobiven i najmanji intenzitet signala za pIRS1 (slika 11.), moguće je da intraperitonealna administracija galaktoze drugačije utječe na STZ-icv životinje zbog slabije aktivacije inzulinske signalizacije u DMNX-u. Analiza aktivnosti mTOR sustava DMNX-a govori u prilog povećane aktivnosti nakon peroralne administracije u kontrolnih i STZ-icv životinja što odgovara povećanoj aktivnosti pIRS1, ali izgleda da intraperitonealna administracija galaktoze dovodi do izuzetno povećane aktivnosti kod STZ-icv životinja (slika 12.). Hiperaktivnost mTOR puta smatra se važnom u AD-u [94, 95] i znak je metaboličke disfunkcije stanice. U našem istraživanju ovaj je fenomen dodatno potvrđen inhibicijom autofagije koja je vidljiva kao pojačana fosforilacija ULK1 na 757 serinu nakon peroralne administracije galaktoze kod kontrolnih i intraperitonealne administracije kod STZ-icv životinja (slika 13.). Obrnuto, peroralna administracija galaktoze pojačava autofagiju u DMNX-u STZ-icv životinja (slika 13.). Sumarno, kod STZ-icv životinja nakon peroralne administracije galaktoze dolazi do pojačanog lučenja inzulina, aktivacije inzulinske signalizacije u DMNX-u (povećana fosforilacija pIRS1), te aktivacije mTOR i ERK1/2 uz istovremenu aktivaciju autofagije. Nakon intraperitonealne administracije galaktoze ne dolazi do pojačanog lučenja inzulina ni do aktivacije inzulinske signalizacije (pIRS1), kao ni ERK1/2, ali dolazi do znatne aktivacije mTOR-a i veće razine oksidativnog stresa. Nakon intraperitonealne

administracije također dolazi do pojačanja signala GLUT3 i GLUT4 (slika 15.). Transporter za glukozu 4 prijenosnik je reguliran inzulinskom signalizacijom [96] i AMP-aktiviranom protein kinazom (AMPK) [97], a s obzirom da nakon intraperitonealne administracije galaktoze STZ-icv štakora nema pojačane inzulinske signalizacije moguće je da je pojačana ekspresija GLUT4 rezultat aktivacije AMPK. Iako su fiziološki oprečni u zdravoj stanici, istraživanja pokazuju da su AMPK i mTOR istovremeno pojačano aktivni u AD-u [98], a glavnim uzrokom difunkcionalne energetske homeostaze i recipročne regulacije AMPK i mTOR smatra se oksidativni stres [98] koji je u našem istraživanju bio najjače izražen kod STZ-icv životinja tretiranih intraperitonealnom galaktozom kao i pojačani signal transportera za glukozu. Promjena ekspresije GLUT4 inducirana galaktozom mogla bi imati posljedice i na inzulinsku signalizaciju DMNX-a s obzirom da istraživanja pokazuju da je inhibitorni učinak inzulina na sinaptičku ekscitaciju moguće spriječiti inhibicijom GLUT4 [99]. Iako iz dobivenih rezultata nije moguće zaključiti što je uzrok promjeni ekspresije transportera za glukozu, rezultati novijih istraživanja pokazuju da postoje mehanizmi AMPK-om posredovane regulacije transporta glukoze ovisni o ROS-u što bi moglo objasniti dramatično povećanu ekspresiju transportera za glukozu kod STZ-icv štakora nakon intraperitonealne administracije galaktoze [100].

Osim što je moguće da galaktoza direktno ostvaruje svoj učinak na metaboličkoj razini, postoji mogućnost da su pozitivni učinci peroralne galaktoze posredovani lučenjem inkretina iz probavnog sustava. Nedavno objavljeni rezultati govore u prilog ovoj hipotezi [66]. Glukagonu sličan peptid 1 inkretinski je hormon koji se luči iz L-stanica u crijevu na podražaj hranjenjem [101]. Osim što potiče lučenje inzulina, istraživanja pokazuju da GLP-1 ima neuroprotektivni i neurotrofni učinak zbog čega se u posljednje vrijeme intenzivno istražuje potencijalni terapijski učinak modulacije GLP-1 sustava [102–105]. Naši rezultati pokazuju da ne postoje statistički značajne razlike u koncentraciji GLP-1 kod STZ-icv životinja nakon peroralne i intraperitonealne primjene galaktoze u plazmi i u CSF-u (slika 16. i 17.). Međutim, koncentracija aktivnog oblika GLP-1 (7-36 amida i 7-37) značajno je

povećana samo nakon peroralne administracije galaktoze (slika 18.). Nakon što se GLP-1 izluči kao fiziološki odgovor na obrok, dipeptidil peptidaza IV (eng. dipeptidyl peptidase IV; DPPIV) metabolizira hormon prije nego što je uopće izašao iz crijeva što je navelo znanstvenike da postave hipotezu da je učinak GLP-1 posredovan vagalnim aferentnim živcima u jetri i crijevima koji ekspimiraju GLP-1 receptor [106, 107]. Nakon vezanja za GLP-1 receptor na aferentnim vlaknima vagusa neuralni se signal preko jezgre solitarnog trakta projicira u središnji živčani sustav i to primarno u hipotalamičke jezgre i jezgre u moždanom deblu – parabrahijalnu jezgru, retikularnu formaciju i DMNX [106]. Budući da GLP-1 signalizacija u DMNX aktivira motorne neurone koji inerviraju gušteraču [108, 109] ovaj se signalizacijski put smatra važnim u regulaciji sinteze i lučenja inzulina te postoji mogućnost da promjene na razini DMNX-a mogu utjecati na zabilježene promjene inzulinskog sustava. Imunofluorescentna analiza pokazuje da peroralna i intraperitonealna administracija galaktoze povećavaju ekspresiju GLP-1 receptora u stanicama DMNX-a (slika 19.). Osim što sugeriraju da peroralna galaktoza ostvaruje svoj neuroprotektivni učinak stimulacijom sekrecije GLP-1, ovi rezultati važni su i za razumijevanja ranije prikazanih metaboličkih promjena povezanih s inzulinskom signalizacijom u DVC-u. Inzulin inhibira sinaptičku ekscitaciju neurona DMNX-a, a istraživanja pokazuju da su učinci neuromodulatora na sinaptičku inhibiciju u DMNX-u ovisni o povećanoj razini unutarstaničnog cAMP-a i vjerojatno povezani s cAMP-ovisnom translokacijom receptora [110–112]. Inzulin sprječava cAMP-om inducirano oslobađanje GABA-e u DMNX-u [99] što implicira postojanje interakcije između utjecaja inzulina i inkretina na razini DMNX-a na vago-vagalnu regulaciju tjelesnih funkcija povezanih s energetsom homeostazom. Vezanje inzulina na inzulinski receptor potiče o cAMP-u ovisnu fosforilaciju supstrata inzulinskog receptora (IRS), aktivaciju kinaza i modulaciju ionskih kanala [99]. S obzirom na permisivnu ulogu cAMP-a na inzulinsku signalizaciju u DMNX-u, moguće je da je inhibitorni učinak inzulina trajno inhibiran te da se aktivira tek akumulacijom cAMP-a induciranom vezanjem inkretina na receptor (npr. GLP-1). Rezultati

ovog istraživanja dodatno potvrđuju hipotezu da galaktoza ostvaruje učinak modulacijom GLP-1 sustava [66].

S ozirom na prikazane rezultate očito je da postoje brojne razlike u učinku galaktoze koje ne ovise samo o načinu primjene, već i o stanju životinje koja je tretirana što je potrebno dodatno istražiti kako bi se dobio uvid u mehanizam štetnog i pozitivnog djelovanja galaktoze u različitim životinjskim modelima.

## 7. ZAKLJUČCI

- 1) Koncentracija galaktoze u plazmi povećana je nakon primjene galaktoze u STZ-icv tretiranih životinja (viša nakon intraperitonealne u odnosu na peroralnu primjenu). U cerebrospinalnom likvoru akutna administracija galaktoze ne dovodi do značajnih promjena.
- 2) Akutna peroralna i intraperitonealna primjena galaktoze ne dovode do značajnih promjena glukoze u plazmi i cerebrospinalnom likvoru STZ-icv životinja.
- 3) Koncentracija inzulina u plazmi smanjena je mjesec dana nakon STZ-icv primjene. Akutna peroralna i intraperitonealna administracija galaktoze povećava koncentraciju inzulina u plazmi. Koncentracija inzulina u cerebrospinalnom likvoru nije nađena promjenjena.
- 4) Peroralna i intraperitonealna akutna primjena galaktoze uzrokuje povećanje aktivnosti katalaze i smanjenje količine antioksidansa, reduciranog glutationa, u zdravih životinja, dok je učinak u STZ-icv životinja suprotan u odnosu na kontrolne životinje. Akutna primjena peroralne i intraperitonealne galaktoze povećava lipidnu peroksidaciju u kontrolnih i STZ-icv tretiranih životinja.
- 5) Metabolički učinak akutne primjene galaktoze selektivan je i ne uzrokuje metaboličke promjene povezane s fosforilacijom P70S6K, ERK1/2 i ULK1 na razini cijelog moždanog debla kontrolnih i STZ-icv životinja.
- 6) Kontrolne i STZ-icv životinje mjesec dana nakon tretmana pokazuju različit obrazac promjena proteina povezanih s inzulinskom signalizacijom, regulacijom metabolizma te staničnog transporta glukoze u odgovoru na akutnu primjenu peroralne i intraperitonealne galaktoze.



- 7) Akutna primjena galaktoze ne dovodi do značajnih promjena u koncentraciji GLP-1 u plazmi i cerebrospinalnom likvoru, ali dovodi do značajnog povećanja aktivnog oblika GLP-1 u plazmi.
- 8) Akutna peroralna i intraperitonealna administracija galaktoze dovodi do povećanja ekspresije GLP-1 receptora u DMNX-u kontrolnih i STZ-icv životinja.

## 8. ZAHVALE

Zahvaljujem se mentorici dr.sc. Ani Knezović na neizmjernom trudu i volji te vremenu koje je spremno žrtvovala kako bi kako bi mi pomogla u svakom segmentu učenja znanstvene metodologije koje je rezultiralo ovim radom. Hvala i za prijateljstvo i brojne životne poduke koje su došle u kompletu.

Veliko hvala prof.dr.sc. Šalković-Petrišić, voditeljici laboratorija za molekularnu neurofarmakologiju na velikom povjerenju, prilici da kao student učim u njenom laboratoriju i pažljivom mentorskom usmjeravanju.

Hvala i ostatku ekipe iz laboratorija za molekularnu neurofarmakologiju i drugim djelatnicima zavoda na brojnim savjetima i pomoći.

Hvala Božici Hržan na velikoj pomoći pri izvođenju svih pokusa.

Hvala Hrvatskoj zakladi za znanost bez čije financijske pomoći nebi bilo moguće izraditi istraživanja na kojima se temelji ovaj diplomski rad.

## 9. POPIS LITERATURE

- [1] Qiu C, Kivipelto M, von Strauss E. Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues Clin Neurosci* 2009; 11: 111–28.
- [2] Lobo A, Launer LJ, Fratiglioni L, et al. Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology* 2000; 54: S4-9.
- [3] Plassman BL, Langa KM, Fisher GG, et al. Prevalence of Dementia in the United States: The Aging, Demographics, and Memory Study. *Neuroepidemiology* 2007; 29: 125–132.
- [4] Ferri CP, Prince M, Brayne C, et al. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 2005; 366: 2112–2117.
- [5] Fratiglioni L, Launer LJ, Andersen K, et al. Incidence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology* 2000; 54: S10-5.
- [6] Kawas C, Gray S, Brookmeyer R, et al. Age-specific incidence rates of Alzheimer's disease: the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Neurology* 2000; 54: 2072–7.
- [7] Prince M, Comas-Herrera A, Knapp M, et al. World Alzheimer Report 2016 Improving healthcare for people living with dementia. Coverage, Quality and costs now and in the future. *Alzheimer's Dis Int* 2016; 1–140.
- [8] Stefanacci RG. The costs of Alzheimer's disease and the value of effective therapies. *Am J Manag Care* 2011; 17 Suppl 1: S356-62.
- [9] Burns A, Iliffe S. Alzheimer's disease. *BMJ* 2009; 338: b158.
- [10] Perl DP. Neuropathology of Alzheimer ' s Disease. *Mt Sinai J Med* 2010; 77: 32–42.
- [11] Lista S, O'Bryant SE, Blennow K, et al. Biomarkers in Sporadic and Familial Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis* 2015; 47: 291–317.
- [12] Mohandas E, Rajmohan V, Raghunath B. Neurobiology of Alzheimer's disease. *Indian J Psychiatry* 2009; 51: 55–61.

- [13] Karran E, Mercken M, Strooper B De. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2011; 10: 698–712.
- [14] Morris GP, Clark IA, Vissel B. Inconsistencies and controversies surrounding the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun* 2014; 2: 135.
- [15] Zigman WB, Devenny DA, Krinsky-McHale SJ, et al. Alzheimer's Disease in Adults with Down Syndrome. In: *International review of research in mental retardation*, pp. 103–145.
- [16] Maccioni RB, Farías G, Morales I, et al. The Revitalized Tau Hypothesis on Alzheimer's Disease. *Arch Med Res* 2010; 41: 226–231.
- [17] Akiyama H, Barger S, Barnum S, et al. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2000; 21: 383–421.
- [18] Wyss-Coray T, Rogers J. Inflammation in Alzheimer disease—a brief review of the basic science and clinical literature. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2: a006346.
- [19] Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 2010; 48: 749–62.
- [20] Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, et al. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J* 2012; 5: 9–19.
- [21] Butterfield DA, Bader Lange ML, Sultana R. Involvements of the lipid peroxidation product, HNE, in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1801: 924–9.
- [22] de la Torre JC. The Vascular Hypothesis of Alzheimer's Disease: Bench to Bedside and Beyond. *Neurodegener Dis* 2010; 7: 116–121.
- [23] Correia SC, Santos RX, Perry G, et al. Insulin-resistant brain state: The culprit in sporadic Alzheimer's disease? *Ageing Res Rev* 2011; 10: 264–273.
- [24] Neth BJ, Craft S. Insulin Resistance and Alzheimer's Disease: Bioenergetic Linkages. *Front Aging Neurosci* 2017; 9: 345.
- [25] Garwood CJ, Ratcliffe LE, Morgan S V., et al. Insulin and IGF1 signalling pathways in human astrocytes in vitro and in vivo; characterisation, subcellular localisation and modulation of the receptors. *Mol Brain* 2015; 8: 51.

- [26] Skeberdis VA, Lan J -y., Zheng X, et al. Insulin promotes rapid delivery of N-methyl-D- aspartate receptors to the cell surface by exocytosis. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98: 3561–3566.
- [27] Kopf SR, Baratti CM. Effects of Posttraining Administration of Insulin on Retention of a Habituation Response in Mice: Participation of a Central Cholinergic Mechanism. *Neurobiol Learn Mem* 1999; 71: 50–61.
- [28] Figlewicz DP, Szot P, Israel PA, et al. Insulin reduces norepinephrine transporter mRNA in vivo in rat locus coeruleus. *Brain Res* 1993; 602: 161–4.
- [29] Hoyer S. Causes and consequences of disturbances of cerebral glucose metabolism in sporadic Alzheimer disease: therapeutic implications. *Adv Exp Med Biol* 2004; 541: 135–52.
- [30] de la Monte SM. Brain insulin resistance and deficiency as therapeutic targets in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2012; 9: 35–66.
- [31] Rivera EJ, Goldin A, Fulmer N, et al. Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine. *J Alzheimers Dis* 2005; 8: 247–68.
- [32] Frölich L, Blum-Degen D, Bernstein H-G, et al. Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 1998; 105: 423.
- [33] Watson GS, Craft S. Modulation of memory by insulin and glucose: neuropsychological observations in Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol* 2004; 490: 97–113.
- [34] Elder GA, Gama Sosa MA, De Gasperi R. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med* 2010; 77: 69–81.
- [35] Salkovic-Petrisic M, Knezovic A, Hoyer S, et al. What have we learned from the streptozotocin-induced animal model of sporadic Alzheimer's disease, about the therapeutic strategies in Alzheimer's research. *J Neural Transm* 2013; 120: 233–52.
- [36] Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 2001; 50: 537–46.
- [37] Agrawal R, Tyagi E, Shukla R, et al. Insulin receptor signaling in rat hippocampus: A study in STZ (ICV) induced memory deficit model. *Eur Neuropsychopharmacol* 2011; 21: 261–273.
- [38] Grünblatt E, Salkovic-Petrisic M, Osmanovic J, et al. Brain insulin system

dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. *J Neurochem* 2007; 101: 757–70.

[39] Hoyer S, Lannert H. Long-term abnormalities in brain glucose/energy metabolism after inhibition of the neuronal insulin receptor: implication of tau-protein. *J Neural Transm Suppl* 2007; 195–202.

[40] Biasibetti R, Almeida Dos Santos JP, Rodrigues L, et al. Hippocampal changes in STZ-model of Alzheimer's disease are dependent on sex. *Behav Brain Res* 2017; 316: 205–214.

[41] Prakash A, Kalra JK, Kumar A. Neuroprotective effect of N-acetyl cysteine against streptozotocin-induced memory dysfunction and oxidative damage in rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2015; 26: 13–23.

[42] Knezovic A, Loncar A, Homolak J, et al. 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* 2017; 124: 695–708.

[43] Knezovic A, Osmanovic-Barilar J, Curlin M, et al. Staging of cognitive deficits and neuropathological and ultrastructural changes in streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 2015; 122: 577–92.

[44] Salkovic-Petrisic M, Tribl F, Schmidt M, et al. Alzheimer-like changes in protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 in rat frontal cortex and hippocampus after damage to the insulin signalling pathway. *J Neurochem* 2006; 96: 1005–15.

[45] Kandel ER. *Principles of Neural Science*. 5th ed. McGraw-Hill, 2012.

[46] Grinberg LT, Rüb U, Ferretti REL, et al. The dorsal raphe nucleus shows phospho-tau neurofibrillary changes before the transentorhinal region in Alzheimer's disease. A precocious onset? *Neuropathol Appl Neurobiol* 2009; 35: 406–16.

[47] Rüb U, Del Tredici K, Schultz C, et al. The evolution of Alzheimer's disease-related cytoskeletal pathology in the human raphe nuclei. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2000; 26: 553–67.

[48] Lyness SA, Zarow C, Chui HC. Neuron loss in key cholinergic and aminergic nuclei in Alzheimer disease: a meta-analysis. *Neurobiol Aging* 2003; 24: 1–23.

[49] Pavlov VA, Tracey KJ. The vagus nerve and the inflammatory reflex--linking immunity and metabolism. *Nat Rev Endocrinol* 2012; 8: 743–54.

- [50] Browning KN, Verheijden S, Boeckxstaens GE. The Vagus Nerve in Appetite Regulation, Mood, and Intestinal Inflammation. *Gastroenterology* 2017; 152: 730–744.
- [51] Cruz MT, Murphy EC, Sahibzada N, et al. A reevaluation of the effects of stimulation of the dorsal motor nucleus of the vagus on gastric motility in the rat. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* 2007; 292: R291–R307.
- [52] Zhang X-Y, Ai H-B, Cui X-Y. Effects of nucleus ambiguus and dorsal motor nuclei of vagus on gastric H(+) and HCO<sub>3</sub>(-) secretion in rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3271–4.
- [53] Mussa BM, Verberne AJM. Activation of the dorsal vagal nucleus increases pancreatic exocrine secretion in the rat. *Neurosci Lett* 2008; 433: 71–76.
- [54] Ionescu E, Rohner-Jeanrenaud F, Berthoud H-R, et al. Increases in Plasma Insulin Levels in Response to Electrical Stimulation of the Dorsal Motor Nucleus of the Vagus Nerve\*. *Endocrinology* 1983; 112: 904–910.
- [55] Pocai A, Obici S, Schwartz GJ, et al. A brain-liver circuit regulates glucose homeostasis. *Cell Metab* 2005; 1: 53–61.
- [56] Chavan SS, Pavlov VA, Tracey KJ. Mechanisms and Therapeutic Relevance of Neuro-immune Communication. *Immunity* 2017; 46: 927–942.
- [57] Polak T, Ehlis A-C, Langer JBM, et al. Non-invasive measurement of vagus activity in the brainstem – a methodological progress towards earlier diagnosis of dementias? *J Neural Transm* 2007; 114: 613–619.
- [58] Parvizi J, Van Hoesen GW, Damasio A. The selective vulnerability of brainstem nuclei to Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2001; 49: 53–66.
- [59] Pasteur L. Note sur le sucre de lait. *Comptes rendus l'Académie des Sci* 1856; 42: 347–351.
- [60] Coelho AI, Berry GT, Rubio-Gozalbo ME. Galactose metabolism and health. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2015; 18: 422–427.
- [61] Ohtsubo K, Marth JD. Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. *Cell* 2006; 126: 855–867.
- [62] Ho S-C, Liu J-H, Wu R-Y. Establishment of the mimetic aging effect in mice caused by D-galactose. *Biogerontology* 2003; 4: 15–8.
- [63] Wei H, Li L, Song Q, et al. Behavioural study of the -galactose induced aging

model in C57BL/6J mice. *Behav Brain Res* 2005; 157: 245–251.

[64] Song X, Bao M, Li D, et al. Advanced glycation in D-galactose induced mouse aging model. *Mech Ageing Dev* 1999; 108: 239–51.

[65] Salkovic-Petrisic M, Osmanovic-Barilar J, Knezovic A, et al. Long-term oral galactose treatment prevents cognitive deficits in male Wistar rats treated intracerebroventricularly with streptozotocin. *Neuropharmacology* 2014; 77: 68–80.

[66] Knezovic A, Barilar JO, Babic A, et al. Glucagon-like peptide-1 mediates effects of oral galactose in streptozotocin-induced rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*. Epub ahead of print February 2018. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2018.02.027.

[67] Gong C-X, Liu F, Grundke-Iqbal I, et al. Impaired brain glucose metabolism leads to Alzheimer neurofibrillary degeneration through a decrease in tau O-GlcNAcylation. *J Alzheimers Dis* 2006; 9: 1–12.

[68] Roser M, Josic D, Kontou M, et al. Metabolism of galactose in the brain and liver of rats and its conversion into glutamate and other amino acids. *J Neural Transm* 2009; 116: 131–139.

[69] Noble EP, Wurtman RJ, Axelrod J. A simple and rapid method for injecting H3-norepinephrine into the lateral ventricle of the rat brain. *Life Sci* 1967; 6: 281–291.

[70] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265–75.

[71] Trinder P. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J Clin Pathol* 1969; 22: 158–61.

[72] Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121–126.

[73] Prabhakar P V., Reddy UA, Singh SP, et al. Oxidative stress induced by aluminum oxide nanomaterials after acute oral treatment in Wistar rats. *J Appl Toxicol* 2012; 32: 436–445.

[74] Schechter R, Whitmire J, Holtzclaw L, et al. Developmental regulation of insulin in the mammalian central nervous system. *Brain Res* 1992; 582: 27–37.

[75] Huang W-J, Zhang X, Chen W-W. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biomed reports* 2016; 4: 519–522.

[76] Delwing-de Lima D, Fröhlich M, Dalmedico L, et al. Galactose alters markers



of oxidative stress and acetylcholinesterase activity in the cerebrum of rats: protective role of antioxidants. *Metab Brain Dis* 2017; 32: 359–368.

[77] Vora SR, Patil RB, Pillai MM, et al. Effect of D-galactose on catalase activity of brain and heart of mice. *J Ecophysiol Occup Heal* 2004; 4: 167–168.

[78] Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med* 2009; 30: 1–12.

[79] Saharan S, Mandal PK. The Emerging Role of Glutathione in Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis* 2014; 40: 519–529.

[80] Pocernich CB, Butterfield DA. Elevation of glutathione as a therapeutic strategy in Alzheimer disease. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1822: 625–30.

[81] Sultana R, Perluigi M, Allan Butterfield D. Lipid peroxidation triggers neurodegeneration: a redox proteomics view into the Alzheimer disease brain. *Free Radic Biol Med* 2013; 62: 157–69.

[82] Moneim AEA. Oxidant/Antioxidant imbalance and the risk of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2015; 12: 335–49.

[83] Subbarao K V, Richardson JS, Ang LC. Autopsy samples of Alzheimer's cortex show increased peroxidation in vitro. *J Neurochem* 1990; 55: 342–5.

[84] Singh M, Nam DT, Arseneault M, et al. Role of By-Products of Lipid Oxidation in Alzheimer's Disease Brain: A Focus on Acrolein. *J Alzheimer's Dis* 2010; 21: 741–756.

[85] Dang TN, Arseneault M, Murthy V, et al. Potential role of acrolein in neurodegeneration and in Alzheimer's disease. *Curr Mol Pharmacol* 2010; 3: 66–78.

[86] Tan B-J, Chiu GNC. Role of oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and ERK activation in triptolide-induced apoptosis. *Int J Oncol* 2013; 42: 1605–1612.

[87] Yufune S, Satoh Y, Akai R, et al. Suppression of ERK phosphorylation through oxidative stress is involved in the mechanism underlying sevoflurane-induced toxicity in the developing brain. *Sci Rep* 2016; 6: 21859.

[88] Garg TK, Chang JY. Oxidative stress causes ERK phosphorylation and cell death in cultured retinal pigment epithelium: Prevention of cell death by AG126 and 15-deoxy-delta 12, 14-PGJ2. *BMC Ophthalmol* 2003; 3: 5.

[89] Joshi A, Iyengar R, Joo JH, et al. Nuclear ULK1 promotes cell death in

response to oxidative stress through PARP1. *Cell Death Differ* 2016; 23: 216–230.

[90] Korovila I, Hugo M, Castro JP, et al. Proteostasis, oxidative stress and aging. *Redox Biol* 2017; 13: 550–567.

[91] Kimball SR, Abbas A, Jefferson LS. Melatonin represses oxidative stress-induced activation of the MAP kinase and mTOR signaling pathways in H4IIE hepatoma cells through inhibition of Ras. *J Pineal Res* 2008; 44: 379–86.

[92] Folli F, Bonfanti L, Renard E, et al. Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) distribution in the rat central nervous system. *J Neurosci* 1994; 14: 6412–22.

[93] Filippi BM, Bassiri A, Abraham MA, et al. Insulin Signals Through the Dorsal Vagal Complex to Regulate Energy Balance. *Diabetes* 2014; 63: 892–899.

[94] Orr ME, Salinas A, Buffenstein R, et al. Mammalian target of rapamycin hyperactivity mediates the detrimental effects of a high sucrose diet on Alzheimer's disease pathology. *Neurobiol Aging* 2014; 35: 1233–42.

[95] Oddo S. The role of mTOR signaling in Alzheimer disease. *Front Biosci (Schol Ed)* 2012; 4: 941–52.

[96] Cushman SW, Wardzala LJ. Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. *J Biol Chem* 1980; 255: 4758–62.

[97] Mu J, Brozinick JT, Valladares O, et al. A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. *Mol Cell* 2001; 7: 1085–94.

[98] Majd S, Power JH. Oxidative Stress and Decreased Mitochondrial Superoxide Dismutase 2 and Peroxiredoxin 1 and 4 Based Mechanism of Concurrent Activation of AMPK and mTOR in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*; 15. Epub ahead of print 23 February 2018. DOI: 10.2174/1567205015666180223093020.

[99] Blake CB, Smith BN. cAMP-dependent insulin modulation of synaptic inhibition in neurons of the dorsal motor nucleus of the vagus is altered in diabetic mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2014; 307: R711-20.

[100] Maeda A, Shirao T, Shirasaya D, et al. Piperine Promotes Glucose Uptake through ROS-Dependent Activation of the CAMKK/AMPK Signaling Pathway in Skeletal Muscle. *Mol Nutr Food Res* 2018; 62: 1800086.

[101] Holst JJ. The Physiology of Glucagon-like Peptide 1. *Physiol Rev* 2007; 87:

1409–1439.

- [102] Salcedo I, Tweedie D, Li Y, et al. Neuroprotective and neurotrophic actions of glucagon-like peptide-1: an emerging opportunity to treat neurodegenerative and cerebrovascular disorders. *Br J Pharmacol* 2012; 166: 1586–1599.
- [103] Duarte AI, Candeias E, Correia SC, et al. Crosstalk between diabetes and brain: Glucagon-like peptide-1 mimetics as a promising therapy against neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2013; 1832: 527–541.
- [104] Athauda D, Foltynie T. The glucagon-like peptide 1 (GLP) receptor as a therapeutic target in Parkinson's disease: mechanisms of action. *Drug Discov Today* 2016; 21: 802–818.
- [105] Hölscher C. Potential Role of Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) in Neuroprotection. *CNS Drugs* 2012; 26: 871–882.
- [106] Katsurada K, Yada T. Neural effects of gut- and brain-derived glucagon-like peptide-1 and its receptor agonist. *J Diabetes Investig* 2016; 7: 64–69.
- [107] Krieger J-P, Arnold M, Pettersen KG, et al. Knockdown of GLP-1 receptors in vagal afferents affects normal food intake and glycemia. *Diabetes* 2015; 65: db150973.
- [108] Wan S, Coleman FH, Travagli RA. Glucagon-like peptide-1 excites pancreas-projecting preganglionic vagal motoneurons. *Am J Physiol Liver Physiol* 2007; 292: G1474–G1482.
- [109] Wan S, Browning KN, Travagli RA. Glucagon-like peptide-1 modulates synaptic transmission to identified pancreas-projecting vagal motoneurons. *Peptides* 2007; 28: 2184–2191.
- [110] Pagani FD, Norman WP, Kasbekar DK, et al. Localization of sites within dorsal motor nucleus of vagus that affect gastric motility. *Am J Physiol Liver Physiol* 1985; 249: G73–G84.
- [111] Merchenthaler I. Neurons with access to the general circulation in the central nervous system of the rat: a retrograde tracing study with fluoro-gold. *Neuroscience* 1991; 44: 655–62.
- [112] Gross PM, Wall KM, Pang JJ, et al. Microvascular specializations promoting rapid interstitial solute dispersion in nucleus tractus solitarius. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* 1990; 259: R1131–R1138.

## 10. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 11.4.1993. u Zagrebu gdje sam završio I. gimnaziju i iste godine upisao Medicinski fakultet od kojeg se trenutno opraštam s odličnim uspjehom. Dobitnik sam Stipendije Grada Zagreba za izvrsnost i dvije Rektorove nagrade, te brojnih nagrada za najbolja studentska izlaganja i znanstvene radove. Jedan sam od voditelja Studentske Sekcije za Neuroznanost te voditelj i osnivač Studentske Sekcije za Fiziologiju Sporta. Sudjelovao sam u organizaciji brojnih studentskih kongresa i događanja. Tijekom studija bio sam demonstrator na kolegijima Patofiziologija i Temelji neuroznanosti te pridruženi urednik časopisa *Gyrus*.

Uz studij flertao sam sa znanstvenim radom i to primarno u područjima neuroznanosti i sportske fiziologije u koja sam se zaljubio još prije faksa. Zaljubljenost u znanost prerasla je u ljubav u sklopu rada u Laboratoriju za molekularnu neurofarmakologiju pod mentorstvom prof.dr.sc.Melite Šalković-Petrišić gdje sam pod budnim okom profesorice i njene desne ruke, dr.sc.Ane Knezović sudjelovao na znanstvenim istraživanjima na 4 projekta od kojih su 2 trenutno aktivna te sudjelovao u 2 znanstveno-istraživačna posjeta Zavodu za Psihijatriju, psihosomatiku i psihoterapiju Centra za mentalno zdravlje Sveučilišne bolnice u Würzburgu (sumentorstvo: prof.Angelika Gertrud Schmitt). Uz rad u Laboratoriju za molekularnu neurofarmakologiju tijekom studija imao sam priliku pomagati na manjim projektima vezanim uz kliničku primjenu neuroznanosti i fiziologiju sporta. Autor i koautor sam 9 kongresnih sažetaka i 11 znanstvenih radova koji su u međuvremenu poskupljali i neke citate.

Profesionalno sam se bavio plivanjem 18 godina iako nisam ništa zaradio. Ljubitelj sam glazbe, a nerijetko i aktivni suučesnik. Aktivno se bavim sportom s iznimkom zadnja 2 tjedna mirovanja zbog ozljede ligamenata radi čega sam napokon napisao diplomski. Volim pse više od mačaka, imam problema s impulzivnim kupovanjem knjiga i nikad nisam prerastao uvjerenje da sam *jedi*.