

# Rane promjene u mozgu izazvane središnjom primjenom streptozotocina u eksperimentalnom modelu sporadične Alzheimerove bolesti

---

Lončar, Andrija

Doctoral thesis / Disertacija

2020

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:105:960211>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-28**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Andrija Lončar**

**Rane promjene u mozgu izazvane  
središnjom primjenom streptozotocina  
u eksperimentalnom modelu  
sporadične Alzheimerove bolesti**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2020.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Andrija Lončar**

**Rane promjene u mozgu izazvane  
središnjom primjenom streptozotocina  
u eksperimentalnom modelu  
sporadične Alzheimerove bolesti**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2020.**

Disertacija je izrađena u Zavodu za farmakologiju i Hrvatskom institutu za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Melita Šalković-Petrišić

Hvala mojoj mentorici što je imala puno strpljenja i razumijevanja, te vjere u sretan završetak kad i sam nisam u to vjerovao. Hvala asistentici dr.sc. Ani Knezović, dipl. ing. biol. na velikoj pomoći u izvedbi istraživanja iz ovog doktorata te upoznavanju i vođenju u laboratorijskom radu. Njena volja da pomogne s lakoćom u svakom trenutku je bila bitan dio sigurnosti i mirnoće u ovom procesu. Hvala tehničarima Božici Hržan, Josipu Paviću, Nevenki Romčević i Moniki Vuletić. Bez njih svakako ništa od ovoga ne bi bilo moguće. Hvala supruzi Ivani, kćerki Saši i sinu Bartolu što postoje, mojim roditeljima te baki i nonu koji su omogućili vrijeme za sve i svim mojim prijateljima.

## SADRŽAJ:

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Alzheimerova bolest.....	1
1.1.1. Patofiziologija.....	1
1.1.2. Protein tau .....	4
1.1.3. Amiloid beta .....	7
1.1.4. Kolinergični sustav u Alzheimerovoj bolesti .....	8
1.2. Inzulinski sustav u mozgu .....	9
1.3. Životinjski modeli Alzheimerove bolesti .....	14
1.3.1. Transgenični modeli.....	15
1.3.2. Netransgenični modeli .....	16
1.3.2.1. Modeli vezani za amiloidnu patologiju .....	17
1.3.2.2. Modeli vezani za tau patologiju .....	17
1.3.2.3. Modeli koji pokazuju ostale značajke Alzheimerove bolesti .....	18
1.3.3. Ostali modeli .....	18
1.3.4. Modeli s intracerebroventrikularnom primjenom streptozotocina .....	19
1.3.4.1. Streptozotocin .....	19
1.3.4.2. Mehanizam djelovanja streptozotocina .....	19
1.3.4.3. Kognitivne, biokemijske i morfološke promjene izazvane intracerebroventrikularnom primjenom streptozotocina.....	20
1.3.5. Anatomske, neuroanatomske, bihevioralne i kognitivne razlike između miša i štakora, značajne za dizajniranje modela Alzheimerove bolesti.....	25
<b>2. HIPOTEZA</b> .....	<b>27</b>
<b>3. CILJEVI RADA</b> .....	<b>28</b>
<b>4. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>29</b>
4.1. Životinje .....	29

4.2. Kemikalije, reagensi i protutijela .....	29
4.3. Plan pokusa.....	32
4.4. Intracerebroventrikularna primjena streptozotocina.....	32
4.5. Uzimanje i pripremanje bioloških uzoraka.....	33
4.6. Western blot analiza .....	34
4.7. Mjerenje aktivnosti acetilkolinesteraze .....	36
4.8. Histokemija i imunohistokemija.....	36
4.8.1. Bojanje po Nisslu.....	37
4.8.2. Imunohistokemija .....	37
4.9. Statistička obrada podataka .....	37
<b>5. REZULTATI .....</b>	<b>38</b>
5.1. Utjecaj streptozotocina na inzulinski sustav .....	38
5.2. Utjecaj streptozotocina na protein tau .....	43
5.3. Utjecaj streptozotocina na enzime koji reguliraju homeostazu acetilkolina .....	52
5.4. Utjecaj streptozotocina na astrogliozu i strukturne promjene.....	57
<b>6. RASPRAVA.....</b>	<b>62</b>
6.1. Promjene u inzulinskom sustavu .....	63
6.2. Promjene u fosforilaciji proteina tau .....	67
6.3. Promjene u kolinergičnom sustavu .....	71
6.4. Promjene u strukturi i astrogliozu.....	73
6.5. Usporedba mjerenih parametara u štakorskom i mišjem STZ-icv modelu .....	74
<b>7. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>76</b>
<b>8. SAŽETAK.....</b>	<b>78</b>
<b>9. SUMMARY .....</b>	<b>79</b>
<b>10. POPIS LITERATURE .....</b>	<b>80</b>
<b>11. BIOGRAFIJA.....</b>	<b>107</b>

## KRATICE:

<b>AB</b>	-	Alzheimerova bolest
<b>ACh</b>	-	acetilkolin
<b>AChE</b>	-	acetilkolinesteraza
<b>AICD</b>	-	<i>amyloid precursor protein intracellular domain</i> : unutarstanična domena prekursora proteina amiloidnog
<b>Akt/PKB</b>	-	protein-kinaza B
<b>AMPA</b>	-	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i> : α-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionična kiselina
<b>AMPK</b>	-	<i>adenosine monophosphate-activated protein kinase</i> : protein-kinaza aktivirana adenoznin-monofosfatom
<b>APOE</b>	-	apolipoprotein E
<b>APP</b>	-	<i>amyloid precursor protein</i> : protein prekursor amiloida
<b>Aβ</b>	-	amiloid beta
<b>Aβ42</b>	-	amiloid β 1-42
<b>CaMKII</b>	-	kinaza 2 ovisna o kalmodulinu
<b>cAMP-PKA</b>	-	protein-kinaza ovisna o cikličnom AMP-u
<b>CDK5</b>	-	<i>cyclin dependent kinase 5</i> : kinaza ovisna o ciklinu 5
<b>ChAT</b>	-	<i>choline acetyltransferase</i> : kolin-acetiltransferaza
<b>fAB</b>	-	familijarna Alzheimerova bolest
<b>FDG- PET</b>	-	<i>18F-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography</i> : pozitronska emisijska tomografija s 18-fluorodeoksiglukozom
<b>GABA</b>	-	gama-aminomaslačna kiselina
<b>GAPDH</b>	-	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza
<b>GC</b>	-	glukokortikoidi
<b>GFAP</b>	-	<i>glial fibrillary acidic protein</i> : kiseli vlaknasti protein glije
<b>GLP-1</b>	-	<i>glucagon-like peptide 1</i> : peptid 1 sličan glukagonu

<b>GLUT</b>	-	nosač glukoze
<b>GSK3<math>\beta</math></b>	-	<i>glycogen synthase kinase 3 beta</i> : glikogen-sintaza-kinaza-3 beta
<b>HCY</b>	-	homocistein
<b>HDR</b>	-	<i>homology directed repair</i> : homologno usmjerena rekombinacija
<b>HPA</b>	-	<i>hypothalamic-pituitary-adrenal axis</i> : hipotalamo-hipofizno-adrenalna os
<b>icv</b>	-	intracerebroventrikularno
<b>IDE</b>	-	<i>insulin-degrading enzyme</i> : enzim koji razgrađuje inzulin
<b>IGF</b>	-	<i>insulin-like growth factor</i> : faktor rasta sličan inzulinu
<b>ip</b>	-	intraperitonealno
<b>IR</b>	-	inzulinski receptor
<b>IRBS</b>	-	<i>insulin-resistant brain state</i> : središnja inzulinska rezistencija
<b>IRS</b>	-	<i>insulin receptor substrate</i> : supstrat inzulinskog receptora
<b>iv</b>	-	intravenski
<b>JNK</b>	-	c-jun aminoterminalna kinaza
<b>KMB</b>	-	krvno-moždana barijera
<b>LTP</b>	-	<i>long-term potentiation</i> : dugoročna potencijacija
<b>MAP</b>	-	<i>microtubule-associated proteins</i> : proteini vezani uz mikrotubule
<b>MAPK</b>	-	<i>mitogen-activated protein kinase</i> : proteinska kinaza aktivirana mitogenom
<b>MCI</b>	-	<i>mild cognitive impairment</i> : blago kognitivno oštećenje
<b>MDA</b>	-	malondialdehid
<b>NAD</b>	-	nikotinamid-adenin-dinukleotid
<b>NFT</b>	-	<i>neurofibrillary tangles</i> : neurofibrilarni snopići
<b>NMDA</b>	-	N-metil-D-aspartatna kiselina
<b>NOS</b>	-	<i>nitric oxide synthase</i> : sintaza dušikovog oksida



<b>OKA</b>	-	okadaična kiselina
<b>p25, p35</b>	-	neuron specifični aktivatori enzima CDK5
<b>PHF</b>	-	<i>paired helical filaments</i> : spareni helikalni filamenti
<b>PI-3K</b>	-	fosfatidil-inozitol-3 kinaza
<b>PIB- PET</b>	-	C11- <i>Pittsburgh compound B</i> pozitronska emisijska tomografija
<b>PKA</b>	-	protein-kinaza A
<b>PKC</b>	-	protein-kinaza C
<b>PN</b>	-	<i>proteostasis network</i> : mreža proteostaza
<b>PP2A</b>	-	<i>protein phosphatase 2A</i> : protein fosfataza 2A
<b>PSEN</b>	-	presenilin
<b>ROS</b>	-	reaktivne oksidativne vrste
<b>sAB</b>	-	sporadična Alzheimerova bolest
<b>SDS- PAGE</b>	-	natrij-dodecil-sulfat-poliakrilamidna gel elektroforeza
<b>SOD</b>	-	superoksid-dismutaza
<b>STZ</b>	-	streptozotocin
<b>SŽS</b>	-	središnji živčani sustav
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	-	<i>tumor necrosis factor alpha</i> : čimbenik nekroze tumora alfa
<b>XOD</b>	-	<i>xanthine oxidase enzyme</i> : ksantin-oksidaza

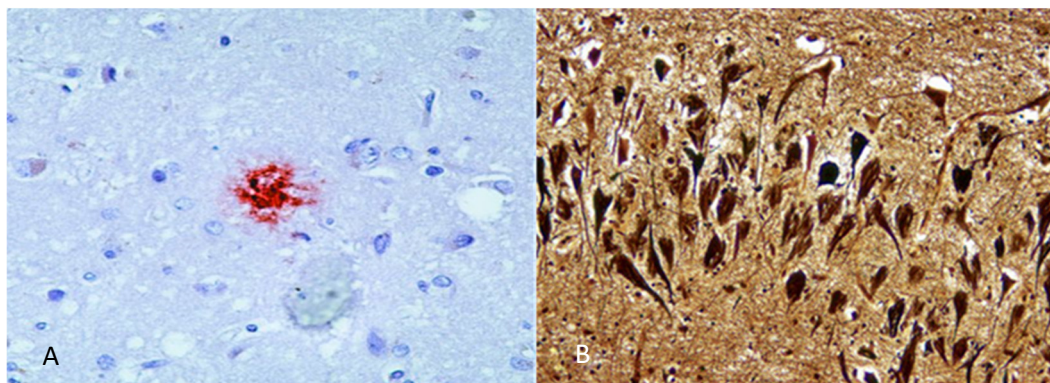
# 1. UVOD

## 1.1. ALZHEIMEROVA BOLEST

Alzheimerova bolest (AB) je neurodegenerativna bolest obilježena oštećenjem kognicije i ponašanja, koja značajno utječe na društveno funkcioniranje. Najčešći je uzrok demencije, a naziv je dobila po njemačkom neurologu dr. Aloisu Alzheimeru koji ju je prvi definirao 1906. g. (1). Bolest je neizlječiva, s dugim pretkliničkim razdobljem i progresivnim tijekom, koja do smrtnog ishoda dovodi za 3 do 9 godina nakon postavljanja dijagnoze (2). Prema dostupnim podacima iz 2019.g., od AB-a u svijetu boluje 50 milijuna ljudi (3). Procjenjuje se da u Hrvatskoj od demencije boluje oko 86 000 ljudi, od kojih velika većina od AB-a ([www.hzjz.hr](http://www.hzjz.hr)). Svjetska zdravstvena organizacija (*World health organisation- WHO*) je 2012. g. proglasila AB svjetskim javnozdravstvenim prioritetom, a po procjenama bi do 2050. g. s obzirom na starenje stanovništva, broj oboljelih u svijetu mogao narasti i na više od 115 milijuna (4). Radi se o velikom zdravstvenom i socioekonomskom problemu, jer je starenje glavni rizični čimbenik za razvoj bolesti (5).

### 1.1.1. Patofiziologija

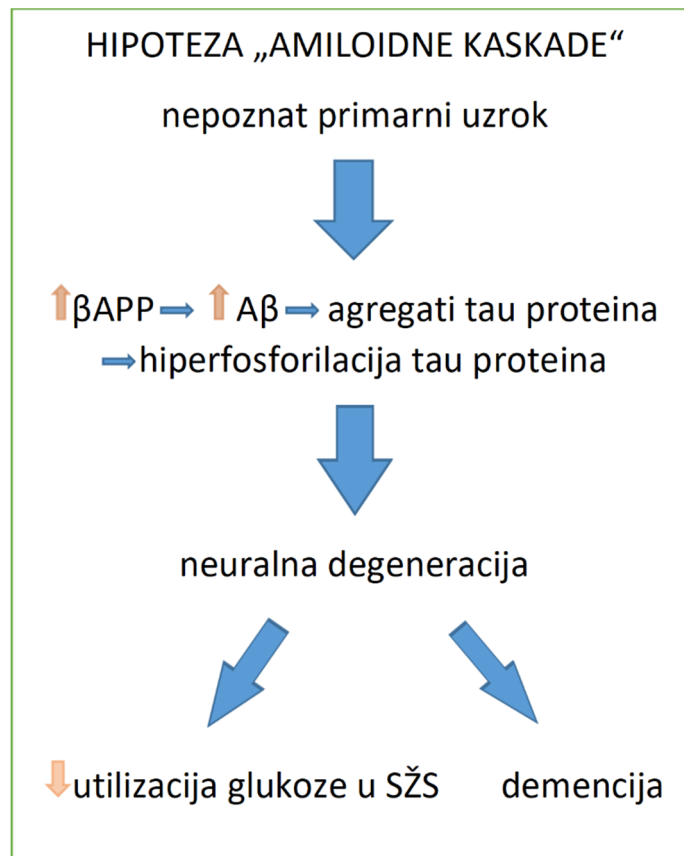
Glavna neuropatološka obilježja AB-a su abnormalno nakupljanje proteina amiloida beta ( $A\beta$ ) izvanstanično u obliku senilnih plakova i u stijenci krvnih žila kao cerebralna amiloidna angiopatija, zatim unutarstanično nakupljanje hiperfosforiliranog protein taua u neurofibrilarne snopiće (*neurofibrillary tangles* – NFT) te gubitak neurona i sinapsi koji uzrokuju izraženu atrofiju mozga (6). Definitivna dijagnoza AB-a može se postaviti samo *post mortem* histološkim pregledom mozga (5,6) (Slika 1). S obzirom na to da je bolest sporo progresivna, a lezije u mozgu se nakupljaju tijekom dugog vremenskog razdoblja, nije poznato koliko je dugo potrebno prije nego li neuropatološko oštećenje dovede do funkcionalnog oštećenja koje se može klinički dijagnosticirati. Za pretpostaviti je da progresivno nakupljanje spomenutih lezija traje godinama i prethodi početku simptoma te je uzrok daljnjoj kliničkoj progresiji (6).



**Slika 1.** Senilni plak prikazan pomoću A $\beta$ 1-42 imunohistokemijske metode (A) (preuzeto s <http://www.pierce-antibodies.com>) i neurofibrilarni snopići (NFT) obojani metodom Bielschowsky (B) (preuzeto s <http://neuropathology-web.org>)

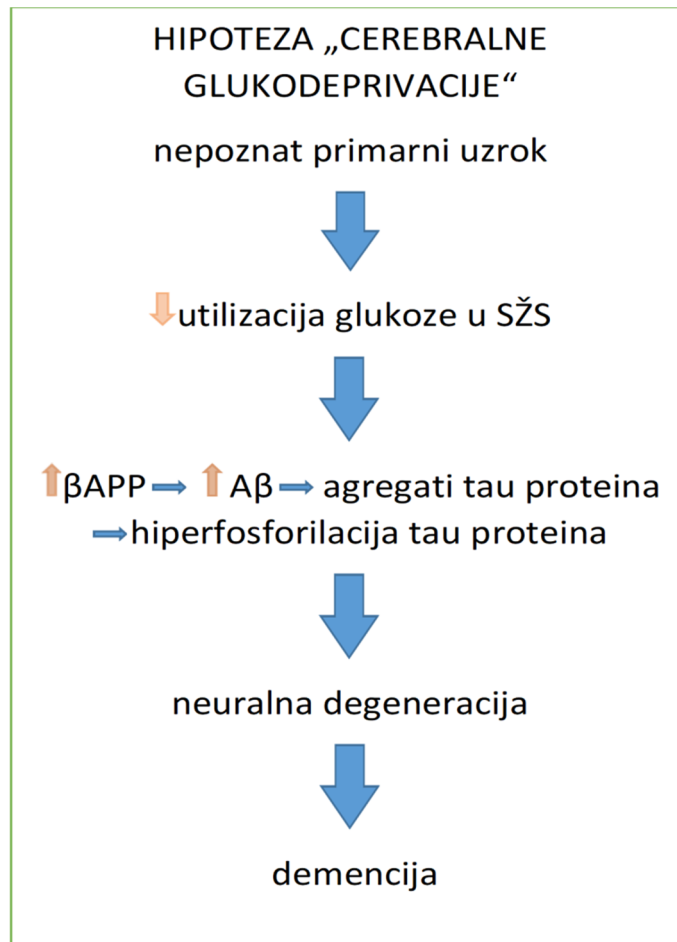
U manjem broju slučajeva (manje od 5%) AB je uzrokovana je mutacijom gena presenilin 1 ili 2 na kromosomu 14 i 1, ili mutacijom gena amiloidnog prekursorskog proteina (APP) na kromosomu 21, što uzrokuje familijarni oblik AB-a s ranim nastankom koji se prenosi autosomno dominantno (fAB, ili *early onset AD- EOAD*). U većem broju slučajeva (više od 95%), bolest je sporadična i kasnog nastanka (sAB, ili *late onset AD- LOAD*) te nema dokazanih mutacija gena vezanih za nakupljanje A $\beta$ , već su kao rizični čimbenici poznati starenje i postojanje određenih gena (npr. apolipoprotein E e4- APOE e4), koji se povezuju uz nastanak bolesti (7). Etiopatogeza sAB-a nije poznata, a u literaturi su prisutne različite hipoteze o nastanku ovog oblika bolesti (5).

Među najzastupljenijim hipotezama koje dominiraju više od 30 godina su amiloidna i tau hipoteza. Prema amiloidnoj hipotezi je pretjerano stvaranje A $\beta$  serijskim cijepanjem APP putem beta i gama sekretaze ključni patološki događaj koji pokreće sve ostale patološke promjene: astrocitozu, aktivaciju mikroglije, smrt neurona, gubitak sinapsi, razvoj NFT-a i demencije; i to ne samo kod fAB nego i kod mnogo češćeg sAB oblika (8) (Slika 2). Od ostalih hipoteza o nastanku AB-a, dominirale su još i „kolinergična hipoteza“ tijekom 1970-ih te „kalcijeva hipoteza“ kasnih 1980-ih godina (9,10).



**Slika 2.** Slijed događaja pretpostavljen u hipotezi „amiloidne kaskade“.βAPP- prekursor proteina amiloida beta; Aβ- amiloid beta; SŽS- središnji živčani sustav (prilagođeno prema (11))

U novije se vrijeme sAB sve više razmatra kao metabolički poremećaj mozga (12–14) sa smanjenim metabolizmom glukoze kao središnjim događajem i smanjenim energetske statusom u mozgu (7) kao posljedicom središnje inzulinske rezistencije (*insulin resistant brain state* - IRBS) (12,15,16), koji potom uzrokuje kaskadu događaja tijekom kojih se razvijaju senilni plakovi i NFT te konačno neurodegeneracija i demencija. Imajući u vidu analogiju s dijabetesom tipa 2, za AB je predložen i naziv dijabetes tipa 3 (17) (Slika 3), premda ovaj naziv nije u potpunosti primjenjiv zbog odsutnosti znakova sistemskog dijabetesa.

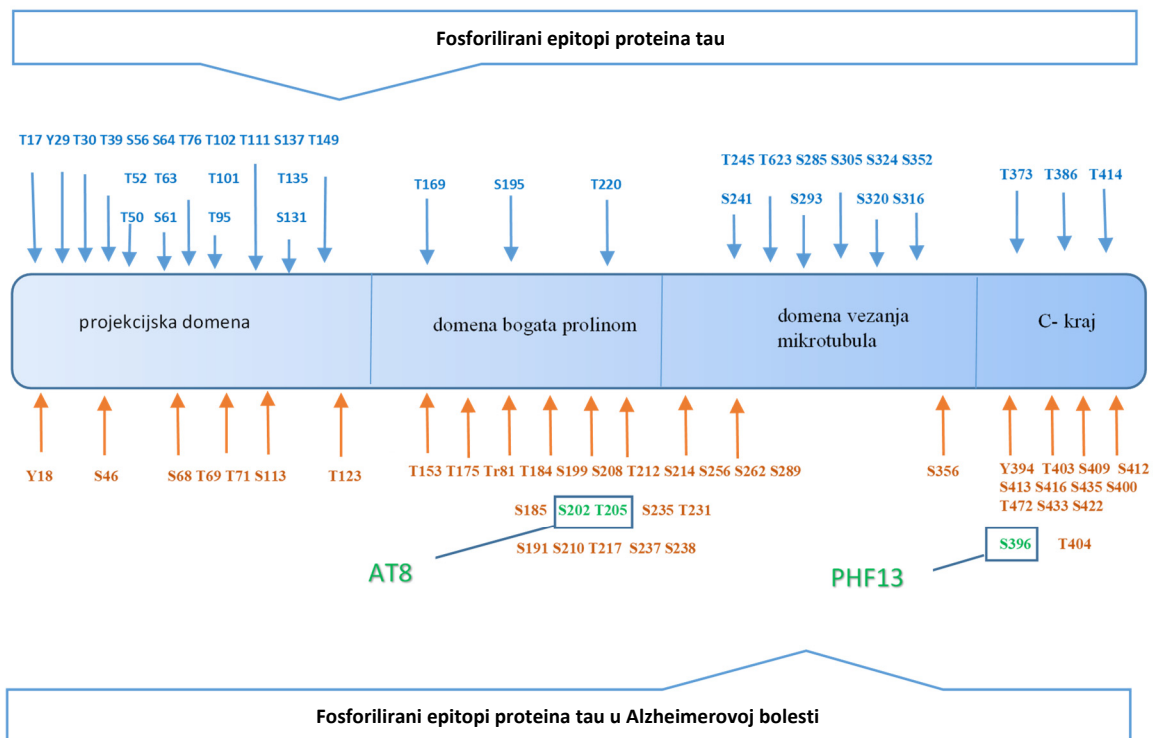


**Slika 3.** Slijed događaja kod „metaboličke“ hipoteze, odnosno hipoteze „cerebralne glukodeprivacije“.  $\beta$ APP- prekursor proteina amiloid beta;  $A\beta$ - amiloid beta; SŽS- središnji živčani sustav (prilagođeno prema (11))

### 1.1.2. Protein tau

NFT su abnormalne inkluzije u citoplazmi neurona, a danas se smatraju osnovnom mikroskopskom značajkom AB-a. Sastoje se od proteina tau, koji pripada grupi proteina povezanih s mikrotubulima (*microtubule-associated proteins* – MAP) (18,19). Tau (*tubulin associated unit*) protein je visoko topivi citoskeletni protein koji igra važnu ulogu u održavanju strukture neurona. Primarno je lokaliziran u aksonima i odgovoran je za nastajanje i stabilizaciju mikrotubula. Pospješuje procese poput aksonalnog transporta, sinaptogeneze, regulacije polimerizacije aktina, kontrole dinamike mitohondrija, čak i kontrole genske ekspresije, a također je uključen i u staničnu signalizaciju preko raznih posrednika te u popravljanju DNA što pridonosi pravilnom funkcioniranju neurona (10,20). Fosforilacija je glavni oblik modifikacije proteina tau (Slika 4). Fosforilacija mijenja oblik molekule i regulira njegovu biološku aktivnost te je ključna za njegovo uredno funkcioniranje. Tau može biti fosforiliran

od strane raznih protein-kinaza na mnogim mjestima, njih više od 80, od kojih je većina na mjestima aminokiselinskih ostataka serina i prolina (Ser-Pro) te treonina i prolina (Thr-Pro). Kinaze koje sudjeluju u fosforilaciji su glikogen-sintaza-kinaza 3 beta (GSK3 $\beta$ ), kinaza ovisna o ciklinu 5 (CDK5), c-Jun aminoterminalna kinaza (JNK), kinaza ovisna o kalmodulinu 2 (CaMKII), protein kinaza aktivirana adenzin monofosfatom (AMPK), protein kinaza ovisna o cikličnom AMP-u (cAMP-PKA), kazein kinaza tip jedan i druge (10,20). Kod poremećaja fosforilacije, pri patofiziološkim uvjetima, protein tau se hiperfosforilira, te se agregira u netopivu strukturu i nakuplja u stanicama. Hiperfosforilacija proteina tau oštećuje mogućnost spajanja na mikrotubule, smanjuje njegovu topivost i uzrokuje agregaciju u fibrilarne strukture poznate pod nazivom sparni helikalni filament (*paired helical filaments* – PHF), koje se skupljaju u visoko neurotoksične NFT-e, karakteristične za AB (20). PHF sadrže svih 6 tau izoformi u hiperfosforiliranom stanju (21). Takvi agregati proteina tau se mogu širiti među neuronima transsinaptički i time imati prionima slično ponašanje i tako širiti patologiju AB u ostale neurone (22). NFT u AB-u su lokalizirani u neuronima entorinalnog korteksa, hipokampusa, amigdale i dubljim slojevima neokorteksa (6,23), a proširenost i distribucija NFT-a korelira sa stupnjem demencije i trajanjem bolesti (6,24). Zašto su određeni neuroni skloniji nakupljanju fosforiliranog proteina tau i agregaciji, ostaje pitanje na koja će buduća istraživanja pokušati odgovoriti. Nekoliko čimbenika ukazuje na to da poremećaji proteina tau uzrokuju patologiju sinapsi: kognitivno propadanje korelira s gubitkom sinapsi, gubitak sinapsi usporedan je s formacijom NFT-a i zbiva se u istim regijama mozga u AB-u. S obzirom na to da distribucija i razina A $\beta$  nema puno značaja u stupnjevanju i progresiji AB-a kao ni u izraženosti simptoma bolesnika s AB-om, a distribucija NFT-a pokazuje korelaciju s kognitivnim propadanjem i oštećenjem pamćenja u AB-u, s vremenom je „tau hipoteza“ preuzela vodeće mjesto u odnosu na amiloidnu hipotezu nastanka AB-a. Zašto bolest počinje godinama prije pojave prvih simptoma nije jasno, ali rezultati dosadašnjih istraživanja sugeriraju da je razlog smanjena sposobnost uklanjanja patološkog, oligomeriziranog i agregiranog proteina taua, koja se pogoršava s vremenom (10).



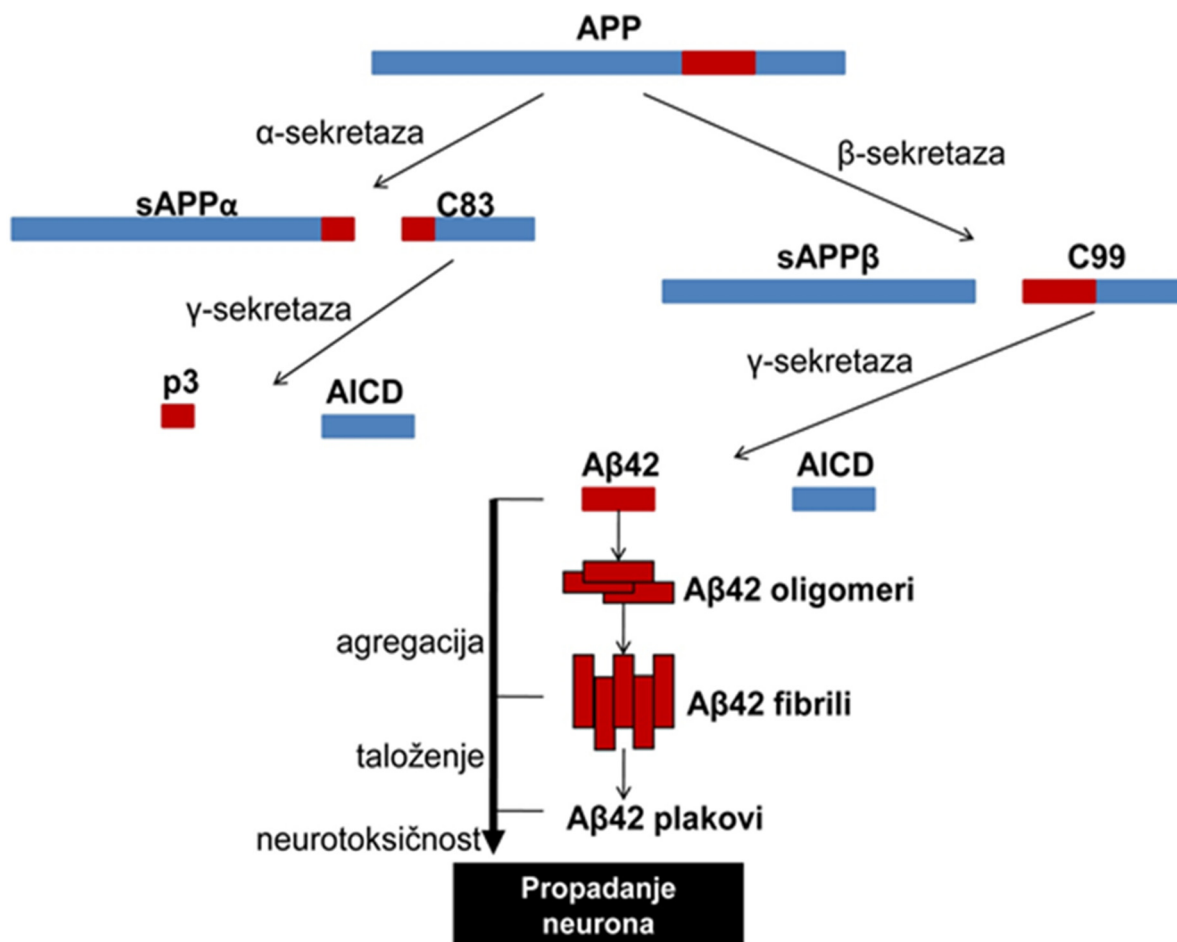
**Slika 4.** Mjesta fosforilacije proteina tau u zdravom mozgu i u mozgu oboljelih od Alzheimerove bolesti (AB). Crvenom bojom su označene aminokiseline fosforilirane u mozgu oboljelih od AB-a, a plavom bojom u zdravom mozgu. Protutijela specifična za fosfo- tau epitope koje smo ispitali u našim pokusima su naznačeni zelenom bojom- AT8 (Ser202, Thr205) i PHF13 (Ser396). (modificirano prema (10))

U zdravom mozgu su proteini pratioci ključni u obrani protiv patološkog nakupljanja neurotoksičnih proteina tako da ispravljaju abnormalne konformacije. Proteoliza, kao glavni dio mreže proteaza (*proteostasis network* - PN), visoko kompleksnog kontrolnog sustava ekspresije i funkcije proteina, putem dva glavna puta degradacije - sistem ubikvitin-proteazom i lizosomalni put autofagije - čisti agregirane proteine. Poznato je da aktivnost PN opada sa starenjem te da je oštećena u neurodegenerativnim bolestima (20,25). Fosforilacija protein taua na mjestima Ser202/Thr205 (AT8) je jedna od najranije zabilježenih u tau patologiji, u fazi prije formiranja neurofibrilarnih snopića i agregacije, dok je takav hiperfosforilirani tau još uvijek topiv i nalazi se u proksimalnom aksonu (26). Isto potvrđuju i nalazi u ranoj fazi blagog kognitivnog oštećenja (*mild cognitive impairment*- MCI), kad je samo AT8 imunoreaktivnost pronađena u entorinalnom korteksu i temporalnom izokorteksu (10).

### 1.1.3. Amiloid beta

Amiloidni ili senilni plakovi su kompleksne strukture koje se sastoje od središnje jezgre nakupljenog  $\beta$ A4 proteina okruženog krunom abnormalno formiranih neuralnih dijelova, uglavnom dendrita i aksona. Protein  $\beta$ A4 nastaje cijepanjem APP putem djelovanja dviju sekretaza na veći dio koji se sastoji od 42 ili 43 aminokiseline i ima tendenciju nakupljanja u senilne plakove (Slika 5) te kraći dio, koji ima 40 aminokiselina i ima tendenciju akumuliranja u krvne žile mozga. Takvi opsežni depoziti amiloida beta ( $A\beta$ ) u vaskulaturi uzrokuju fibrinoidnu nekrozu, mikroaneurizme i krvarenja, time i cerebralnu amiloidnu angiopatiju i oštećenje krvno-moždane barijere (KMB) (27). Amiloid se formira agregacijom monomernih proteina prekursora u oligomere koji su citotoksični i važni za patogenezu bolesti (28,29). Kako amiloidni fibrili rastu, mogu se fragmentirati stvarajući još više krajeva koji se ponovo produžavaju što rezultira eksponencijalnim rastom fibrila (30). Dalje inter- fibrilne interakcije vode do formiranja plakova i inkluzija karakterističnih za amiloidnu bolest (31). Amiloid djeluje citotoksično preko više različitih mehanizama, putem inhibicije proteosomalne degradacije, oštećenjem autofagije, perturbacije mitohondrijalne funkcije, stvaranjem reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) i sekvestracijom drugih proteina, a novi dokazi pokazuju i da unutarstanične inkluzije amiloida interferiraju sa staničnom fiziologijom, npr. ometaju transport proteina (32–35). Što je najvažnije, razina kognitivnog oštećenja u pacijenata s AB-om ne korelira s formacijom plakova, što sugerira da su možda pre-amiloidni agregati poput oligomera važni za patofiziologiju bolesti (36,37). Moderne tehnologije su omogućile mjerenje i praćenje nakupljanja amiloida *in vivo* u pacijenata s početnim kognitivnim oštećenjem, pa su tako studije provedene s *C11-Pittsburgh compound B* pozitronskom emisijskom tomografijom (PIB-PET) pokazale da nakupljanje amiloida doseže plato u kasnoj fazi MCI-a i da ne raste tijekom AB-a kako bismo očekivali s obzirom da kognitivna deterioracija nezaustavljivo napreduje (38). Zanimljiva opažanja koja su rezultirala pažljivim neuropatološkim pregledom *post mortem* mozgova ljudi oboljelih od AB-a su da amiloidni depoziti ne koreliraju dobro s kognitivnim propadanjem tijekom života, odnosno da kognitivno propadanje visoko korelira s gubitkom sinapsi (12,39). Difuzni plakovi se često nađu u velikom broju u mozgu starijih zdravih osoba koje nemaju znakove demencije (6,40). U mozgu pacijenata oboljelih od AB-a nalazi se značajan gubitak sinapsi, od čak 45% u odnosu na zdravu populaciju, te se smatra da je taj gubitak komunikacije među neuronima glavno morfološko obilježje koje odgovara kognitivnom propadanju (41,42).





**Slika 5.** Cijepanjem amiloidnog prekursorškog proteina (APP) s  $\alpha$  ili  $\beta$  sekretazom nastaju solubilni (s) APP $\alpha$  i APP $\beta$ , te C-terminalni segmenti C83 i C99. C83 i C99 fragmenti koji su vezani za membranu dalje podliježu razgradnji  $\gamma$ -sekretazom, te dolazi do nastajanja unutarstanične domene amiloidnog prekursorškog proteina (*amyloid intracellular domain* - AICD) i p3 peptida ili amiloid beta (A $\beta$ ) peptida koji agregira u oligomere i fibrile i nakuplja se u plakove (preuzeto iz (273)).

#### 1.1.4. Kolinergični sustav u Alzheimerovoj bolesti

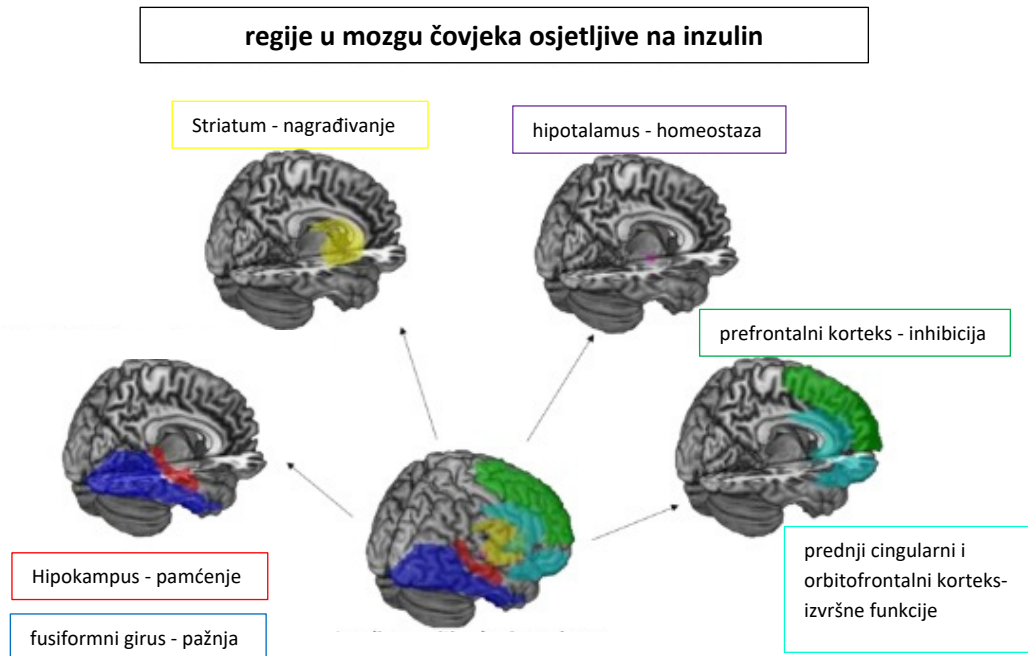
Poremećaj kolinergične transmisije jedan od najjasnije nađenih poremećaja neurotransmisije u AB-u i opsežno istražen. 1970-ih godina otkriveno je da u pacijenata oboljelih od AB-a postoji gubitak kolin-acetiltransferaze (ChAT) u Meynertovim bazalnim jezgrama (9), te da postoji poremećaj acetilkolinesteraze (AChE) (43). Korelacija između gubitka kolinergičnih neurona, poremećaja neurotransmisije i kognitivnog deficita (44) dovela je do kolinergične hipoteze AB-a (45), što i nije neobično s obzirom na povezanost kolinergičnog sustava s učenjem i pamćenjem. Istraživanja pokazuju da kolinergični sustav djeluje u modulaciji dugoročnog povećanja sinaptičke transmisije (*Long term potentiation* - LTP), tipa sinaptičke plastičnosti koja je osnova procesa učenja i pamćenja (46,47). U transgeničnih miševa s pretjeranom

ekspresijom AChE izražena je progresivna kognitivna deterioracija (48,49). Postupci koji smanjuju razinu acetilkolina (ACh) u hipokampusu štakora uzrokuju poremećaj pamćenja, dok lijekovi koji pospješuju pamćenje ujedno i povećavaju razinu ACh (50). Gubitak kolinergičnih neurona u mozgu dovodi do poremećaja neurotransmisije i jedan je od glavnih uzroka kognitivnog oštećenja u pacijenata s AB-om (51). Glavna funkcija AChE je da brzo hidrolizira ACh u kolin i acetatni ion na kolinergičnim sinapsama (52). U skladu s tim saznanjima i nastojanjima da se poveća kolinergična transmisija, došlo je do razvoja AChE inhibitora kao potencijalnih lijekova za AB, koji su do danas najkorišteniji i uz memantin jedini lijekovi odobreni u indikaciji AB-a, uz ograničeno djelovanje na simptome, ali bez učinka na tijek i napredovanje bolesti (53). AChE ima i ne-kolinergičnu ulogu u AB-u, naime, najveća aktivnost AChE je pronađena uz amiloidne plakove, a potiče i agregaciju A $\beta$  i formiranje senilnih plakova (54,55). Kolinergični deficit nije povezan s ranim, već s kasnijim stadijima AB-a, kad je pad aktivnosti ChAT-a u vezi s količinom senilnih plakova i NFT-a (56).

## 1.2. INZULINSKI SUSTAV U MOZGU

Dugo se vremena smatralo kako je mozak organ neosjetljiv na inzulin. Razlog tome su ranija istraživanja koja pokazuju da metabolizam u mozgu počiva na glukozi na čiju iskoristivost inzulin nema značajan učinak (57). Intrigantna povezanost između dijabetesa i AB-a je inicijalno zabilježena u Rotterdamskoj studiji koja je pokazala povećani rizik od demencije u bolesnika s dijabetesom (58). Novija istraživanja pokazuju da bi promjene u mozgu u AB-u mogle odgovarati specifičnom obliku dijabetesa. Mozak oboljelih od AB-a pokazuje poremećenu signalizaciju inzulina, promijenjene i aberantne aktivacije inzulinskog signalnog puta i smanjen odgovor na inzulin (12). Pacijenti s AB-om tipično pokazuju smanjenu iskoristivost glukoze u parijetotemporalnom i frontalnom korteksu te hipokampusu mjerenu pozitronskom emisijskom tomografijom (PET) uz pomoć 18-fluorodeoksiglukoze (FDG-PET) (59,60). S obzirom na to da ATP nastaje metaboliziranjem glukoze, jasno je da je neometano funkcioniranje ovog procesa u mozgu od središnjeg značaja za fiziološke stanične i molekularne reakcije (7). Podrijetlo inzulina u mozgu je dvojako; veći se dio odnosi na cirkulirajući inzulin koji se stvara u gušterači i prelazi KMB, a manji dio na neuronalni inzulin koji se stvara u mozgu. Distribucija inzulinske mRNA u mozgu je visoko regionalno specifična - piramidalni neuroni u hipokampusu i prefrontalnom korteksu, entorinalnom korteksu,

talamusu i olfaktornom bulbusu (61). Inzulinski receptor (IR) je također raspoređen u mozgu u sličnom, visoko regionalno specifičnom obrascu - olfaktorni bulbus, hipotalamus, cerebralni korteks, hipokampus (62–64) (Slika 6).

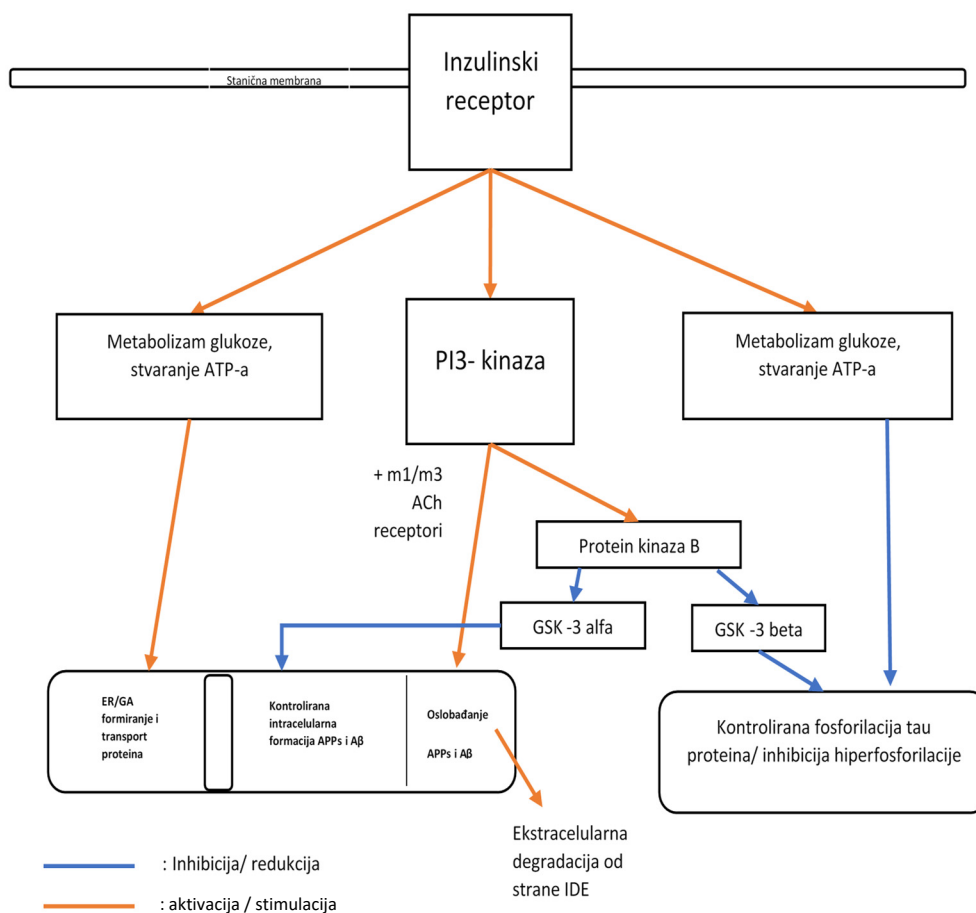


**Slika 6.** Regije ljudskog mozga osjetljive na inzulin i njihove funkcije pokazane anatomski. Moderne *neuroimaging* studije su otkrile značajni odgovor induciran inzulinom, najizraženije u fusiformnom girusu (plavo), hipokampusu (crveno), prefrontalnom korteksu (zeleno i cijan), striatumu (žuto) i hipotalamusu (ljubičasto). (Preuzeto i modificirano prema (65))

Neuronalni IR, za razliku od IR na periferiji, ne podliježe regulaciji nakon izlaganja velikim koncentracijama inzulina (66). Nakon aktivacije inzulinom IR fosforilira razne unutarstanične supstrate koji vode do aktivacije dva glavna signalna puta, fosfatidilinozitol-3-kinaze (PI3K) i protein-kinaze aktivirane mitogenom (MAPK). GSK3 $\beta$  izoforma koja je u kaskadi signalnog puta PI3K, ima važnu ulogu u regulaciji fosforilacije proteina tau, kontrolirajući time njegovu fiziološku ulogu u homeostazi mikrotubula. Sekrecija APP-a iz unutarstaničnog u izvanstanični prostor te inhibicija njegove degradacije od strane enzima koji razgrađuje inzulin (*insulin degrading enzyme* - IDE) je posredovana inzulinom i aktivnošću tirozin-kinaze IR (7,67). IDE je glavni solubilni enzim koji razgrađuje A $\beta$ , djeluje kao „amiloidaza“, sprečavajući

izvanstanično nakupljanje amiloida (7,68). Poveznica između inzulina i A $\beta$  u mozgu je predmet intenzivnih istraživanja zadnjih 30-ak godina. Ne samo da se inzulin natječe s A $\beta$  za razgradnju putem istog enzima proteaze - IDE, već utječe i na uklanjanje A $\beta$ , također preko IDE ali i preko GSK3 $\alpha$ , čija pojačana aktivnost dovodi do nakupljanja A $\beta$  (69) i preko drugih, kompleksnijih mehanizama sekrecije A $\beta$  (67). Pokazalo se da inzulin može spriječiti patološko spajanje A $\beta$  (70) i smanjiti nakupljanje A $\beta$  te poboljšati kognitivne funkcije u pacijenata s AB-om (71). Povrh toga, interakcija inzulin - amiloid je dvosmjerna, A $\beta$  reducira vezanje inzulina za IR smanjujući afinitet njegovog vezanja, što dovodi do smanjenja autofosforilacije receptora (72) i tako uzrokuje poremećaj prijenosa inzulinskog signala. Inzulin također djeluje na kontroliranu fosforilaciju, odnosno inhibiciju hiperfosforilacije protein taua preko aktivacije GSK3 $\beta$ . Povećana aktivnost GSK3 $\beta$  nađena u hipokampusu AB pacijenata je vjerojatno posljedica smanjene aktivnosti signalnog puta IR koja je nađena u istoj regiji (17) (Slika7).

Kako inzulin djeluje na moždane funkcije? Ima nekoliko poznatih mehanizama, za sada je najbolje objašnjeni učinak putem regulacije metabolizma glukoze, potom interakcija inzulina s A $\beta$  te učinak na fosforilaciju proteina tau. Inzulin uzrokuje translokaciju nosača za glukozu 4 (GLUT4) na površinu stanica neurona te tako povećava unos glukoze u stanicu i time njenu iskoristivost (73). Koekspresija IR i GLUT4 nađena je u mozgu, posebno u hipokampusu (74). Primjena egzogenog inzulina intracerebralno u hipokampus u štakora povećava metabolizam glukoze i poboljšava kognitivne funkcije (75), pružajući dodatnu energiju kad je potrebna, npr. kod povećane aktivnosti neurona pri formiranju memorije. Putem aktivacije PI3K signalnog puta inzulin može promijeniti sinaptičku plastičnost utječući na LTP preko regulacije AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksiazolepropionična kiselina) i NMDA (N-metil-D-aspartatna kiselina) receptora tako da, ne samo omogućava dodatno gorivo za neurone, nego i modulira njihovo izbijanje i time pojačava formiranje memorije (76). Inzulin također regulira i translokaciju GABA (gama-aminomaslačna kiselina) receptora u staničnoj membrani, pa je tako ekscitatorna i inhibitorna akutna neurotransmisija, isto kao i dugotrajna plastičnost, pod direktnom regulacijom inzulina (77,78).



**Slika 7.** Shematski pregled stvaranja ATP pod kontrolom inzulinskog receptora i metabolizma APP uključujući stvaranje APP-a i A $\beta$ , te formacije fosforiliranog protein taua. PI3 kinaza: fosfatidilinozitol-3 kinaza; GSK: glikogen-sintaza-kinaza; APPs: izlučeni oblik APP-a; ER: endoplazmatski retikulum; GA: Golgijev aparat; IDE: enzim koji razgrađuje inzulini; m1/m3 ACh: muskarinski acetilkolinški receptori (prilagođeno prema (7))

S obzirom na to da je inzulini hormon rasta, a i da je inzulinski čimbenik rasta 1 (IGF-1) inače poznati regulator hipokampalne neurogeneze (79), prirodno je zaključiti da je inzulini direktini regulator neurogeneze u hipokampusu. Stoga se smatra da je inzulinski signalni put, putem regulacije metabolizma glukoze i neuralnog izbivanja, vitalan za procese pamćenja (57,78). Davanje egzogenog inzulina intranazalno dovelo je u ljudi do poboljšanja kognitivnih funkcija, prostorne i radne memorije (80,81), dok je blokiranje intrahipokampalnog inzulina u mozgu štakora uzrokovalo veliko oštećenje pamćenja (78). Inzulini injiciran intracerebroventrikularno (icv) pokazuje akutni stimulirajući učinak na moždanu piruvat-dehidrogenazu i ChAT, što upućuje da je oksigenacija piruvata u mozgu stimulirana inzulinom, dok inhibicija neuralnog IR uzrokuje brojne poremećaje metabolizma oksidativne energije i oštećenje aferentne kolinergične transmisije. Smanjena aktivnost piruvat dehidrogenaze rezultira smanjenjem razine acetil-koenzima A i zajedno s oštećenom aktivnošću ChAT dovodi do značajnog

smanjenja sinteze ACh u presinaptičkim neuronima (82). Degeneracija kolinergičnog sustava u korteksu korelira s progresijom mentalnog propadanja u AB pacijenata (7,83).

Jasno je da je djelovanje inzulina važno za fiziološke moždane funkcije i memoriju. IR i komponente njegova kaskadnog signalnog puta važni su akteri u formiranju memorije, učenju i sinaptičkoj plastičnosti (12,15,78,84,85). Od ranije je poznato da glukokortikoidi (GC) utječu na kognitivne funkcije uključujući procese pamćenja u hipokampusu. GC i inzulin djeluju suprotno, tako da inzulinska rezistencija u mozgu mijenja učinak GC-a i obrnuto. GC imaju ulogu u etiologiji inzulinske rezistencija u mozgu i kognitivnog deficita (78). GC i katekolamini uzrokuju desenzitizaciju IR inhibicijom fosforilacije tirozina ili serina (7,86). Izloženost kroničnom stresu uzrokuje poremećaj hipotalamo-hipofizno-adrenalne (HHA) osi koji potom vodi do pretjerane sinteze i sekrecije GC-a, kao npr. kortizola u ljudi, a kortikosterona u glodavaca, koji mogu uzrokovati poremećaj neuralne povezanosti, gubitak sinapsi i neuralnu atrofiju te time vode značajnoj promjeni moždane funkcije i doprinose razvoju i progresiji AB-a (87–89). Abnormalna fosforilacija protein tau moguća je posljedica oštećenja HHA osi, iako specifični stanični mehanizam u podlozi toga nije u potpunosti rasvijetljen (20). Nadalje, davanje GC-a je uzrokovalo centralnu inzulinsku rezistenciju u štakora i hiperfosforilaciju proteina tau (90), te je ubrzalo nakupljanje A $\beta$  u transgeničnih mišjih modela (91).

Uzimajući u obzir obilje dostupnih podataka može se zaključiti da je kognitivni deficit povezan s oštećenjem inzulinskog signalnog puta u mozgu te da su IRBS i hipometabolizam glukoze mogući središnji događaj u sAB. Hipometabolizam glukoze u mozgu nije potpuno razjašnjen, ali s obzirom da je do sada najranije izmjeren poremećaj povezan s AB-om (92) i prethodi kognitivnoj disfunkciji mnogo godina, izgleda da je prije uzrok nego posljedica neurodegeneracije (93,94). Većina ispitivanja potencijalnih terapija za AB je do danas neslavno propala prekidom istraživanja u različitim fazama nekliničkih i kliničkih studija (95), dok su terapijske strategije usmjerene na popravljavanje poremećaja inzulinske signalizacije u mozgu pokazale potencijalni uspjeh te se dalje istražuju njihove mogućnosti i opravdanost primjene (12,96).

### 1.3. ŽIVOTINJSKI MODELI ALZHEIMEROVE BOLESTI

Animalni modeli postali su nezaobilazni u istraživanjima etiologije i patomehanizma bolesti s obzirom na visoku kompleksnost AB i izazova koji predstavlja. Zbog nepoznavanja uzroka i kasne dijagnoze bolesti, davanje terapije je odgođeno, terapija je samo simptomatska te je i prognoza loša. Iako bi studije na oboljelima od sAB-a predstavljale najbolji mogući eksperimentalni pristup, to nije moguće zbog nepoznatog uzroka bolesti, dugog asimptomatskog tijeka, individualnih varijacija, nedostatka dobre neinvazivne dijagnostike itd. Za sada je, stoga, jedini mogući pristup istraživanju etiopatogeneze, nastanka i tijeka bolesti, uporaba animalnih modela AB-a. Pokusi na životinjama važni su za analiziranje molekularnih i staničnih procesa specifičnih za patologiju AB-a. Unazad više od 20 godina, dizajniranjem prvih transgeničnih modela, na tom je polju zabilježen veliki napredak, a modeli glodavaca pokazali su se kao najbolji instrument za istraživanje patomehanizama prisutnih u AB-u. Kako bi se odgovorilo na specifična pitanja, generiraju se novi modeli. Nakon što je model utemeljen za neku bolest često ga se koristi za istraživanje pojedinih patoloških supstrata primjećениh tijekom karakterizacije modela koji mogu biti preklapajuće obilježje za druge bolesti za koje model inicijalno nije dizajniran (97). Pitanje je, što uopće čini model dobrim? Odgovor u velikoj mjeri ovisi o konkretnom pitanju koje postavljamo - želimo li reproducirati biokemijske i histološke promjene na staničnoj razini, razlikovati oblike kognitivnog oštećenja ili regionalnu specifičnost i sl. Najbolji bi model trebao reproducirati maksimum obilježja prisutnih u humanoј AB, međutim, to nije moguće zbog razlika i osobitostima među vrstama. Nadalje, idealan model trebao bi biti stvoren na temelju mehanizma koji prethodi stvarnom procesu bolesti u ljudi. Do sada nije stvoren niti jedan životinjski model koji replicira sve patološke aspekte analogne AB-u u ljudi. Životinjski se modeli, općenito mogu podijeliti na spontane i inducirane. Inducirani modeli nastaju umjetnom manipulacijom poput kirurških zahvata, aplikacije nekog lijeka, tvari ili okolišnog čimbenika te genetske manipulacije, pa se s obzirom na način manipulacije inducirani modeli dalje mogu grubo podijeliti na transgenične i netransgenične modele. Neke životinjske vrste poput psa i majmuna spontano razvijaju AB patologiju starenjem, sa senilnim plakovima i tauopatijom (98), ali korištenja takvih vrsta je ograničeno zbog ekonomskih, etičkih i praktičnih razloga. Zbog toga su istraživanja AB-a uglavnom ovisna o induciranim modelima od kojih su velika većina transgenični modeli, koji su karakteristični za rijetki, nasljedni oblik bolesti (fAB) i koji se unatoč tome koriste kao jedini

modeli u istraživanju novih lijekova u farmaceutskoj industriji. Stoga razvoj modela za sporadični oblik bolesti predstavlja veliki izazov i ključan je za daljnje istraživanje AB-a. Miš (*Mus musculus*) je najčešće korištena vrsta za takve modele jer se lako uzgaja i genetski manipulira, uz jednostavno održavanje. Od ostalih kralježnjaka koriste se štakor (*Rattus norvegicus*), rijetko paklara (*Pteromyzon marinus*), zatim zebrica (*Danio rerio*) te od beskrležnjaka vinska mušica (*Drosophila melanogaster*) i nematod (*Caenorhabditis elegans*) (97). Od većih životinja to su svinja i ovca, primjerice, uspješan model napravljen je od transgenične svinje (99). Primati, poput rezus majmuna (*Macaca mulatta*), također se koriste kao model AB-a, ali je u ovih životinja tauopatija gotovo nepostojeća (100).

### 1.3.1. Transgenični modeli

Transgenični modeli su genetski modeli koji sadržavaju razne integracije genskih varijanti koje kodiraju proteine koji sudjeluju u patologiji AB-a (Tablica 1). Transgenični miš je najčešće korišten životinjski model AB i osnovni alat u istraživanju *in vivo* patofiziologije. Otkrićem sve većeg broja genetskih čimbenika faktora tijekom vremena je rastao i broj transgeničnih modela. Zajedničko obilježje transgeničnih mišjih modela AB-a je prekomjerna ekspresija transgena koje nose mutacije za fAB preko različitih promotora, radi se primarno o mutaciji gena za APP, PS1, PS2, apolipoprotein E (ApoE) i tau, povezanim s nastankom fAB (98).

Manipulacije gena se načelno provode na dva načina: modeli temeljeni na homolognoj rekombinaciji (*Homology – directed recombination* - HDR) su oni kod kojih su geni povezani s AB-om izbačeni - *knock out* (KO) modeli, ili ubačeni - *knock in* (KI) modeli, čime kontroliramo željene učinke pretjerane ekspresije gena ili prekida funkcije određenog gena. Najčešće korišteni transgenični mišji modeli, posebno oni s *APP*, *MAPT*, *BACE1*, *PSENI* i *PSEN2* mutacijama i njihova patološka obilježja prikazani su u Tablici 1 (101–104). Transgenični modeli imaju svoja ograničenja, a to je da rekapituliraju samo određen aspekt bolesti, ali imaju važnu ulogu u razumijevanju određenih gena i mutacija povezanih s fAB-om, dok je patologija sAB-a u ljudi i dalje ostala nedovoljno razjašnjena.



**Tablica 1.** Najčešće korišteni transgenični mišji AB modeli i njihova patološka obilježja.

Trangenični model	Mutacija gena	Amiloidni plakovi	P -tau	NFT	Gubitak stanica	Gubitak pamćenja	Vrijeme nastanka patologije
<b>PDAPP</b>	APP minigen, V717F mutacija	DA	DA	NE	NE	DA	6-8 mjeseci
<b>Tg2576</b>	APP Swe cDNA (695)	DA	DA	NE	NE	DA	9-11 mjeseci
<b>APP23</b>	APP Swe cDNA (751)	DA	DA	NE	DA	DA	6 mjeseci
<b>TgCRND8</b>	APP cDNA Swe i V717F mutacije	DA	NP	NE	NP	DA	3 mjeseca
<b>APPSwe TgC3-3</b>	APP cDNA (695) Swe	DA	NP	NP	NP	NP	18 mjeseci
<b>PSAPP</b>	Tg2576 i PSI M146L	DA	DA	NP	MALO	DA	6 mjeseci
<b>ALZ7</b>	4R tau	NE	DA	NE	NE	NP	-
<b>7TauTg</b>	3R tau	NE	DA	DA	NP	NP	18-20 mjeseci
<b>JNPL3</b>	4R P301L tau	NE	DA	DA	DA	DA	5 mjeseci
<b>pR5</b>	4R P301L tau	NE	DA	DA	DA	NP	8 mjeseci
<b>TAPP</b>	Tg2576x JNPL3	DA	DA	DA	NP	NP	6 mjeseci
<b>3xTg-AD</b>	APP (Swe), PS1 (M146V), tau (P301L)	DA	DA	DA	NP	NP	3 mjeseca

NP- nije poznato; Swe: švedska mutacija; P-tau: fosforilirani protein tau. NFT: neurofibrilarni snopići. (Prilagođeno prema (105)).

### 1.3.2. Netransgenični modeli

Netransgenični modeli predstavljaju skupinu induciranih modela kod kojih se pomoću primjene poznatih kemijskih, okolišnih i mehaničkih čimbenika u prethodno zdrave, genetski nepromijenjene životinje, pokušavaju razumjeti određeni aspekti sAB-a, poput okidača

patologije i etiopatogeneze te bolje objasniti priroda, tijek i progresija sAB u ljudi. Najveću skupinu čine modeli temeljeni na intracerebralnoj/intracerebroventrikularnoj primjeni lijeka, toksina ili neke druge kemijske tvari u mozak. Ovaj središnji način primjene ima nekoliko prednosti pred manipuliranjem genima - proces je jeftiniji i brži od uspostavljanja transgeničnih linija, ovisno o konkretnom mjestu primjene, učinak može biti lokaliziran, itd. Glavna je mana potencijalna invazivnost primjene intracerebralne injekcije zbog čega se ne može isključiti mogući učinak same traume zbog primjene tvari. Ovakvi modeli mogu se klasificirati ovisno o kemijskoj strukturi lijeka ili toksične tvari koja se daje, zatim prema načinu primjene (polagano-kroz duže vrijeme, jednokratno, višekratno i sl.), moždanoj regiji na koju djeluje, promjene koje uzrokuje itd. Netransgenični modeli AB-a su važni za proučavanje patogeneze sAB-a i traženje moguće terapijske strategije.

#### **1.3.2.1. Modeli vezani za amiloidnu patologiju**

Izravna intracerebralna primjena A $\beta$  u glodavaca dovodi do stvaranja amiloidnih plakova, poremećaja učenja i pamćenja, a razina oštećenja ovisi o vrsti A $\beta$  peptida koji se primjenjuje i mjestu u koje se injicira. Ovi su modeli temeljeni na amiloidnoj hipotezi i usmjereni na istraživanje A $\beta$  kao okidača za nastanak specifične AB patologije (106–108). Različiti viralni vektori, parvovirusi, adeno-povezani virusi su također korišteni za izazivanje uznapredovale ekspresije A $\beta$  u hipokampusu Wistar štakora i posljedično kognitivno propadanje (109). Unatoč vrijednim spoznajama dobivenim pomoću ovih modela, njihov je značaj ograničen obzirom na rastući broj literaturnih podataka koji dovode u sumnju ispravnost amiloidne hipoteze (110–112).

#### **1.3.2.2. Modeli vezani za tau patologiju**

Funkcija proteina tau regulirana je uravnoteženim djelovanjem nekoliko protein-kinaza i fosfataza te narušavanje ove ravnoteže može imati za posljedicu hiperfosforilaciju proteina tau koja dovodi do nastajanja NFT-a, jednog od najznačajnijih patoloških obilježja AB-a. Temeljem toga stvoreni su životinjski AB modeli koji produciraju hiperfosforilaciju protein taua aktivacijom protein-kinaza ili inhibicijom fosfataza (98).

Okadaična kiselina (OKA) je poznati inhibitor serin/treonin-protein-fosfataze, te uzrokuje hiperfosforilaciju neurofilamenata i poremećaj mikrotubula, kolinergični deficit i progresivno kognitivno propadanje (113). Od ostalih poznatih inhibitora fosfataze, u modelima se koristi još i kalikulin (114). *Wortmannin* je spoj koji atenuira protein-kinazu B (PKB) suprimirajući PI3K i tako smanjuje fosforilaciju GSK3 $\beta$ , čime dovodi do njene aktivacije. Primjena

wortmannina u lateralne moždane komore dovodi do hiperfosforilacije protein taua koja je najizraženija 12 sati nakon injektiranja, a poslije opada (115,116). Također uzrokuje i oksidativni stres, ali u manjoj mjeri nastajanje amiloida (115,116). Izoproterenol je aktivator protein-kinaze A, uzrokuje oštećenje pamćenja 48 sati nakon adiministracije bilateralno u hipokampus štakora (117,118). Kolhicin, inače poznati citotoksin, može uzrokovati tauopatiju djelujući direktno na polimerizaciju mikrotubula i stvaranja NFT (119). U ovih je modela također primijećena redukcija acetilkolinesteraze i aktivnosti kolin-acetiltransferaze (120,121). Razne studije su povezale visoke razine homocisteina (HCY) u serumu bolesnika s AB-om (122). Nije jasan točan mehanizam iza toga, ali primjena HCY u lateralne moždane komore štakora uzrokuje hiperfosforilaciju protein taua i oštećenje pamćenja (123). Hiperhomocisteinemija ima ulogu u regulaciji željeza, oksidativnom stresu i neurotoksičnom mehanizmu koji doprinosi AB, a može biti i posljedica deficijencije vitamina B12, B6 ili folata (124,125).

### **1.3.2.3. Modeli koji pokazuju ostale značajke Alzheimerove bolesti**

U suglasnosti s kolinergičnom hipotezom studije su pokazale da skopolamin, muskarinski kolinergični antagonist uzrokuje oštećenje pamćenja u modelu štakora i pasa (126). Jaka veza između aluminija (Al) u vodi i atmosferi i AB-a koju sugerira nekoliko studija je potakla korištenje aluminija za generiranje modela AB-a. Modeli u kojima su se aluminijeve soli – Al-sulfat i Al-maltolat davale životinjama (miš, zec) putem vode za pijenje ili injektiranjem u mozak, izazvale su oksidativni stres, depozite amiloida beta, amiloidnu angiopatiju i formiranje NFT, gubitak stanica i kognitivno propadanje (127,128). Od ostalih okolišnih čimbenika koji su povezani sa sAB-om, kao model se u obzir može uzeti i hipoksija, koja uzrokuje oštećenje i neurodegeneraciju na više načina - oštećenjem DNA, disfunkcijom mitohondrija, aktivacijom CDK5 i GSK3 $\beta$  koji su supstrati hiperfosforilacije tau (129). Kombinacije modela se također mogu koristiti za proučavanje različitih kombinacija patogenetskih mehanizama, ali se iste u praksi rijetko koriste zbog varijabilnosti rezultata (98).

### **1.3.3. Ostali modeli**

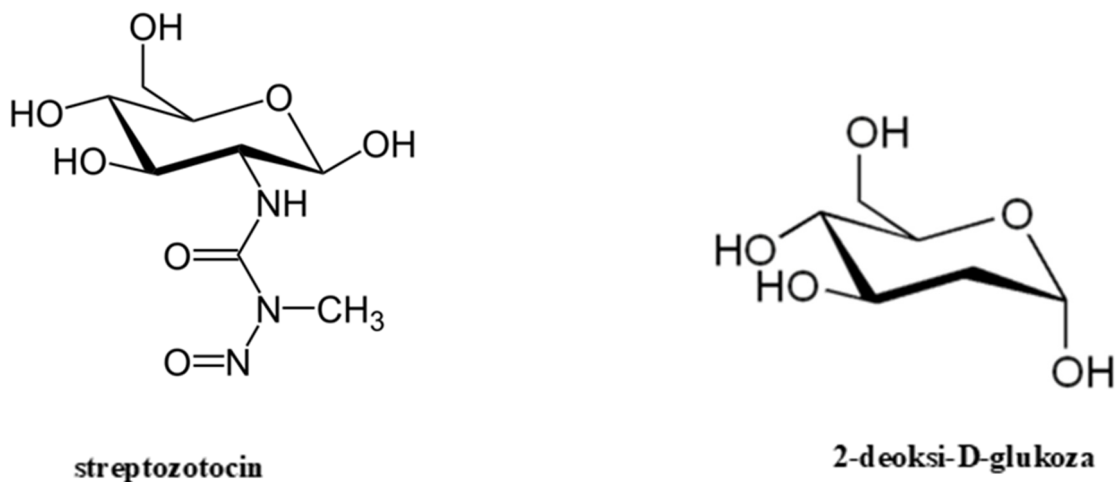
Napredak tehnologije je doveo do razvijanja novih modela poput mikročip organa, 3D printanih organoida i tkiva te naprednih kompjutorskih simulacija procesa bolesti. Razvoj induciranih pluripotentnih matičnih stanica (iPSCs) ljudskog podrijetla predstavlja novi translacijski alat koji obećava bolje razumijevanje razlike među vrstama u AB vezanoj patologiji (97).

### 1.3.4. Modeli s intracerebroventrikularnom primjenom streptozotocina

U skladu s hipotezom da je sAB „moždani“ oblik dijabetesa tipa 2 (15), te da je u mozgu pacijenata oboljelih od sAB-a postmortalno otkrivena središnja inzulinska rezistencija (16), predložen je novi netransgenični model koji bi predstavljao sAB (130,131). Model je razvijen intracerebroventrikularnom primjenom streptozotocina (STZ-icv) (132).

#### 1.3.4.1. Streptozotocin

Streptozotocin - STZ (2-deoksi-2-(3-(metil-3-nitroziureid)-D-glukopiranoza) je otkriven u soju mikroba *Streptomyces achromogenes*, izoliran 1950-ih. Derivat je nitrozoureje, inicijalno je razvijen kao antibiotik, a kasnije i kao citostatik (tvorničkog imena *Zanosar*®) za liječenje inzulinoma, tumora  $\beta$  - stanica gušterače koji luči prekomjerne količine inzulina (133). Danas se najviše koristi u prekliničkim istraživanjima, a dobiva se sintetskim putem. Molekularna struktura STZ-a slična je strukturi 2-deoksi-D-glukoze (Slika 8), a sličan je građom i nitrozaminima koji se dodaju hrani kao konzervansi (134).

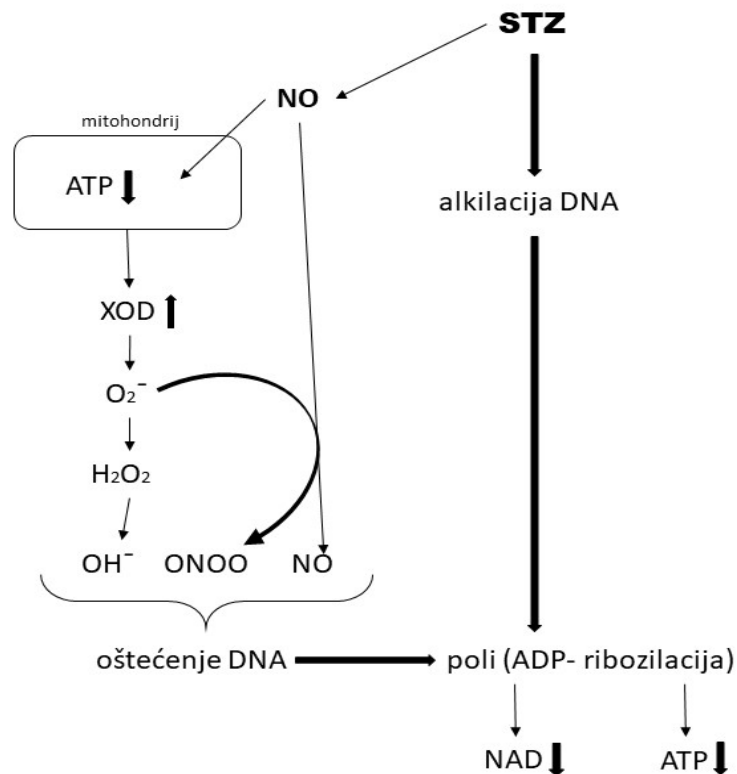


Slika 8. Kemijska struktura streptozotocina i 2- deoksi-D-glukoze (Prilagođeno prema (135))

#### 1.3.4.2. Mehanizam djelovanja streptozotocina

Intravenska (iv) ili intraperitonealna (ip) primjena STZ-a uzrokuje selektivnu toksičnost  $\beta$  stanica gušterače jer je STZ selektivni supstrat GLUT2 te ulazi u stanice na čijoj se membrani taj transporter nalazi. Predominantno su to  $\beta$  stanice gušterače, ali u manjoj količini jetra i bubreg (11,135). Unutar stanice STZ uzrokuje alkilaciju DNA što izaziva aktivaciju poli ADP-ribozilacije, a time dovodi do smanjenja stanične razine nikotinamid-adenin-dinukleotida

(NAD) i ATP-a, i kao posljedice toga, nekrozu i staničnu smrt (135) (Slika 9). S obzirom na to da je toksičan za stanice koje proizvode i izlučuju inzulin, u visokim jednokratnim dozama u životinja uzrokuje model za dijabetes melitus tipa 1, dok u višekratnim malim dozama uzrokuje model za dijabetes melitus tipa 2, tako da oštećuje autofosforilaciju IR i dovodi do promjene signalizacije IR (136). STZ ne prolazi KMB, stoga nema podataka o izravnom učinku periferno primijenjenog STZ-a na mozak.



**Slika 9.** Mehanizam toksičnog učinka STZ u  $\beta$  stanicama gušterače. XOD-ksantin-oksidaza; NAD-nikotinamid-adenin-dinukleotid (Prilagođeno prema(135))

### 1.3.4.3. Kognitivne, biokemijske i morfološke promjene uzrokovane intracerebroventrikularnom primjenom streptozotocina

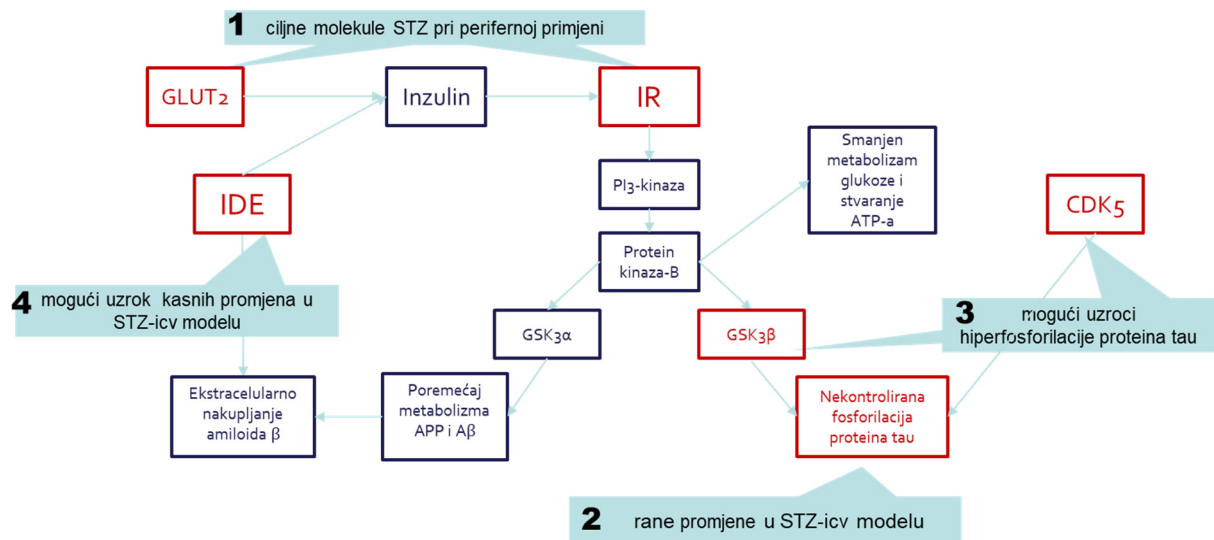
U dosadašnjim istraživanjima STZ-icv modela nađen je veći broj kognitivnih, neurokemijskih i strukturnih promjena u mozgu sličnih onima nađenim u bolesnika s AB-om: (a) deficit učenja i pamćenja (137), (b) smanjeni metabolizam glukoze i količina ATP-a (138), (c) poremećaji signalizacije inzulinskog receptora uključivo hiperfosforilacija proteina tau (139–141), (d) oksidativni stres (142), (e) astroglioza (143), (f) patološko nakupljanje A $\beta$  (144,145) i (g)

kolinergični deficit (145,146). Brojna istraživanja su pridonijela karakterizaciji ovog modela u štakora kao izvornog modela, a u posljednje vrijeme i u miševa (147,148), ali i majmuna (149). Mišji STZ-icv model se u istraživanjima počeo koristiti znatno kasnije, i u usporedbi sa štakorskim ima značajno manje publikacija, a dobiveni rezultati se međusobno uspoređuju bez provedenih komparativnih istraživanja među vrstama. Iz dostupne literature se može vidjeti da su nađene promjene među vrstama u načelu slične - poremećaj kognicije, IRBS, oksidativni stres, neuroinflamacija (150). Dosadašnja neurokemijska i histološka istraživanja bavila su se promjenama nastalim u mozgu glodavaca uglavnom u razdoblju dužem od 1 tjedna nakon STZ-icv primjene i vrlo rijetko u razdoblju duljem od 3 mjeseca nakon STZ-icv primjene (Tablica 2) (144,151). Središnja primjena STZ-a ne izaziva dijabetes melitus ali dolazi do nastanka IRBS-a. U dosadašnjim istraživanjima STZ je davan icv višekratno uglavnom u dozama u rasponu od 1-3 mg/kg tjelesne težine, uni- ili bi-lateralno u lateralne moždane komore. Identične biokemijske promjene nađene su u lijevom i desnom strijatumu štakora nakon primjene STZ samo u desnu lateralnu moždanu komoru (152–154). Mehanizam središnjeg djelovanja STZ-a i njegove ciljne stanice i molekule u mozgu nisu još u potpunosti razjašnjeni ali se smatra da bi mehanizam mogao biti sličan onom na periferiji, s obzirom na prisutnost i sintezu inzulina u mozgu te ekspresiju kako GLUT2, tako i IR u pojedinim regijama mozga (130,155,156). Kao što je ranije navedeno, STZ potiče stvaranje unutarstaničnih slobodnih radikala, NO i vodikovog peroksida te se nastajanje nitrozo-oksidativnog stresa (135) ne može isključiti u razmatranju patofizioloških promjena u mozgu, posebno onih nastalih neposredno, nekoliko sati nakon STZ-icv primjene.

**Tablica 2.** Literaturni podaci o značajanim neurokemijskim, strukturnim i kognitivnim promjenama u štakora i miša nakon intracerebroventrikularne primjene streptozotocina, povezanim s patologijom sporadične Alzheimerove bolesti

Vrijeme nakon STZ-icv primjene	ŠTAKOR	MIŠ
≤ 1 dan	-oštećenje radne memorije (157) -oštećenje inzulinskog receptora, astroglia (215)	<b>NIJE ISTRAŽENO</b>
1 dan-1 tjedan	-degenerativne promjene u hipokampusu (157) -povećan oksidativni stres (142) - oštećenje signalnog puta inzulinskog receptora (163)	-povećana aktivnost AChE (150) -povećan oksidativni stres (150) -neuroinflamacija i astroglia (150) -oštećenje pamćenja i učenja (150)
1 tjedan–2 tjedna	-oštećenje pamćenja i učenja (132,158) -smanjena aktivnost ChAT (151) -neuroinflamacija (131,159)	-izraženo anksiozno ponašanje (160) -oštećenje pamćenja (148)
2 tjedna–1 mjesec	-smanjeni metabolizam glukoze i energije (138) -smanjena aktivnost ChAT u hipokampusu (146) -povećana aktivnost AChE (161) -hiperfosforilacija protein taua (162,163) -povećan oksidativni stres (142) -oštećenje učenja i pamćenja (139,145) -poremećaj signalnog puta inzulinskog receptora (139,145,163) -ultrastrukturno poremećaj Golgi aparata (11) -gubitak neurona (159)	-hiperfosforilacija protein taua (147,148) -nakupljanje amiloida beta (148) -gubitak sinapsi (148) -povećana aktivnost AChE (164)
1 mjesec–3 mjeseca	-smanjena iskoristivost glukoze (165) -nakupljanje amiloida beta (145) -hiperfosforilacija protein taua (145) -kognitivna deterioracija (166) -povećan oksidativni stres (166) -astroglia (167) -oštećenje signalnog puta inzulinskog receptora (168)	-hiperfosforilacija proteina tau (147) -neuroinflamacija i astroglia (169) -oštećenje signalnog puta inzulinskog receptora (147,169) -nakupljanje amiloida beta (170)
>3 mjeseca	-oštećenje pamćenja (130) -smanjen energetskei metabolizam (ATP) (130) -poremećaj signalnog puta inzulinskog receptora(139) -nakupljanje amiloida beta (145) -hiperfosforilacija proteina tau (145)	-poremećaj signalnog puta inzulinskog receptora (171)

Metabolički poremećaji uzrokovani STZ-icv, prisutni su u velikom djelu mozga, uključujući područja udaljena od mjesta injiciranja i pogoršavaju se s vremenom. Pet tjedana nakon primjene STZ-icv u dozi od 3 mg/kg prisutna je atrofija, kognitivno propadanje, porast sadržaja hipokampalnog A $\beta$  i porast razine hipokampalnog i kortikalnog hiperfosforiliranog protein tau (166). STZ-icv također uzrokuje oksidativni stres, abnormalnosti mitohondrija, aktivaciju glija stanica, čimbenika tumorske nekroze-alfa TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor- alpha*), i stvaranje slobodnih radikala (172,173). U štakorskom STZ-icv modelu vidljive su bihevioralne i neurodegenerativne promjene u različitim vremenskim intervalima (11). U mozgu takvih štakora nađeni su poremećaji signalizacije IR, pretjerana aktivnost GSK3 $\beta$ , smanjena aktivnost glavnih transportera glukoze kao i povišena fosforilacija proteina tau. Sve ovo sugerira da bi značajna patološka podloga razvoja sAB-a u ljudi kao i u STZ-icv modelima glodavaca mogla biti upravo središnja inzulinska rezistencija (Slika 9).



**Slika 9.** Shema vjerojatnog djelovanja streptozotocina na ciljne molekule nakon icv primjene. Crvenom bojom su označeni parametri koje mjerimo u našem istraživanju. (STZ - streptozotocin; GLUT 2 – nosač za glukozu 2; IR - inzulinski receptor; IDE – enzim koji razgrađuje inzulin; GSK3 $\beta$ - glikogen-sintaza-kinaza-3 beta; CDK5- kinaza ovisna o ciklinu 5; A $\beta$ - amiloid beta; APP – protein perkursor amiloida).

### **Promjene inzulinskog sustava i metabolizma glukoze**

Najranije promjene u inzulinskom sustavu do sada istražene u STZ-icv modelima su bile od 2 tjedna i više nakon STZ-icv primjene u štakora (145,174), te više od mjesec dana u mišjem STZ-icv modelu (147). U štakorskom modelu nađena je smanjena ekspresija proteina IR i gena za IR, te gena za inzulin u hipokampusu i korteksu (140,174,175), a nakon 1 mjesec uočeno je povećanje aktivnosti GSK3 $\beta$  i povećanje ekspresije fosforiliranog proteina tau, koje je



najizraženije 9 mjeseci nakon STZ-icv (141,162,163). Također je nađeno smanjenje ekspresije IDE u mozgu štakora, čiji je supstrat, osim inzulina, i A $\beta$  (176,177). Dosadašnja istraživanja u našem laboratoriju pratila su promjene inzulinskog sustava u mozgu štakorskog STZ-icv modela nakon primjene doze od 3 mg/kg u raznim vremenskim točkama sve do 9 mjeseci (139,140,163), te je uočeno da postoji vremenska i regionalna specifičnost promjena. 1 mjesec nakon STZ-icv primjene u mozgu miša nađen je poremećaj fosforilacije u signalnom putu IR/PI3K uz pojačanu aktivnost GSK $\beta$  i hiperfosforilaciju protein taua (147).

STZ-icv dovodi do poremećaja metabolizma glukoze u mozgu štakora nakon 3-6 tjedana u vidu smanjene iskoristivosti glukoze u mozgu uz povišenu razinu glikogena, laktata i ADP-a (138,165,178). Smanjeni metabolizam glukoze moguća je posljedica inzulinske rezistencije, jer se nosač za glukozu GLUT4 usmjerava na staničnu membranu preko PI3K puta i Akt/PKB (179). Kako je glukoza glavni izvor energije za sve stanice u mozgu (180), nije neobično da su ovakve promjene nađene u pacijenata s sAB-om (181).

### ***Oksidativni stres, upalne i strukturne promjene***

Jedna od istaknutijih i do sada najranije uočenih abnormalnosti u STZ-icv modelima je neuroinflamacija, koja je u oba modela istražena već unutar tjedan dana od STZ-icv primjene. U tom ranom razdoblju do sada je u mozgu miša nakon STZ-icv primjene nađen povećan oksidativni stres, neuroinflamacija i astroglioza (150), a u mozgu štakora povećan oksidativni stres (142). STZ-icv primjena uzrokuje oksidativni stres stvaranjem ROS (*reactive oxygen species*) i otpuštanjem NO u mozgu (143). Nakon STZ-icv primjene nađen je smanjen oksidativni kapacitet u hipokampusu, cerebelumu i moždanom deblu štakora (182), a nađene su i značajno povišene koncentracije malondialdehida (MDA) i snižena razina glutaciona 1 i 8 tjedana nakon primjene STZ-icv (142,143,183,184), dok je razina nitrita i ROS-a povećana nakon 2 tjedna (185–189), što sve govori u prilog povećanom oksidativnom stresu. U mozgu miša su markeri oksidativnog stresa pokazali značajne promjene 5 dana nakon STZ-icv primjene (150).

Upalne promjene - neuroinflamacija je nakon STZ-icv primjene u mozgu štakora ispitivana i nađena najranije nakon 1 tjedna (131,159), kao povišena ekspresija kiselog vlaknastog proteina glije (GFAP), markera astroglioze, a nakon jedan mjesec u mozgu miša (147). Nakon primjene STZ-a dolazi i do strukturnih promjena nađenih primjenom histopatološke metode kao oštećenje aksona i mijelina u regijama mozga koje su odgovorne za učenje i pamćenje, poput hipokampusa (190). Ovakve patološke promjene nađene su i u mozgu oboljelih od AB (16).

### **1.3.5. Anatomske, neuroanatomske, bihevioralne i kognitivne razlike između miša i štakora, značajne za dizajniranje modela Alzheimerove bolesti**

Općenito gledajući u laboratorijskim pokusima se štakor manje koristi od miša, ali ima nekoliko prednosti pri proučavanju ljudskih bolesti. Štakor ima veći mozak, što invazivne postupke i operacije na mozgu čini lakšima. Također, štakori su lakši za rukovanje od miševa, jer se u njih manje razvija stres pod utjecajem ljudskog dodira te nemaju smetnje ponašanja koje nalazimo u miševa, poput agresivnosti, anksioznosti i slabije društvene interakcije (191). Štakori su, međutim, manje zastupljeni od miševa za generiranje transgeničnih životinja, uglavnom iz tehničkih razloga - teže je injicirati DNA. Prvi transgenični štakorski modeli su se pojavili tek 2004. godine za ekspresiju humanog APP. Zanimljivo, manje je štakorskih nego mišjih genetskih modela temeljenih na mutaciji protein taua, unatoč činjenici da u štakora, isto kao i u ljudi postoji 6 izoformi protein taua (192). Sličnost u tau izoformama između ljudi i štakora upućuje na viši stupanj sličnosti u formiranju NFT-a također, što sugerira da bi za istraživanje tau patologije štakorski model bio bolji odabir. Iako su jasne razlike između vrsta u patologiji kad se uspoređuju mišji i štakorski modeli za A $\beta$  (npr transgenični- APP, PSEN1 ili injiciranjem A $\beta$  icv), iste su slabo istražene. Generalno, čini se da je štakor otporniji na ovu vrstu patologije od miša, odnosno da se degeneracija odvija brže u miša nego štakora (97,193). Transgenični štakor (npr. Tg6590) ne razvija senilne plakove, dok ekvivalent mišjeg modela (Tg2576) razvija mnoge formacije plakova, a kognitivni deficiti su prisutni u oba modela, što dodatno postavlja sumnju u povezanost plakova i demencije (194,195). Štakori i miševi mogu pokazati dijametralno suprotne odgovore u osnovnim studijama kognicije, ovisnosti, impulzivnosti i društvenog ponašanja, te pokazati razlike u opsegu neurodegeneracije demonstrirajući značaj pri odabiranju najboljeg modela za humane bolesti (191) (Tablica 3). Miševi s genetskom delecijom neuronalnog IR pokazuju minimalno kognitivno oštećenje i gotovo nikakvu metaboličku alteraciju (78,196). Štakor i miš su različito osjetljivi na toksični učinak STZ-a na gušteraču. Zabilježena je intenzivnija toksičnost u štakora nego u miša (197), razlikuju se u razvoju upalnog odgovora, koji je slabiji i protrahan u miša (198) i oksidativnog stresa, jer mišji mozak stvara 50% više ROS-a nego štakorski (199). Uslijed različite veličine tijela i mozga, eksperimentalna lezija izazvana jednakom dozom apliciranom u istom volumenu (1.5 mg/kg u 2  $\mu$ l), zahvaća relativno veće područje mozga u miša. Stoga se ne može isključiti da STZ nakon icv primjene djeluje možda kvantitativno i/ili kvalitativno drugačije u mozgu miša nego u štakora. Stoga se ne može isključiti da su pojedine nekonzistentnosti u rezultatima

istraživanja štakorskog i mišjeg STZ-icv modela možda posljedica navedenih razlika između miša i štakora.

**Tablica 3.** Razlike između miša i štakora.

<b>Evolucija</b>	<b>Veličina</b>	<b>Ponašanje</b>	<b>Neuroanatomske razlike</b>	<b>Kognitivne razlike</b>
Paleontološke i molekularne studije pokazuju da je posljednji zajednički predak miša i štakora živio prije oko 20 mil. god, otprilike u isto vrijeme kad su se makaki majmuni odvojili od čovjekolikih majmuna (200)	Štakor je do 10x veće mase od miša	Miševi su agresivniji u ponašanju i branjenju teritorija (201)	Razlika u ekspresiji 4700 gena u hipokampalnim neuronima (od ukupno 18000 gena) između vrsta (199)	Miševi postižu lošije rezultate u kognitivnim testovima plivanja u labirintu te su manje prikladni za ispitivanje prostorne memorije (202)
	Veći mozak štakora je jednostavniji za rukovanje i provođenje neurokirurških postupaka (203)	Štakori su društveniji i više vremena provode u društvenoj interakciji od miševa (204)	Distribucija serotoninskih receptora (5-HT6) u strijatumu je puno manja u miša nego u štakora (205)	Miševi zahtijevaju više učenja i habituacije da obave iste zadatke kao štakori (206)
		Štakori pokazuju manje stresa pri ljudskom rukovanju, te su općenito manje anksiozni od miševa (207)	Razlika u neurogenezi u hipokampusu - kod štakora je i do deset puta brža tijekom učenja. (4)	Štakori su pogodniji za kognitivne testove jer pružaju konstantnije rezultate i manje su pod utjecajem nekognitivnih distrakotora (206)
			Najizraženije razlike među ovim vrstama su nađene u središnjem živčanom sustavu i endokrinološkom sustavu (191)	
			Mišiji mozak stvara 50% više ROS-a nego štakorski (199)	

## **2. HIPOTEZA**

Intracerebroventrikularna primjena streptozotocina unutar 24 sata dovodi do neurokemijskih i strukturnih promjena u mozgu čiji nastanak pokazuje vremensku (ranije promjene u signalnom putu inzulinskog receptora u odnosu na promjene ostalih sustava) i regionalnu (ranija i/ili intenzivnija prisutnost promjena u korteksu u odnosu na hipokampus) specifičnost, sličnu u mišjem i štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti.

## 3. CILJEVI RADA

### 3.1. OPĆI CILJ

Istraživanje ranih promjena u mozgu miša i štakora izazvanih intracerebroventrikularnom primjenom streptozotocina u svrhu karakterizacije mogućih etiopatogenetskih čimbenika eksperimentalne sporadične Alzheimerove bolesti.

### 3.2. SPECIFIČNI CILJEVI

- 1) Istraživanje ranih neurokemijskih i strukturnih promjena u mozgu miša i štakora nakon STZ-icv primjene na razini:
  - inzulinskog sustava (IR, IDE)
  - proteina tau (PHF13 /pSer396/ i AT8 /pSer202/Thr205/ i enzima koji ga fosforiliraju (GSK3 $\beta$ , CDK5)
  - GLUT2
  - kolinergične transmisije (AChE, ChAT)
  - gubitka neurona
  - astroglioze (GFAP)
- 2) Ispitivanje tijeka nastajanja i progresije ovih promjena ovisno o vremenu nakon STZ-icv primjene (15 minuta, 1, 6 i 24 sata) i regiji mozga (hipokampus i parijetalni korteks)
- 3) Uspoređivanje jesu li neurokemijske i strukturne promjene u mozgu nakon STZ-icv primjene kvalitativno i kvantitativno slične u dvije ispitivane vrste životinja.

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. ŽIVOTINJE

Pokusi su provedeni na 3 mjeseca starim mužjacima Wistar štakora (N=85) i C57BL/6 miševa (N=85), uzgojenim na Zavodu za Farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilište u Zagrebu. Postupci na životinjama provedeni su sukladno međunarodnim smjernicama (The Principles of Laboratory Animal Care, National Institutes of Health publication no. 86-23, revised in 1985) i hrvatskoj regulativi (Zakon o zaštiti životinja NN 102/17, 32/19; Pravilnik o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe NN 55/13) te su kao dio istraživanja u okviru projekta „Potpora 2“ odobreni od fakultetskog Povjerenstva za dobrobit životinja i Ministarstva poljoprivrede (20013-ZUID-02 / projekt br. 1.2.2.15; Ur. Broj: 380-59-10106-14-55/83, Klasa: 641-01/14-02/01).

### 4.2. KEMIKALIJE, REAGENSI I PROTUTIJELA

Tablica 4. Kemikalije, reagensi i protutijela korišteni u pokusima

<i>Postupak</i>	<i>Kemikalije, reagensi, protutijela</i>	<i>Proizvođač</i>
<i>Intracerebroventrikularna primjena streptozotocina</i>	<b>kloralhidrat</b>	<b>Sigma Aldrich, SAD</b>
	<b>limunska kiselina</b>	<b>Kemika, Hrvatska</b>
	<b>natrijev citrat</b>	<b>Merck-Alkaloid, Makedonija</b>
	<b>streptozotocin</b>	<b>Sigma Aldrich, SAD</b>
<i>Žrtvovanje</i>	<b>tiopental</b>	<b>Rotexmedica, Njemačka</b>
	<b>diazepam</b>	<b>Krka, Hrvatska</b>
	<b>tribromoetanol</b>	<b>Sigma Aldrich, SAD</b>
	<b>paraformaldehid</b>	<b>Sigma Aldrich, SAD</b>
	<b>parafin</b>	<b>Sakura, Nizozemska</b>
	<b>100% etanol</b>	<b>T.T.T., Hrvatska</b>

<i>Mjerenje aktivnosti acetilkolinesteraze</i>	5,5-ditiobis(2-nitro benzoatna kiselina) (DTNB)	Sigma Aldrich, SAD	
	acetiltiokolin-jodid (ATCh)	Sigma Aldrich, SAD	
	natrij-dihidrogenfosfat-monohidrat	Kemika, Hrvatska	
	dinatrij-hidrogenfosfat-dodekahidrat	Kemika, Hrvatska	
<i>Western blot analiza</i>	koktel inhibitora proteaza	Sigma Aldrich, SAD	
	tris, (hidroksimetil)-aminometan	Sigma Aldrich, SAD	
	NaCl	T.T.T., Hrvatska	
	etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA)	Kemika, Hrvatska	
	ditiotreitol (DTT)	Fluka, SAD	
	natrij-vanadat	Sigma Aldrich, SAD	
	natrij-deoksikolat	AppliChem, Njemačka	
	nonidet P-40 (NP-40)	Sigma Aldrich, SAD	
	natrij-dodecil-sulfat (SDS)	Sigma Aldrich, SAD	
	Ponceau S	Sigma Aldrich, SAD	
	akrilamid	Sigma Aldrich, SAD	
	bisakrilamid	Sigma Aldrich, SAD	
	amonijev persulfat	Sigma Aldrich, SAD	
	n,n',n',n'-tetrametiletilenamid (temed)	Sigma Aldrich, SAD	
	2-merkaptotanol	Merck, SAD	
	bromfenol modriilo	Sigma Aldrich, SAD	
	glicerol	Fluka, SAD	
	metanol	T.T.T., Hrvatska	
	Tween 20	Sigma Aldrich, SAD	
	glicin	Sigma Aldrich, SAD	
	Precision Plus Protein Standard™	Bio-Rad, SAD	
	Super Signal West Femto™ kemiluminiscentni supstrat (kit)	Thermo Scientific, SAD	
	<i>Histokemija</i>	ksilol	T.T.T., Hrvatska
		krezil-violet boja	Sigma Aldrich, SAD
		octena kiselina	Kemika, Hrvatska
		tioflavin S	Sigma Aldrich, SAD
natrijev hidroksid		T.T.T., Hrvatska	

*Protutijela i kitovi korišteni  
u Western blotu i  
imunohistokemiji*

vodikov peroksid	Belinka, Slovenija
srebrov nitrat (AgNO <sub>3</sub> )	Kemika, Hrvatska
nitratna kiselina (HNO <sub>3</sub> )	Kemika, Hrvatska
natrijev tiosulfat	Roth, Njemačka
mravlja kiselina	Kemika, Hrvatska
albumin goveđeg seruma (BSA)	Sigma Aldrich, SAD
normalni kozji serum (NGS)	Vector laboratories, SAD
anti-IR (inzulinski receptor)	Merck Millipore, SAD
anti-IDE (enzim koji razgrađuje inzulin)	Merck Millipore, SAD
anti-GSK3β (glikogen-sintaza-kinaza 3)	Cell signaling, SAD
anti-pGSK3β (fosfo - GSK3β)	Cell signaling, SAD
anti-PHF 13 (fosfo-tau Ser396)	Cell signaling, SAD
anti-AT8 (fosfo-tau Ser202/Thr205)	Thermo scientific, SAD
anti-total tau (ukupni protein tau)	Sigma Aldrich, SAD
anti-GLUT2 (nosač za glukozu 2)	Santa Cruz Biotechnology, SAD
anti-CDK5 (kinaza ovisna o ciklinu 5)	Cell signaling, SAD
anti-p25; anti-p35	Cell signaling, SAD
anti-ChAT (kolin-acetiltransferaza)	Merck Millipore, SAD
sekundarno anti-goat (kozje) protutijelo konjugirano s peroksidzom (HRP)	Merck Millipore, SAD
sekundarno anti-mouse (mišje) protutijelo konjugirano s HRP	Cell signaling, SAD
sekundarno anti-rat (štakorsko) protutijelo konjugirano s HRP	Cell signaling, SAD
sekundarno anti-rabbit (zečje) protutijelo konjugirano s HRP	Cell signalling, SAD
anti-GAPDH (gliceraldehid-3-fosfat- dehidrogenaza) protutijelo	Imgenex, SAD
anti-β-aktin protutijelo	Sigma Aldrich, SAD
anti-GFAP (kiseli vlaknasti protein glije) protutijelo	Sigma Aldrich, SAD



<b>anti-NeuN (marker za neurone)</b>	<b>Merck SAD</b>	<b>Millipore,</b>
<b>sekundarno biotinizirano antitijelo (mišje)</b>	<b>Vector SAD</b>	<b>laboratories,</b>
<b>Vectastain Elite ABC kit</b>	<b>Vector SAD</b>	<b>laboratories,</b>
<b>Vectastain Elite goat ABC kit</b>	<b>Vector SAD</b>	<b>laboratories,</b>
<b>ImmPACT® AEC (3-amino-9-etilkarbazol) peroksidaza (HRP) substrate kit</b>	<b>Vector SAD</b>	<b>laboratories,</b>
<b>DAB peroxidase substrate (3,3'-diaminobenzidin) kit</b>	<b>Vector SAD</b>	<b>laboratories,</b>

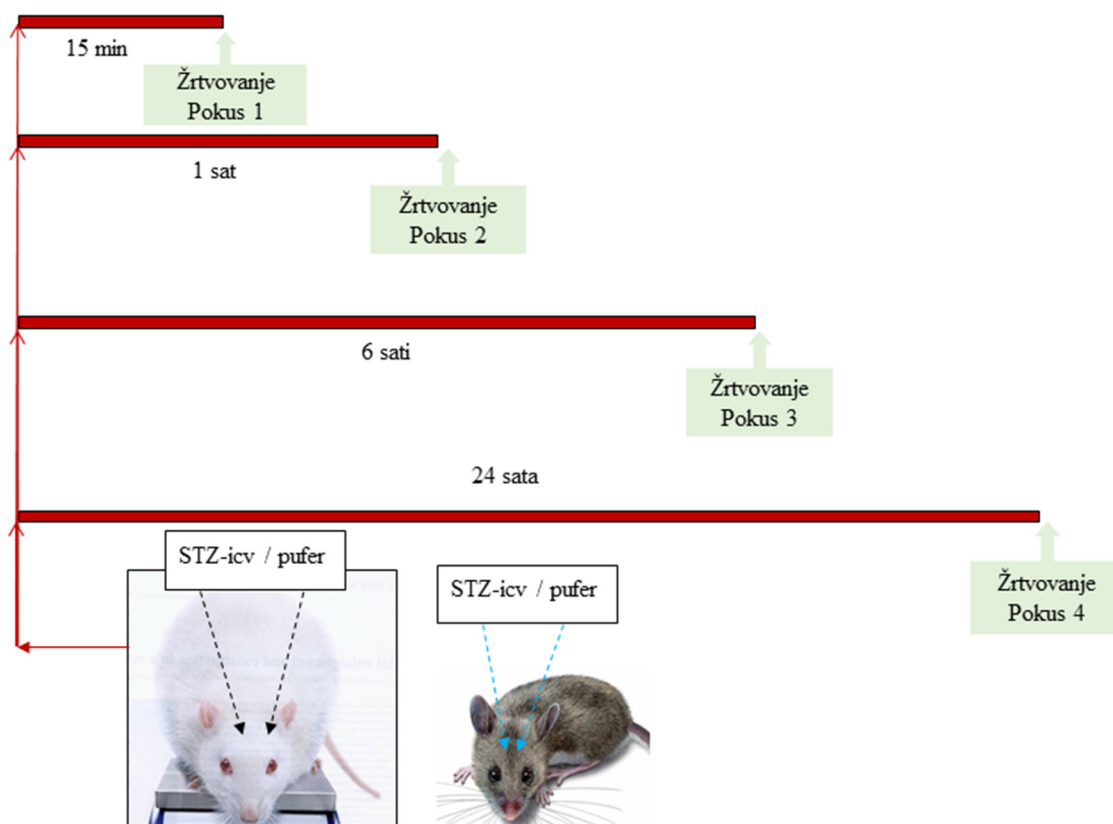
### 4.3. PLAN POKUSA

Provedeno je ukupno 8 pokusa i to po 4 identična pokusa na miševima i na štakorima. U svakom je pokusu, u svakoj vrsti životinja bilo 2 skupine s 10 životinja po skupini, kojima je u dubokoj općoj anesteziji icv primijenjen STZ ili citratni pufer u kontrolnoj skupini. Životinje su žrtvovane u različitim vremenskim točkama: 15 min, 60 min, 6 h i 24 h nakon icv primjene (Slika 10).

### 4.4. INTRACEREBROVENTRIKULARNA PRIMJENA STREPTOZOTOCINA

U općoj anesteziji, za koju smo u miševa koristili tribromoetanol u dozi od 250 mg/kg ip, a u štakora kombinaciju tiopentala (40 mg/kg ip) i diazepama (4 mg/kg ip), životinjama se napravio mali rez (0,5 - 1 cm) na koži glave u medijalnoj liniji, te se električnom bušilicom s lijeve i s desne strane napravio otvor radijusa oko 1 mm u parijetalnoj kosti, 1,2 mm kaudalno od bregme i 1,5 mm lateralno od medijalne linije, prema proceduri prethodno opisanoj u literaturi (208) koja se koristi u istraživanjima u našem laboratoriju od 1990. godine (209). Streptozotocin (1,5 mg/kg), otopljen u 0,05M citratnom puferu (pH 4,5) injicirao se mikrolitarskom injekcionom iglom (Hamilton) u volumenu od 2 µl u svaku lateralnu moždanu

komoru u ispitivane skupine životinja i na isti se način primijenio samo citratni pufer u kontrolnoj skupini životinja.

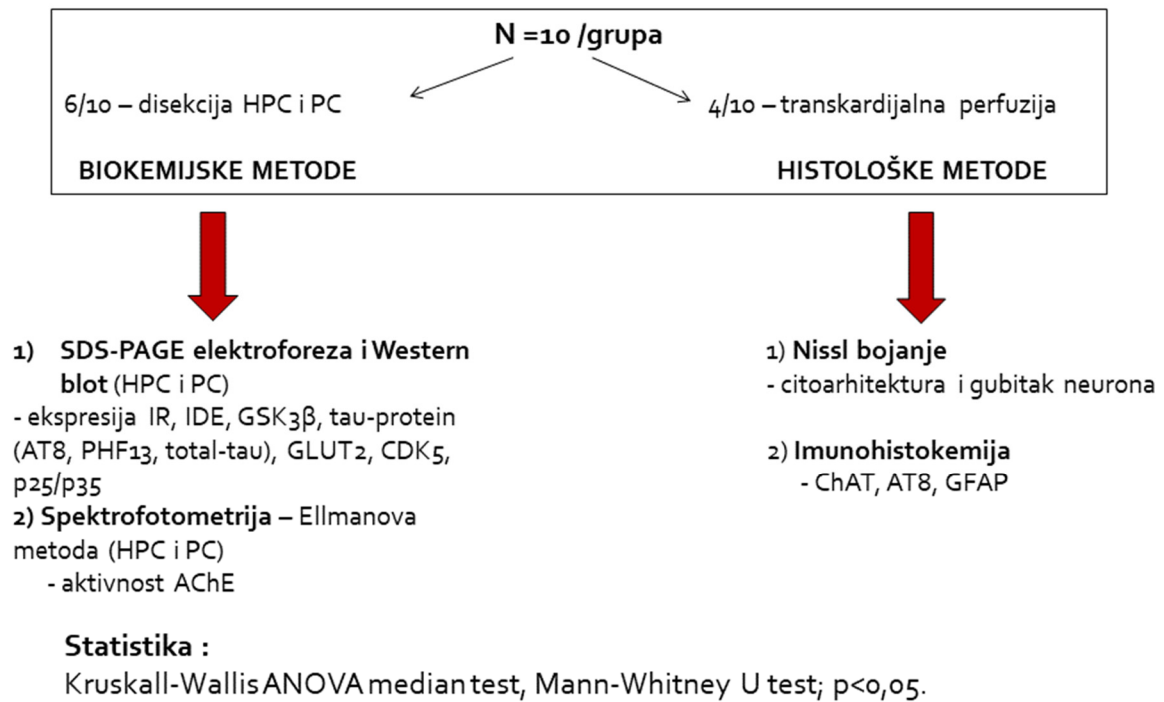


**Slika 10.** Shema pokusa *in vivo* - intracerebroventrikularno injiciranje streptozotocina kod ispitivane skupine i pufera kao kontrole.

#### 4.5. UZIMANJE I PRIPREMANJE BIOLOŠKIH UZORAKA

Iz svake se skupine 6 (od ukupno 10) životinja žrtvovalo u dubokoj anesteziji, za koju se koristilo u miša tribromoetanol (500 mg/kg ip), a u štakora kombinacija tiopentala (50 mg/kg ip) i diazepama (6 mg/kg ip). Dekapitacijom se pažljivo odstranio mozak koji je zatim na hladnoj podlozi podijeljen na lijevu i desnu hemisferu te su izvađena oba hipokampusa (HPC) i obostrani uzorci parijetalnog korteksa (PC) koji su potom brzo zamrznuti u tekućem dušiku i potom pohranjeni na  $-80^{\circ}\text{C}$  za kasniju biokemijsku i molekularno-biološku analizu. Preostale 4 životinje po skupini su u dubokoj anesteziji podvrgnute transkardijalnoj perfuziji s 4%

paraformaldehidom te im se nakon žrtvovanja odstranio cijeli mozak za histološku analizu (Slika 11).



**Slika 11.** Shema uzimanja i analiziranja bioloških uzoraka.

## 4.6. WESTERN BLOT ANALIZA

U zamrznutim uzorcima HPC-a i PC-a određivala se ekspresija pojedinih ukupnih i fosforiliranih proteina u inzulinskom sustavu i signalnom puta IR, sustavu proteina tau i regulatornih enzima njegove fosforilacije te ekspresija GLUT2 proteina, pomoću natrij-dodecil-sulfat-poliakrilamid gel elektroforeze (SDS-PAGE) i analize *Western blot* prema prethodno opisanom postupku korištenom u ranijim istraživanjima u našem laboratoriju (139). Za izolaciju proteina, tkivo se homogeniziralo na ledu u puferu za lizu s inhibitorima proteaze. Diferencijalnim centrifugiranjem uzorci su se pročistili te se koncentracija proteina izmjerila spektrofotometrijskom metodom po Lowry-u (210). Proteini su se razdvojili SDS-PAGE-om koristeći 9% poliakrilamidni donji gel uz pufer za razdvajanje na 150 V, 60-90 min, potom prenijeli na nitroceluloznu membranu pri 100 V uz pufer za prijenos kroz 60 min. Nakon transfera membrana je na kratko obojena Ponceau bojom da se potvrdi dobro provedena

elektroforeza i transfer. Potom je provedeno blokiranje nespecifičnog vezanja i inkubacija s odgovarajućim primarnim antitijelom u puferu za blokiranje preko noći na 4 C° (IDE 1:1000; IR/ 1:1000; pGSK3 $\beta$  1:1000; ukupni GSK3 $\beta$  1:1000; ukupni protein tau 1:500; AT8 (pSer202/Thr205) 1:1000; PHF13 (pSer396) 1:1000; CDK5 1:2000, p25/ p35 1:1000, GLUT2 1:500). Nakon inkubacije, membrane su isprane 3 puta s puferom za ispiranje - LSBW (*low-salt washing buffer*) i inkubirane 1 sat s odgovarajućim sekundarnim protutijelom (*anti-mouse, anti-rabbit* ili *anti-rat* IgG 1:2000). Membrane su se ponovno isprale i izložile kemiluminiscentu te vizualizirale pomoću MicroChemi sustava za analizu (*DNR Bio-Imaging System*). Nakon vizualizacije, membrane su ponovno inkubirane protutijelom koje služi kao kontrola za nanošenje, anti  $\beta$ -aktin (1:2000) ili anti GAPDH (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*, 1:2000). Signal je analiziran i kvantificiran pomoću ImageJ softvera, kao kontrola je korišten anti  $\beta$ -aktin, odnosno anti GAPDH.

<b>Pufer za lizu:</b>	0,65 ml Tris Cl/SDS pH	6,66 $\mu$ l TEMED
50 mM Tris, pH 8	6,8	6,75 ml dH <sub>2</sub> O
150 mM NaCl	1,25 ml 30% akrilamid/0,8% bisakrilamid	<b>10X pufer za razdvajanje (1L):</b>
0,5 mM EDTA		30 g tris
1 mM DTT	35 $\mu$ l 10% amonijev persulfat	115,2 g glicin
0,01 M natrij-vanadat	5 $\mu$ l TEMED	100 ml 10% SDS
0,5% natrij-deoksikolat	3,05 ml dH <sub>2</sub> O	dH <sub>2</sub> O
1% NP-40		
0,1% SDS	<b>Donji gel:</b>	<b>10X pufer za prijenos (1L):</b>
<b>LSWB:</b>	3,75 mL Tris Cl/SDS pH	105 g glicin
0,05 mM Tris	8,8	22,32 g tris
7,5 mM NaCl	4 mL 30% akrilamid/0,8% bisakrilamid	dH <sub>2</sub> O
pH 7,4		
<b>Gornji gel:</b>	100 $\mu$ l 10% amonijev persulfat	

#### 4.7. MJERENJE AKTIVNOSTI ACETILKOLINESTERAZE

Aktivnost AChE mjerila se u HPC-u i PC-u nakon homogenizacije tkiva na ledu u puferu, pomoću standardne spektrofotometrijske Ellmanove metode opisane u literaturi (211) koristeći acetilkolin jodid kao supstrat. Za mjerenje aktivnosti AChE, koncentracija proteina u svim uzorcima namještena je na 5,5 mg/ml. Supernatant (100 µl; 5,5 mg/ml) je stavljen u 3 ml PBS-a, pH 7,4 i 100 µl tiol-reagensa DTNB koncentrirane otopine (0,079 g DTNB u 20 ml PBS-a, pH 7,4), te je nakon dodavanja 50 µl ATCh koncentrirane otopine (0,087 g ATCh u 5 ml dH<sub>2</sub>O) mjerena apsorbancija svake minute do 5. minute. Valna duljina pri kojoj je mjeran porast apsorbancije bila je 412 nm, slijepa proba je sadržavala PBS i DTNB. Katalitička aktivnost AChE izračunala se indirektno kao razlika mjerenja dvaju različitih vremenskih odsječaka. Enzimska aktivnost je izražena kao µmol supstrata hidroliziranog po minuti po gramu svježeg tkiva. Uspoređene su vrijednosti aktivnosti enzima između ispitivane (STZ) i kontrolne skupine.

#### 4.8. HISTOKEMIJA I IMUNOHISTOKEMIJA

Nakon uklapanja u parafinske kocke prethodno paraformaldehydom perfundirani mozak smo rezali na kliznom mikrotomu na rezove debljine 8 µm koje smo koristili za histološku analizu. Rezovi su potom stavljeni na predmetna stakalca, a prije svakog postupka su deparafinizirani kroz niz vodenih otopina alkohola postupno nižih koncentracija sve do vode.

<u>Deparafinizacija</u>	ksilol	2 x 10 min
	100% etanol	2 x 5 min
	95% etanol	2 x 5 min
	70% etanol	2 x 5 min
	dH <sub>2</sub> O	2 x 5 min

#### 4.8.1. Bojanje po Nisslu

Za analiziranje citoarhitekture i gubitka neurona prerezi su bojani 0,1% otopinom krezilskog plavetnila kroz 3-10 minuta, potom su brzo isprani u destiliranoj vodi. Nakon toga su presjeci dehidrirani te pokriveni pokrovnim stakalcem.

<u>Dehidracija</u>	70 x etanol	2 x 3 min
	95% etanol	2 x 3 min
	100% etanol	2 x 3 min
	ksilol	2 x 3 min

#### 4.8.2. Imunohistokemija

Imunohistokemijska analiza ChAT i fosforiliranog proteina tau (pSer202/Thr205 - AT8) te pojava astroglioze (GFAP) provedena je prvo ispiranjem prereza te stavljanjem u 80%-u otopinu mravlje kiseline i zatim u vodikov peroksid za neutraliziranje endogenih peroksidaza. Prezezi su potom blokirani s 10%-im kozjim serumom i inkubirani preko noći na 4 C° s primarnim antitijelom (ChAT 1:500; AT8 1:100; GFAP 1:1000) (212–214). Slijedeći inkubaciju s primarnim antitijelom prerezi su inkubirani s odgovarajućim sekundarnim antitijelom i odgovarajućim dijagnostičkim kitom te na kraju obojani s hematoksilinom, isprani, dehidrirani i pokriveni s pokrovnim stakalcem.

### 4.9. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Mjerenje gustoće zapisa željenog proteina dobivenog analizom *Western blot* zabilježene MicroChemi kamerom obrađeno je putem ImageJ softvera. Kvantitativna analiza histokemijskih i imunohistokemijskih postupaka te dokumentiranje fotografiranjem vršilo se pomoću Olympus BX51 mikroskopa i CellSense dimension programa.

Brojčani podaci izraženi su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška srednje vrijednosti, a razlika među grupama analizirana je Kruskal–Wallis ANOVA median testom te Mann–Whitney U-testom, s razinom statističke značajnosti određenom na vrijednost  $p < 0,05$ .

## 5. REZULTATI

### 5.1. UTJECAJ STREPTOZOTOCINA NA INZULINSKI SUSTAV

Ekspresija proteina **IR**, **GSK3 $\beta$** , **GLUT2** i **IDE** izmjerena je Western blot analizom u homogenatu uzoraka tkiva dvije moždane regije (PC i HPC) u četiri vremenske točke nakon STZ-icv primjene (15 min, 1, 6 i 24h) u obje vrste životinja. Izmjerene apsolutne vrijednosti ekspresije ovih proteina navedene su u Tablicama 5. Temeljem ovih apsolutnih vrijednosti, na Slikama 12 i 13 grafički je prikazan vremenski tijek promjena na način da svaka točka predstavlja %-tnu promjenu određenog parametra u pojedinoj vremenskoj točki STZ-icv skupine u odnosu na pripadajuću kontrolnu skupinu u istoj vremenskoj točki.

Ekspresija IR proteina u PC-u miša bila je značajno snižena 1h i 6h nakon primjene STZ-icv (-20% i -24%;  $p < 0,05$ ) u odnosu na odgovarajuće kontrolne skupine, nakon čega je imala tendenciju porasta na vrijednosti više od kontrolnih sa statistički značajnim porastom izmjerenim nakon 24h (+45%,  $p < 0,05$ ) (Slika 12 A, Tablica 5). Nasuprot tome, u PC-u štakora nisu nađene značajne promjene ekspresije IR proteina unutar 24h u STZ-icv grupi u odnosu na kontrolu (Slika 12 B, Tablica 5). U HPC-u miša zabilježen je značajan pad ekspresije IR nakon 24h (-22%,  $p < 0,05$ ) (Slika 12 A, Tablica 5), isto kao i u HPC štakora (-34%,  $p < 0,05$ ) (Slika 12 B, Tablica 5).

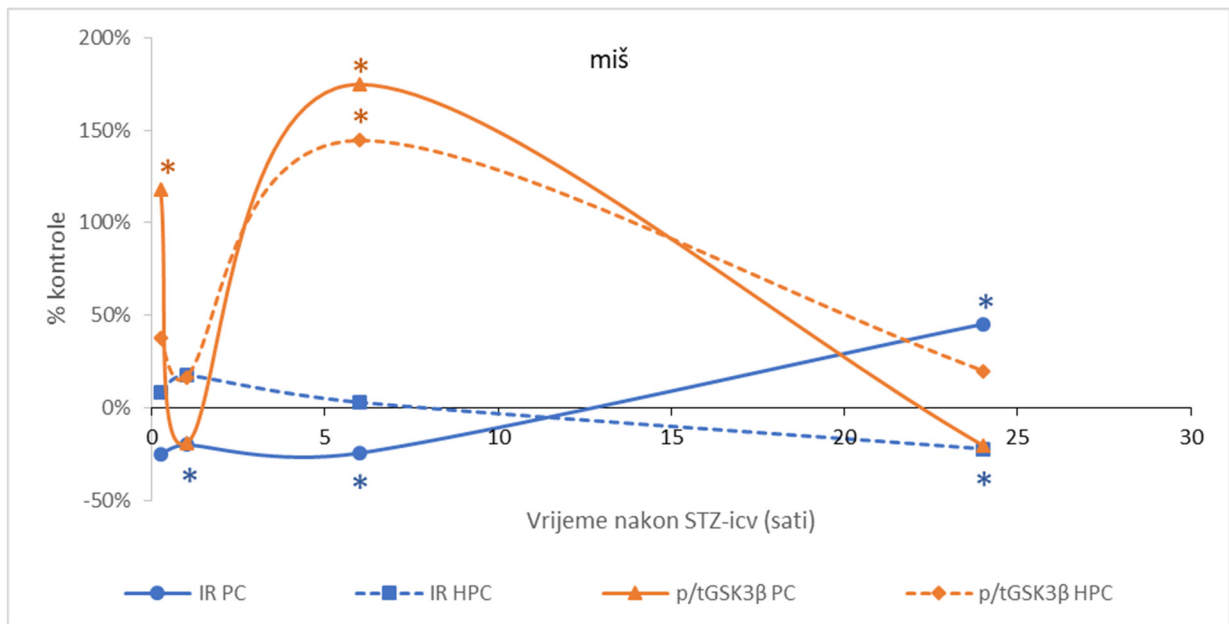
Sumarno, u mozgu štakora, tendencija promjena IR ekspresije unutar 24 sata nakon STZ-icv primjene ima sličan smjer u dvije ispitivane regije, dok je u miša smjer promjena regionalno specifičan i sličan onom u štakora samo u HPC-u (Slika 12 A i B, Tablica 5).

Tablica 5. Ekspresija proteina inzulinskog receptora, enzima koji razgrađuje inzulin, nosača za glukozu 2, fosforiliranog, ukupnog i omjera p/t glikogen-sintaze-kinaze 3 u mozgu miša i štakora nakon intracerebroventrikularne primjene streptozotocina.

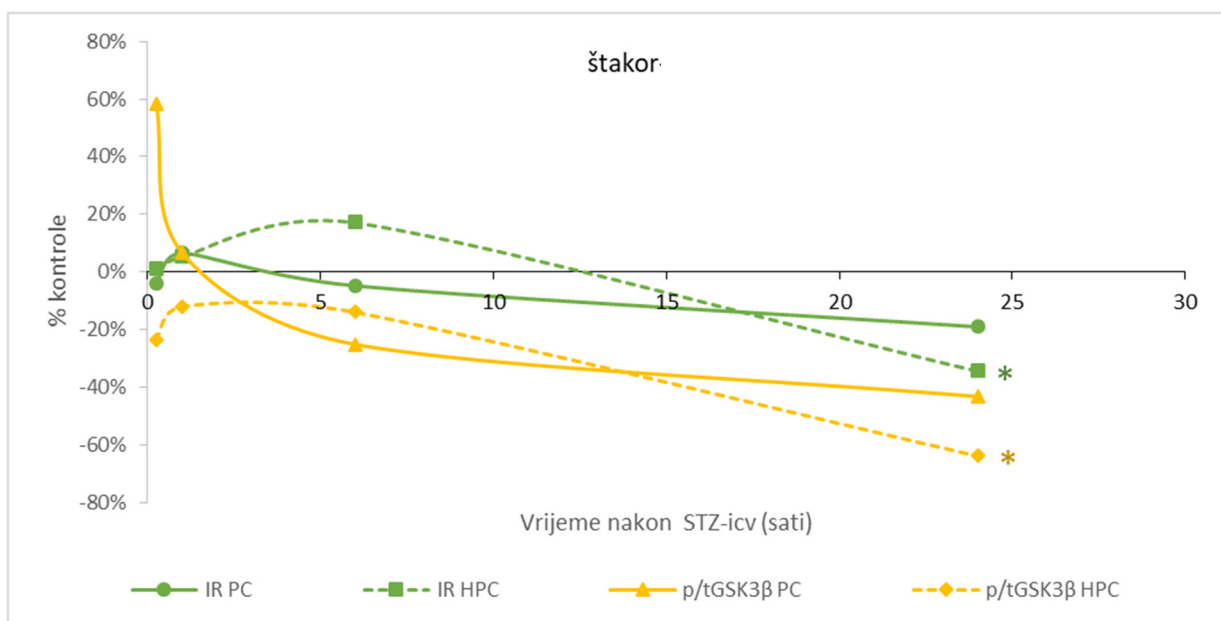
MIS	IR			IDE			GLUT2			pGSK3β			totalGSK3β			p/t GSK3β		
	CTR	STZ	CTR	STZ	CTR	STZ	CTR	STZ	CTR	STZ	CTR	STZ	CTR	STZ	CTR	STZ	CTR	STZ
<i>15 min PC</i>	1.291±0.29	0.967±0.08	1.117±0.10	1.296±0.13	0.803±0.05	0.559±0.07 <sup>a</sup>	0.352±0.15	1.001±0.13 <sup>a</sup>	0.375±0.04	0.444±0.02	1.014±0.48	2.209±0.24 <sup>a</sup>						
<i>15 min HPC</i>	0.697±0.04	0.757±0.05	1.002±0.09	1.144±0.04	0.604±0.08	0.899±0.09 <sup>a</sup>	0.321±0.04	0.485±0.04	0.376±0.05	0.385±0.02	0.938±0.16	1.290±0.14						
<i>1 sat PC</i>	0.895±0.03	0.716±0.07 <sup>a</sup>	1.574±0.13	1.225±0.16 <sup>b</sup>	0.884±0.10	0.664±0.27	1.305±0.13	1.958±0.08 <sup>a</sup>	1.051±0.05	1.624±0.09 <sup>a</sup>	1.475±0.09	1.193±0.08 <sup>b</sup>						
<i>1 sat HPC</i>	0.736±0.06	0.867±0.05	0.991±0.13	0.727±0.07	1.024±0.07	0.962±0.14	0.668±0.07	0.830±0.05	0.885±0.05	0.986±0.10	0.811±0.07	0.947±0.09						
<i>6 sati PC</i>	1.329±0.09	1.005±0.11 <sup>a</sup>	0.709±0.04	0.776±0.06	1.783±0.07	2.300±0.47	0.749±0.04	1.756±0.32 <sup>a</sup>	0.809±0.03	0.678±0.03 <sup>a</sup>	0.933±0.06	2.563±0.43 <sup>a</sup>						
<i>6 sati HPC</i>	0.655±0.09	0.676±0.02	0.526±0.04	0.766±0.10 <sup>a</sup>	1.175±0.17	0.518±0.18 <sup>a</sup>	0.677±0.09	0.778±0.04	2.035±0.31	0.928±0.12 <sup>a</sup>	0.375±0.08	0.919±0.13 <sup>a</sup>						
<i>24 sata PC</i>	0.882±0.05	1.281±0.04 <sup>a</sup>	0.824±0.03	0.787±0.04	1.098±0.75	1.636±0.34	0.988±0.05	0.938±0.06	0.758±0.06	0.855±0.04	1.378±0.20	1.099±0.06						
<i>24 sata HPC</i>	1.332±0.10	1.038±0.08 <sup>a</sup>	0.597±0.06	0.764±0.10	0.506±0.09	0.784±0.07 <sup>a</sup>	1.299±0.05	1.706±0.14 <sup>a</sup>	0.906±0.01	0.845±0.03	1.718±0.26	2.062±0.23						
<b>ŠTAKOR</b>																		
<i>15 min PC</i>	0.347±0.05	0.333±0.04	1.205±0.04	1.141±0.15	1.034±0.12	1.148±0.11	0.708±0.08	0.912±0.08 <sup>a</sup>	1.723±0.40	1.065±0.15	0.566±0.15	0.897±0.09						
<i>15 min HPC</i>	0.748±0.06	0.757±0.14	1.107±0.05	1.040±0.12	1.560±0.17	1.387±0.06	0.740±0.17	0.546±0.07	1.286±0.06	1.191±0.03	0.598±0.14	0.457±0.05						
<i>1 sat PC</i>	0.683±0.03	0.728±0.03	0.571±0.08	0.461±0.04	0.458±0.07	0.592±0.13	0.765±0.08	0.857±0.09	1.351±0.03	1.420±0.04	0.567±0.06	0.605±0.07						
<i>1 sat HPC</i>	0.360±0.02	0.379±0.03	0.785±0.05	0.710±0.04	0.880±0.04	1.264±0.05 <sup>a</sup>	4.005±1.19	3.475±0.78	0.559±0.05	0.854±0.08 <sup>a</sup>	4.778±1.15	4.206±1.03						
<i>6 sati PC</i>	1.187±0.09	1.130±0.09	0.927±0.06	1.121±0.17	0.986±0.09	1.086±0.19	1.000±0.21	1.144±0.06	0.815±0.05	1.502±0.30	1.326±0.35	0.992±0.24						
<i>6 sati HPC</i>	0.745±0.05	0.874±0.09	0.945±0.06	0.908±0.05	1.354±0.28	1.464±0.32	2.084±0.22	2.736±0.49	1.465±0.25	2.006±0.55	1.603±0.37	1.380±0.20						
<i>24 sata PC</i>	0.312±0.05	0.252±0.03	0.972±0.06	1.006±0.08	0.974±0.07	2.052±0.56 <sup>a</sup>	1.598±0.55	0.532±0.07 <sup>a</sup>	1.426±0.15	0.946±0.01 <sup>a</sup>	0.998±0.25	0.566±0.08						
<i>24 sata HPC</i>	0.989±0.04	0.648±0.05 <sup>a</sup>	1.141±0.05	1.279±0.15	0.971±0.15	1.463±0.15 <sup>a</sup>	1.795±0.57	0.712±0.11 <sup>a</sup>	0.816±0.03	0.862±0.02	2.324±0.87	0.838±0.14 <sup>a</sup>						

Životinje su žrtvovane 15 minuta, 1, 6 i 24 sata nakon intracerebroventrikularne primjene streptozotocina (STZ) ili otapala (CTR). Ekspresija inzulinskog receptora (IR), enzima koji razgrađuje inzulin (IDE), nosača za glukozu 2 (GLUT2), fosforiliranog glikogen sintaze kinaze 3 beta (pGSK3β), ukupnog (totalGSK3β) i omjer fosforiliranog i ukupnog GSK3beta (p/tGSK3β) u hipokampusu (HPC) i parijetalnom korteksu (PC) izmjerena je Western blot analizom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška srednje vrijednosti (SEM) i analizirani neparametrijskim Kruskal-Wallis i Mann-Whitney U testovima uz razinu značajnosti  $p < 0.05$ . <sup>a</sup> $p < 0.05$ , <sup>b</sup> $p = 0.06$





(A)



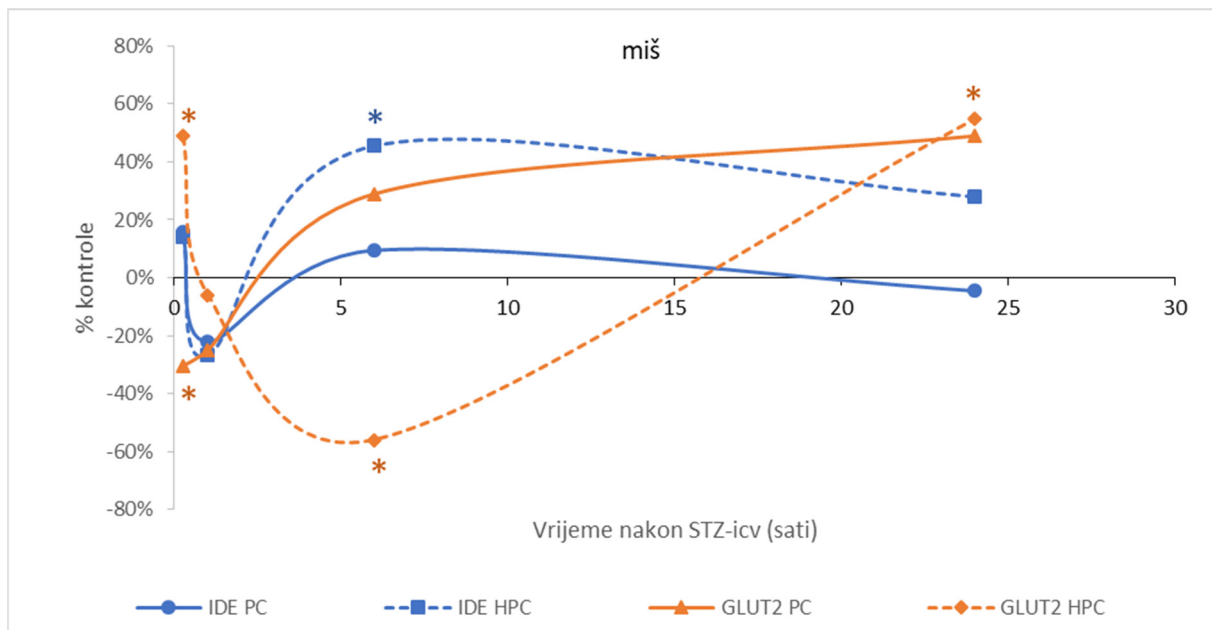
(B)

**Slika 12. Ekspresija inzulinskog receptora i glikogen-sintaze-kinaze 3 beta u parijetalnom korteksu i hipokampusu miša (A) i štakora (B) nakon intracerebroventrikularne primjene streptozotocina.** Životinje su žrtvovane 15 minuta, 1, 6 i 24 sata nakon intracerebroventrikularne primjene streptozotocina (STZ-icv) ili otapala (ctr). Ekspresija inzulinskog receptora (IR) i omjer fosforiliranog i ukupnog GSK3β (p/tGSK3β) u hipokampusu (HPC) i parijetalnom korteksu (PC) izmjerena je Western blot analizom, a svaka točka predstavlja srednju vrijednost skupine izraženu u % u odnosu na odgovarajuću kontrolu, izračunatim temeljem rezultata Tablice 5. Podaci su analizirani neparametrijskim Kruskal- Wallis i Mann-Whitney U testovima. \*  $p < 0,05$ .

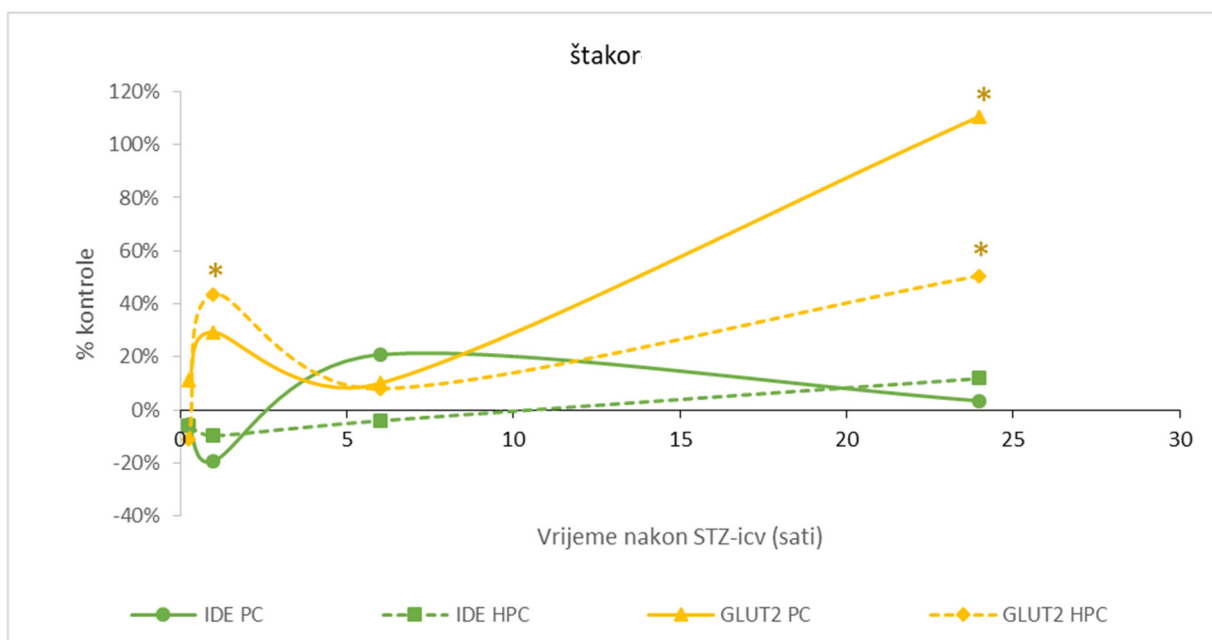
Enzim GSK3 $\beta$ , čija je aktivnost inače kontrolirana preko IR, u fosforiliranom je obliku inaktivan, dok je nefosforilirani, dakle aktivan oblik povezan s prekomjernom fosforilacijom proteina tau u mozgu. Kako bismo neizravnim putem izmjerili aktivnost GSK3 $\beta$ , Western blot analizom mjerena je ekspresija fosforiliranog (pGSK3 $\beta$ ) i ukupnog (tGSK3 $\beta$ ) enzima te izražena u obliku omjera p/tGSK3 $\beta$ . U aktivnom obliku ovaj enzim između ostalog fosforilira i protein tau na mjestu Ser396, što je u nastavku istraživanja mjereno ekspresijom PHF13.

U PC-u miša omjer p/tGSK3 $\beta$  bio je značajno povišen 15min (+118%,  $p < 0,05$ ) i 6h (+175%,  $p < 0,05$ ) nakon STZ-icv primjene (Slika 12 A, Tablica 5), dok u PC-u štakora nije bilo značajnih promjena unutar 24h od STZ-icv primjene (Slika 12 B, Tablica 5). U HPC-u miša je omjer p/tGSK3 $\beta$  značajan povišen nakon 6h (+144%,  $p < 0,05$ ), nakon čega ima tendenciju pada prema 24h nakon STZ-icv (Slika 12 A, Tablica 5), a u štakorskom HPC-u je nakon 24h nađeno značajno sniženje (-64%,  $p < 0,05$ ) (Slika 12 B, Tablica 5). Sličnu sklonost pada vrijednosti p/tGSK3 $\beta$  pratimo u HPC-u i PC-u miša i štakora unutar 24 sata. (Slika 12 A, B, Tablica 5).

Statistički značajno snižena razina ekspresije GLUT2 proteina je zabilježena u PC-u miša već 15min nakon STZ-icv primjene (-30%,  $p < 0,05$ ) bez značajnih promjena u ostalim vremenskim točkama (Slika 13 A, Tablica 5), dok je u PC-u štakora značajno povišena samo nakon 24h (+110%,  $p < 0,05$ ) (Slika 13 B, Tablica 5). U obje se vrste životinja tijekom vremena može uočiti sklonost rasta ekspresije GLUT2 u PC-u nakon STZ-icv primjene, posebno u razdoblju 6 – 24h. U HPC-u miša se uočava značajno povećanje ekspresije GLUT2 proteina odmah nakon 15min po STZ-icv primjeni (+49%,  $p < 0,05$ ), nakon čega slijedi pad koji dostiže statistički značajne vrijednosti nakon 6h (-56%,  $p < 0,05$ ) te nakon toga ponovni rast sa statistički značajnim porastom GLUT2 ekspresije nađenim nakon 24 sata (+55%,  $p < 0,05$ ) (Slika 13 A, Tablica 5). Takva tendencija rasta na početku uz pad i potom ponovni rast ekspresije GLUT2 proteina prati se i u HPC-u štakora, gdje je nađeno značajno povišenje nakon 1h (+44%) i 24h (+51%,  $p < 0,05$ ), uz tendenciju sniženja razine ekspresije nakon 6h koje nije bilo statistički značajno (Slika 13 B, Tablica 5). Razina proteina IDE u ispitivanom vremenu nije pokazala statistički značajnu razliku u ispitivanim regijama štakora (Slika 13 B, Tablica 5), ali je zato u HPC-u miša razina IDE značajno povišena 6h nakon STZ-icv primjene (+45%,  $p < 0,05$ ) u odnosu na kontrolu (Slika 13 A, Tablica 5). Pad ekspresije IDE nakon 1h u PC-u miša bio je blizu granice statističke značajnosti (-22%;  $p = 0,06$ ) (Slika 13 A, Tablica 5). Ista tendencija bifazičnih ali statistički neznačajnih promjena posebno unutar prvih 6 sati nakon STZ-icv primjene može se uočiti i u PC-u štakora. (Slika 13 B, Tablica 5).



(A)



(B)

**Slika 13. Ekspresija enzima koji razgrađuje inzulin i nosača za glukozu 2 u parijetalnom korteksu i hipokampusu miša (A) i štakora (B) nakon intracerebroventrikularne primjene streptozotocina.** Životinje su žrtvovane 15 minuta, 1, 6 i 24 sata nakon intracerebroventrikularne primjene streptozotocina (STZ-icv) ili otapala (ctr). Ekspresija enzima koji razgrađuje inzulin (IDE) i nosača za glukozu 2 (GLUT2) u hipokampusu (HPC) i parijetalnom korteksu (PC) mjerena je Western blot analizom, a svaka točka predstavlja srednju vrijednost skupine izraženu u % u odnosu na odgovarajuću kontrolu, izračunatim temeljem rezultata Tablice 5. Podaci su analizirani neparametrijskim Kruskal-Wallis i Mann-Whitney U testovima. \*  $p < 0,05$ .

## 5.2. UTJECAJ STREPTOZOTOCINA NA PROTEIN TAU

Ekspresija proteina **CDK5, p25/p35, AT8, PHF13 i total tau** također je mjerena Western blot analizom u homogenatu uzoraka tkiva dvije moždane regije (PC i HPC) u četiri vremenske točke nakon STZ-icv primjene (15 min, 1, 6 i 24h) u obje vrste životinja. Izmjerene apsolutne vrijednosti ekspresije ovih proteina navedene su u Tablicama 6 i 7. Temeljem ovih apsolutnih vrijednosti, u Slikama 14 i 16, grafički je prikazan vremenski tijek promjena na način da svaka točka predstavlja %-tnu promjenu određenog parametra u pojedinoj vremenskoj točki STZ-icv skupine u odnosu na pripadajuću kontrolnu skupinu u istoj vremenskoj točki. Postupcima imunohistokemije na prerezima mozga obje vrste životinja, u četiri vremenske točke nakon STZ-icv primjene (15 min, 1, 6 i 24h), dodatno je ispitivana prisutnost imunoreaktivnog AT8 signala u dvije moždane regije (PC, HPC) (Slika 15 A-F).

Fosforilacija proteina tau mjerena je putem 2 protutijela koja se vežu na epitope Ser202/ Thr205 (AT8) i epitop Ser396 (PHF13). U PC-u miša ekspresija AT8 bila je značajno povećana 15min, 1h i 6h nakon STZ-icv primjene (+111%, +96%, +47%;  $p < 0,05$ ), dok nakon 24h nije bilo značajne razlike u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 6). Nasuprot tome, u PC-u štakora 24h nakon primjene STZ, nađeno je značajno sniženje ekspresije AT8 (-43%,  $p < 0,05$ ) (Tablica 6). U HPC-u miša ekspresija AT8 bila je značajno snižena nakon 24h (-40%,  $p < 0,05$ ), dok je u HPC-u štakora zabilježena promjena ekspresije AT8 samo nakon 6h i to u vidu povećanja (+31%,  $p < 0,05$ ) (Tablica 6).

Ekspresija PHF13 (koja se povezuje s prethodno mjerenom neizravnom aktivnosti GSK3 $\beta$ ) u PC-u miša bila je značajno povećana samo 1h nakon STZ-icv primjene (+36%,  $p < 0,05$ ) bez promjena u ostalim vremenskim točkama, dok je u PC-u štakora značajan porast uočen već nakon 15min (+37%,  $p < 0,05$ ), također bez promjena u ostalim vremenskim točkama (Tablica 6). U HPC-u miša je nakon porasta PHF13 ekspresije 1h po STZ-icv primjeni (+26%,  $p < 0,05$ ) uočen značajan pad od -41% u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p < 0,05$ ) 6 sati nakon STZ-icv. U HPC-u štakora zabilježen je samo značajan pad PHF13 ekspresije nakon 24h (-13%,  $p < 0,05$ ) (Tablica 6).

Nakon STZ-icv primjene, ekspresija ukupnog protein taua (tTAU) u PC-u miša bila je povišena nakon 15min (+108%,  $p < 0,05$ ), te snižena nakon 24h (-53%,  $p < 0,05$ ), a u istoj regiji u mozgu štakora bila je također značajno snižena nakon 24h (-35%,  $p < 0,05$ ) (Tablica 6). HPC miša pokazuje povećanu ekspresiju tTAU nakon 15min i 6h (+25%, +31%,  $p < 0,05$ ), iako je nakon

1h ona bila značajno smanjena (-28%,  $p < 0,05$ ). Slično kao u PC-u štakora, nakon 24h nalazimo značajno smanjenje ekspresije tTAU u HPC iste vrste od -49% u odnosu na kontrolu ( $p < 0,05$ ) (Tablica 6).

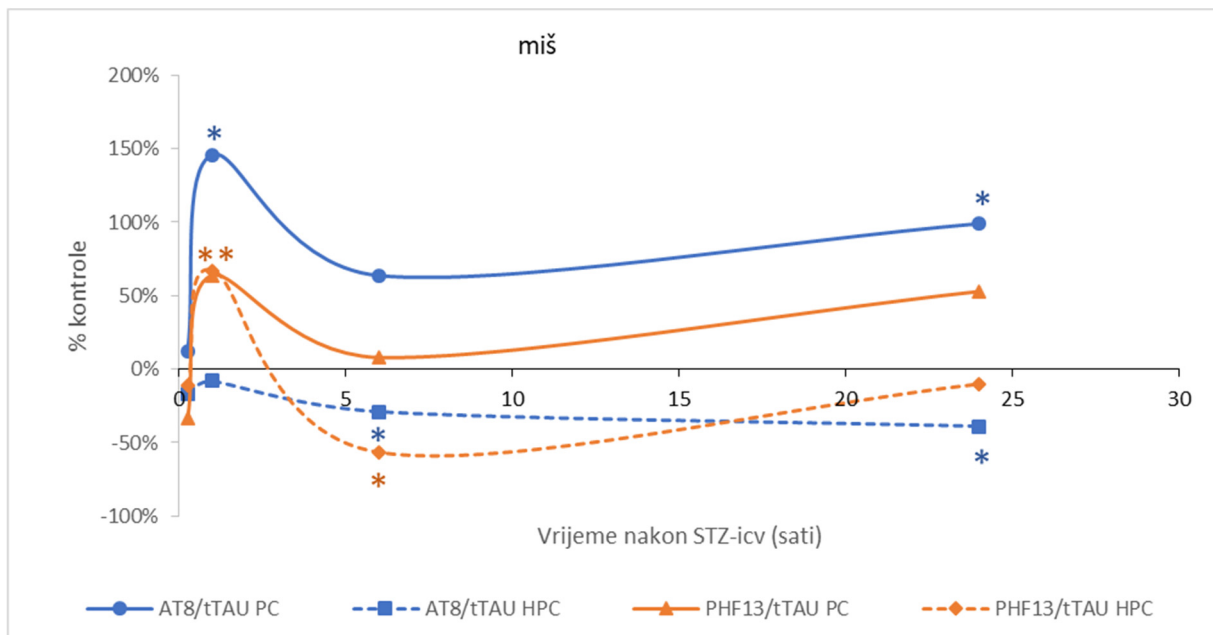
Gore navedene rezultate ekspresije fosforiliranog (AT8, PHF13) i ukupnog protein taua izrazili smo u omjerima AT8 /tTAU i PHF13/tTAU, koji se u literaturi koriste kao neizravna mjera stanja fosforiliranosti protein taua. Tako je nakon STZ-icv primjene u PC-u miša omjer AT8/tTAU značajno povišen nakon 1h (+146%,  $p < 0,05$ ) te nakon 24h (+99%,  $p < 0,05$ ) (Slika 14 A), za razliku od PC-a štakora u kojem nema značajne razlike između ispitivane i kontrolne skupine niti u jednoj ispitivanoj vremenskoj točki (Slika 14 B). HPC miša pokazuje značajni pad omjera AT8/tTAU nakon 6h i 24h (-29% i -39%,  $p < 0,05$ ) (Slika 14 A), za razliku od HPC-a štakora u kojem je zabilježena tendencija progresivnog porasta ovog omjera 6h nakon STZ-icv primjene sa značajnim porastom od +124% ( $p < 0,05$ ) nakon 24h (Slika 14 B).

Omjer PHF13/tTAU u PC-u miša pokazuje značajni porast izmjeren 1h nakon STZ-icv od +24% ( $p < 0,05$ ), potom slijedi blaži pad 6h nakon STZ-icv pa tendencija ponovnog porasta do kraja promatranog vremena od 24h kad iznosi +53% ( $p = 0,06$ ) (Slika 14 A). Ista tendencija u PHF13/tTAU omjeru se prati i u mozgu štakora, gdje je u PC-u uočen rast nakon 15 min (+29%,  $p < 0,05$ ) nakon čega također slijedi blaži pad i potom ponovni rast, koji u 24h iznosi +49% ( $p < 0,05$ ) (Slika 14 B). Slična tendencija kao u PC-u miša uočena je i u HPC-u iste vrste, gdje je omjer PHF13/tTAU značajno povišen nakon 1h (+67%,  $p < 0,05$ ), poslije čega slijedi pad od -56% nakon 6h ( $p < 0,05$ ) uz daljnji blagi porast i približavanje kontrolnim vrijednostima nakon 24h (Slika 14 A). HPC štakora također slijedi vrlo sličnu distribuciju rezultata kao i u PC-u iste vrste životinja jer povećanje od +26% ( $p < 0,05$ ) nalazimo u ispitivanoj skupini 15min nakon STZ-icv nakon čega slijedi blaži pad te ponovo značajni porast do 24h koji iznosi +121% ( $p < 0,05$ ) (Slika 14 B).

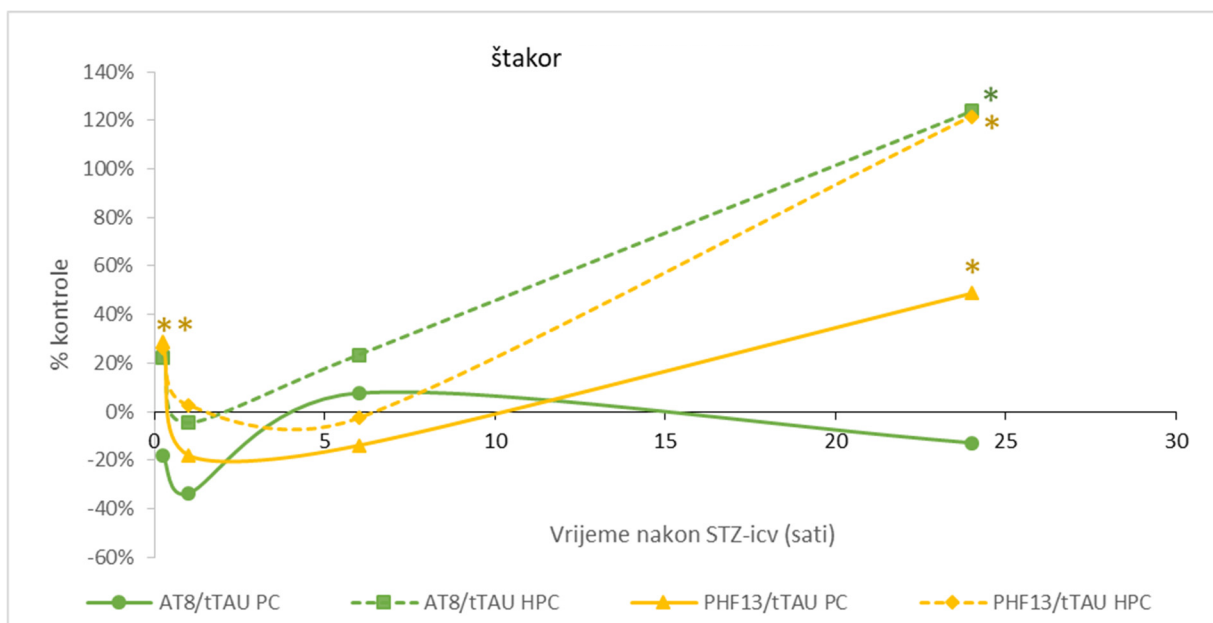
Tablica 6. Ekspresija i odnos fosforiliranog i ukupnog tau proteina u mozgu miša i štakora nakon intracerebroventrikularne primjene streptozotocina.

	PHF13			AT8			Total tau			PHF13/tTAU			AT8/tTAU		
	CTR	STZ		CTR	STZ		CTR	STZ		CTR	STZ		CTR	STZ	
<b>MIŠ</b>															
<i>15 min PC</i>	0.433±0.08	0.591±0.04		0.259±0.09	0.549±0.11 <sup>a</sup>		0.244±0.05	0.508±0.10 <sup>a</sup>		2.250±0.65	1.504±0.41		1.159±0.21	1.303±0.29	
<i>15 min HPC</i>	1.445±0.10	1.541±0.14		0.846±0.09	0.854±0.11		0.671±0.03	0.843±0.05 <sup>a</sup>		2.136±0.11	1.895±0.24		1.231±0.22	1.028±0.11	
<i>1 sat PC</i>	0.600±0.02	0.819±0.03 <sup>a</sup>		0.525±0.04	1.029±0.18 <sup>a</sup>		0.511±0.05	0.492±0.09		1.227±0.11	2.011±0.42 <sup>a</sup>		1.122±0.19 <sup>a</sup>	2.761±0.46	
<i>1 sat HPC</i>	0.761±0.02	0.962±0.07 <sup>a</sup>		0.779±0.09	0.684±0.10		0.362±0.03	0.261±0.02 <sup>a</sup>		2.192±0.17	3.659±0.37 <sup>a</sup>		2.824±0.61	2.593±0.37	
<i>6 sati PC</i>	1.616±0.18	1.322±0.21		0.811±0.13	1.197±0.07 <sup>a</sup>		1.093±0.08	1.130±0.28		1.499±0.16	1.618±0.49		0.757±0.13 <sup>b</sup>	1.239±0.22	
<i>6 sati HPC</i>	0.552±0.08	0.325±0.05 <sup>a</sup>		0.923±0.06	0.875±0.02		0.579±0.02	0.762±0.02 <sup>a</sup>		0.989±0.13	0.430±0.07 <sup>a</sup>		1.626±0.09 <sup>a</sup>	1.154±0.05	
<i>24 sata PC</i>	0.971±0.13	0.810±0.08		0.658±0.05	0.623±0.08		0.491±0.09	0.230±0.02 <sup>a</sup>		2.271±0.42	3.473±0.57 <sup>b</sup>		1.556±0.33	3.098±0.53 <sup>a</sup>	
<i>24 sata HPC</i>	1.203±0.12	0.950±0.03		1.346±0.12	0.811±0.09 <sup>a</sup>		0.139±0.01	0.149±0.03		7.843±2.09	7.058±0.73		10.512±1.82	6.402±1.13 <sup>a</sup>	
<b>ŠTAKOR</b>															
<i>15 min PC</i>	0.576±0.03	0.787±0.06 <sup>a</sup>		0.998±0.02	0.846±0.08		0.531±0.06	0.560±0.06		1.155±0.16	1.485±0.22 <sup>a</sup>		2.030±0.37	1.665±0.17	
<i>15 min HPC</i>	0.337±0.04	0.310±0.02		2.024±0.30	2.044±0.22		0.164±0.02	0.125±0.01		2.064±0.14	2.608±0.32 <sup>a</sup>		13.972±2.53	17.108±2.32	
<i>1 sat PC</i>	1.435±0.05	1.293±0.08		0.939±0.07	0.779±0.09		0.463±0.20	0.824±0.24		2.219±0.77	1.822±0.63		1.556±0.34	1.032±0.38	
<i>1 sat HPC</i>	0.951±0.03	1.109±0.08		1.226±0.41	1.642±0.44		0.418±0.15	0.462±0.22		0.227±0.02	0.233±0.02		0.332±0.14	0.316±0.09	
<i>6 sati PC</i>	0.256±0.04	0.218±0.03		0.876±0.07	0.655±0.10		0.679±0.09	0.572±0.07		0.442±0.10	0.380±0.04		1.402±0.23	1.509±0.30	
<i>6 sati HPC</i>	0.163±0.01	0.177±0.03		0.472±0.05	0.618±0.03 <sup>a</sup>		0.752±0.04	0.817±0.05		0.225±0.03	0.219±0.04		0.647±0.09	0.798±0.05	
<i>24 sata PC</i>	0.244±0.01	0.242±0.02		0.383±0.02	0.215±0.03 <sup>a</sup>		0.322±0.05	0.210±0.02 <sup>a</sup>		0.798±0.06	1.186±0.09 <sup>a</sup>		1.293±0.17	1.127±0.11	
<i>24 sata HPC</i>	0.830±0.02	0.718±0.04 <sup>a</sup>		0.277±0.05	0.268±0.04		0.113±0.02	0.057±0.01 <sup>a</sup>		6.188±0.67	13.70±1.70 <sup>a</sup>		2.615±0.69	5.851±1.63 <sup>a</sup>	

Životinje su žrtvovane 15 minuta, 1, 6 i 24 sata nakon intracerebroventrikularne primjene streptozotocina (stz) ili otapala (ctr). Ekspresija fosforiliranog oblika tau proteina na mjestima Ser202, Thr205 (AT8) i mjestu Ser396 (PHF13) te ukupnog tau proteina (Total tau) i omjer fosforiliranog i ukupnog (PHF13/tTAU i AT8/tTAU) u hipokampusu (HPC) i parijetalnom korteksu (PC) mjerena je Western blot analizom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška srednje vrijednosti (SEM) i analizirani neparametrijskim Kruskal-Wallis i Mann-Whitney U testovima uz razinu značajnosti  $p < 0.05$ . <sup>a</sup> $p < 0.05$ .



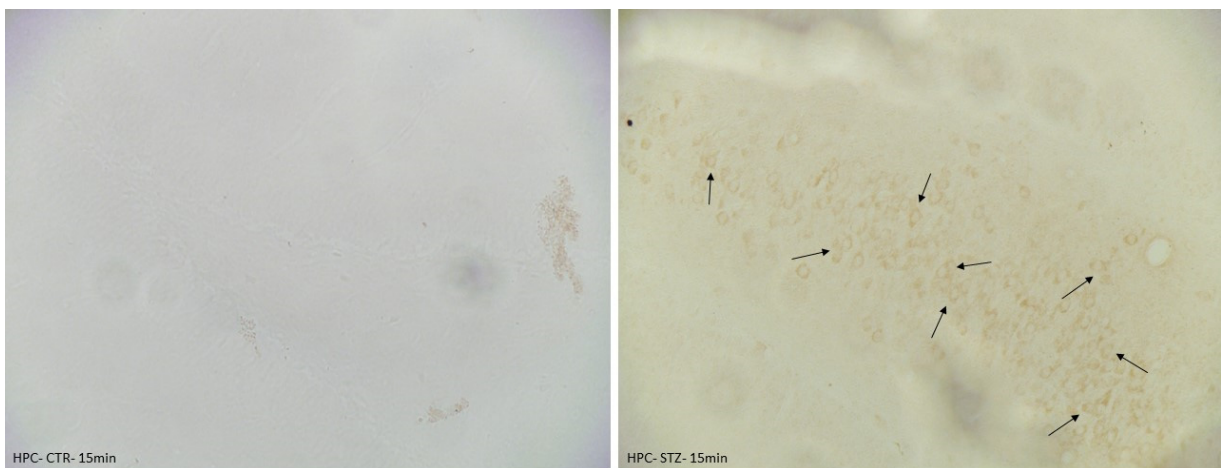
(A)



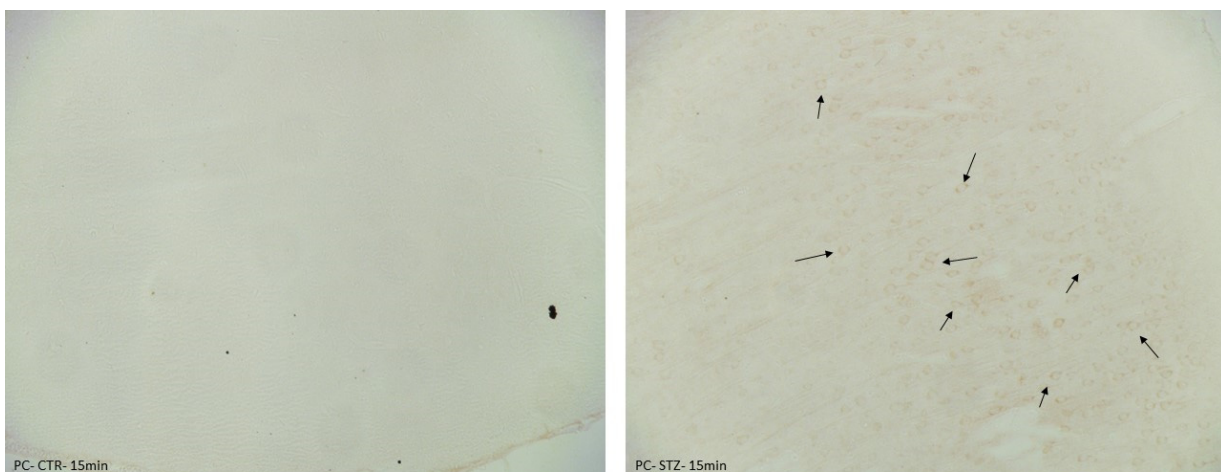
(B)

**Slika 14. Učinak intracerebroventrikularne primjene streptozotocina na fosforilaciju protein taua u mozgu miša (A) i štakora (B).** Životinje su žrtvovane 15 minuta, 1, 6 i 24 sata nakon intracerebroventrikularne primjene streptozotocina (STZ-icv) ili otapala (ctr). Ekspresija fosforiliranog protein taua na mjestima Ser202, Thr205 (AT8) i mjestu Ser396 (PHF13), ukupnog protein taua (tTAU) u hipokampusu (HPC) i parijetalnom korteksu (PC) mjerena je Western blot analizom, na slici je prikazan omjer fosforiliranog i ukupnog protein taua (AT8/tTAU i PHF13/tTAU) a svaka točka predstavlja srednju vrijednost skupine izraženu u % u odnosu na odgovarajuću kontrolu, izračunatim temeljem rezultata Tablice 6. Rezultati su analizirani neparametrijskim Kruskal- Wallis i Mann-Whitney U testovima uz razinu značajnosti  $*p < 0,05$ .

**Histološka** ispitivanja imunoreaktivnosti AT8 pokazala su da u mozgu miša, u obje regije nakon STZ-icv primjene nema promjena u odnosu na kontrolu niti u jednoj vremenskoj točki (stoga slike nisu priložene), za razliku od mozga štakora gdje je zabilježena povećana imunoreaktivnost AT8 15min, 6h i 24h nakon STZ-icv primjene približno podjednako u PC-u i HPC-u (Slike 15 A-F). S obzirom da nije bilo moguće kvantificirati rezultate zbog malog broja histoloških uzoraka moguće je samo navesti dojam da su promjene u štakorskom mozgu najizraženije u skupini od 6h, i to dominantno u HPC-u (Slika 15 C). Nešto manje su izražene promjene u PC iste skupine (Slika 15 D), uz i dalje vidljive razlike nakon 24 sata iako je aktivnost ipak nešto slabija (Slike 15 E i F).

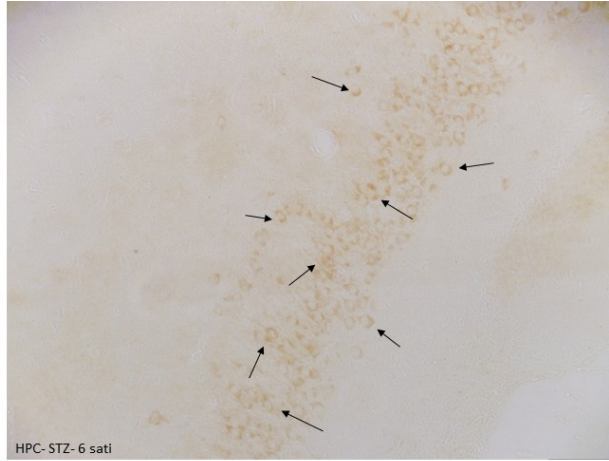
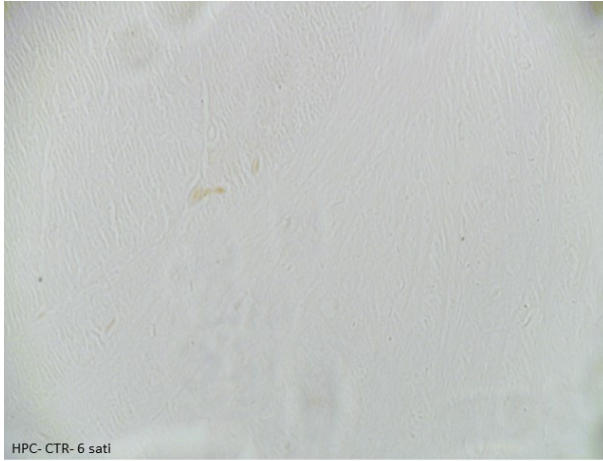


(A)

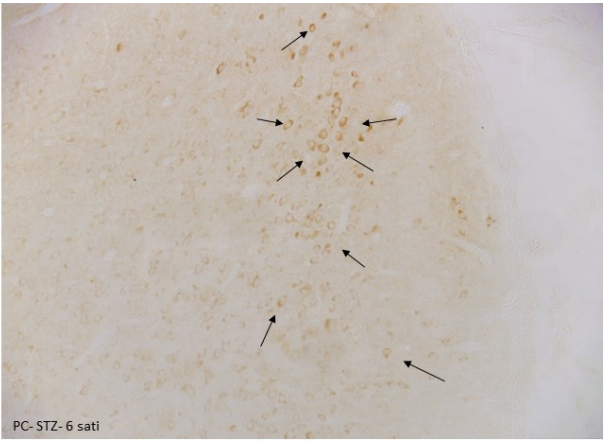
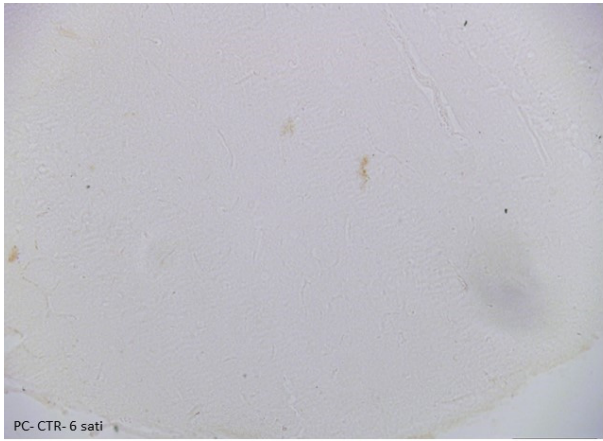


(B)

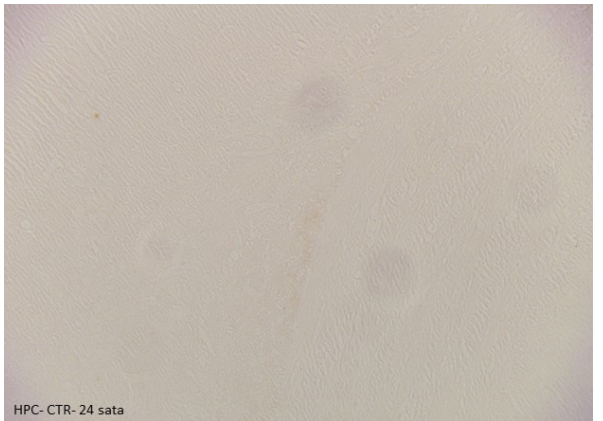




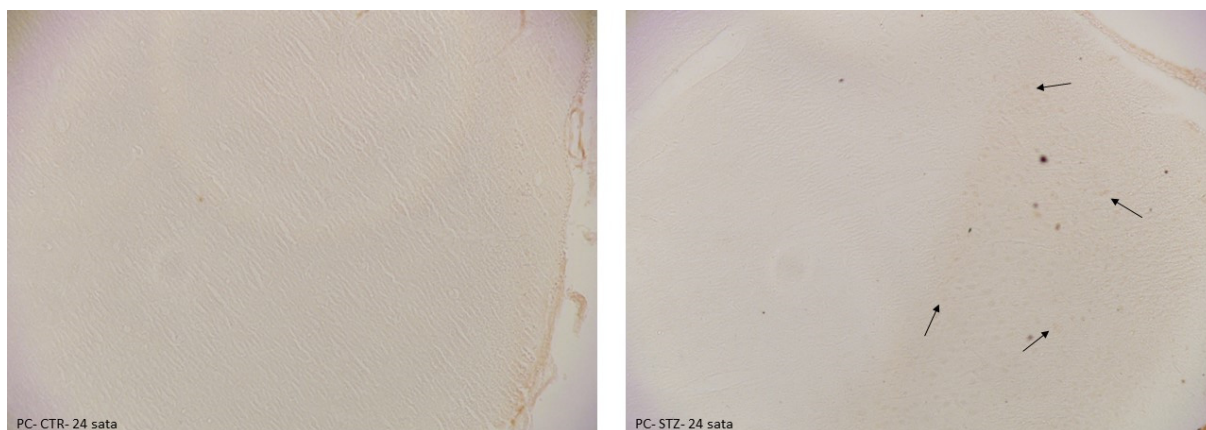
**(C)**



**(D)**



**(E)**



(F)

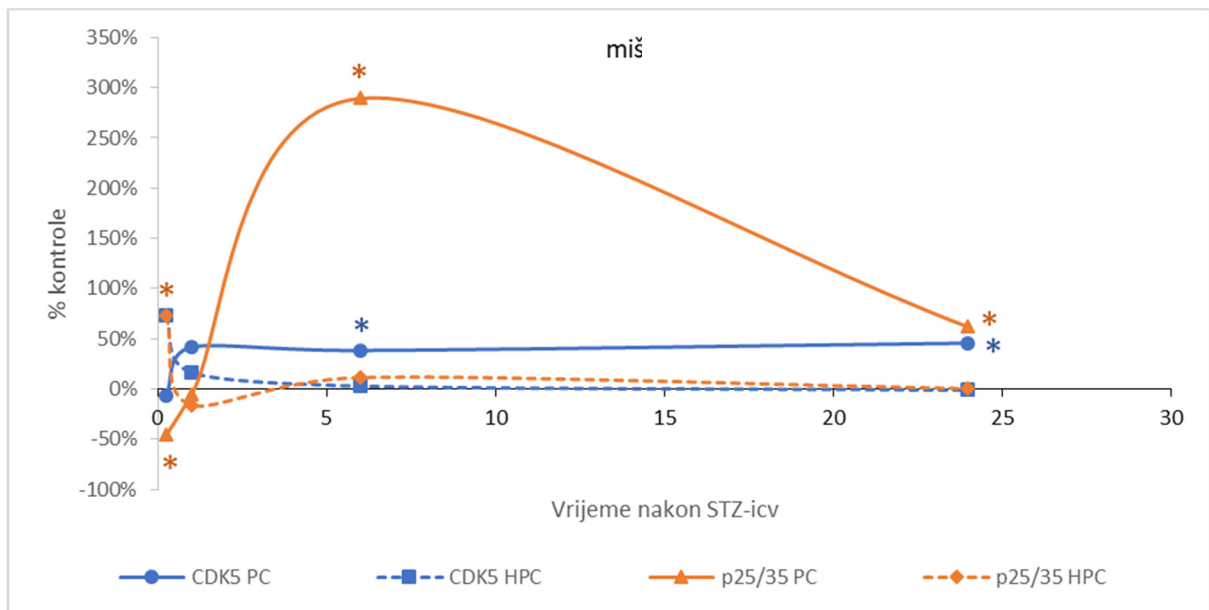
**Slika 15. A-F. Ekspresija fosforiliranog protein taua na epitopima Ser202, Thr205 (AT8) u hipokampusu (HPC) i parijatalnom korteksu (PC) štakora.** Životinje su žrtvovane 15 minuta, 1, 6 i 24 sata nakon intracerebroventrikularne primjene streptozotocina (STZ-icv) ili otapala (ctr). Prikazane su reprezentativne slike najznačajnijih promjena na kojima je vizualizirana ekspresija AT8 u HPC-u i PC-u imunohistokemijskom metodom i označena crnim strelicama. Mjerilo= 100  $\mu$ m. (A): HPC 15min CTR, STZ; (B): PC 15min CTR, STZ; (C): HPC 6h CTR, STZ; (D): PC 6h CTR, STZ; (E): HPC 24h CTR, STZ; (F) PC 24h CTR, STZ.

Kad je protein kinaza CDK5 aktivirana proteinom p25, inače skraćenim oblikom proteina p35 tada nekontrolirano fosforilira mnoge susstrate, između ostalog i protein tau na mjestu Ser202/Thr205 (AT8), stoga smo Western blot analizom izmjerili ekspresiju CDK5 proteina. U PC-u miša nađena je značajno povišena ekspresija CDK5 6h i 24h nakon STZ-icv primjene (+38% i +46%,  $p < 0,05$ ) (Slika 16 A, Tablica 7), za razliku od PC-a štakora u kojem niti u jednoj vremenskoj točki nisu nađene značajne razlike (Slika 16 B, Tablica 7). Također nije bilo značajnih razlika u CDK5 ekspresiji u razdoblju od 24h u HPC-u miša (Slika 16 A, Tablica 7). HPC štakora, s druge strane, pokazuje značajan porast ekspresije CDK5 nakon 1h od +45% ( $p < 0,05$ ), nakon čega se prati postupan pad ekspresije sve do 24h kad je snižena -25% u odnosu na kontrolu ( $p < 0,05$ ) (Slika 16 B, Tablica 7).

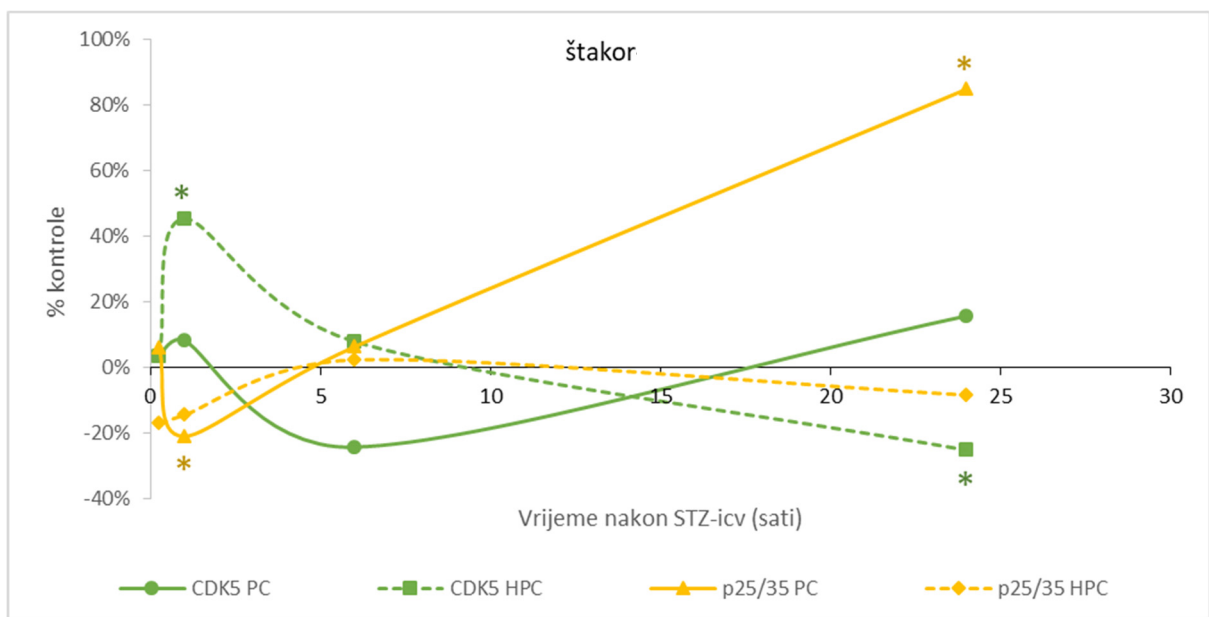
**Tablica 7. Ekspresija kinaze ovisne o ciklinu 5 i neuron- specifičnih aktivatora p25 i p35 u mozgu miša i štakora nakon intracerebroventrikularne primjene streptozotocina.**

	p25/p35		CDK5	
<b>MIŠ</b>				
	CTR	STZ	CTR	STZ
<i>15 min PC</i>	0.491±0.04	0.267±0.04 <sup>a</sup>	1.296±0.16	1.209±0.09
<i>15 min HPC</i>	0.067±0.01	0.117±0.10 <sup>a</sup>	1.887±0.31	3.273±0.85
<i>1 sat PC</i>	0.372±0.04	0.353±0.02	1.251±0.09	1.775±0.34
<i>1 sat HPC</i>	0.368±0.04	0.308±0.04	0.899±0.05	1.051±0.13
<i>6 sati PC</i>	0.054±0.02	0.213±0.03 <sup>a</sup>	0.812±0.06	1.124±0.11 <sup>a</sup>
<i>6 sati HPC</i>	0.739±0.04	0.823±0.02	1.010±0.03	1.044±0.10
<i>24 sata PC</i>	0.156±0.01	0.252±0.04 <sup>a</sup>	0.634±0.06	0.924±0.04 <sup>a</sup>
<i>24 sata HPC</i>	0.225±0.03	0.225±0.02	1.019±0.03	1.013±0.08
<b>ŠTAKOR</b>				
<i>15 min PC</i>	1.773±0.03	1.879±0.03	1.035±0.04	1.072±0.03
<i>15 min HPC</i>	0.401±0.04	0.333±0.05	0.803±0.08	0.831±0.05
<i>1 sat PC</i>	0.782±0.05	0.617±0.04 <sup>a</sup>	1.126±0.06	1.217±0.04
<i>1 sat HPC</i>	0.748±0.06	0.639±0.02	1.172±0.14	1.702±0.20 <sup>a</sup>
<i>6 sati PC</i>	1.067±0.23	1.133±0.20	0.373±0.04	0.282±0.05
<i>6 sati HPC</i>	1.422±0.09	1.453±0.07	1.141±0.09	1.230±0.13
<i>24 sata PC</i>	0.181±0.02	0.335±0.07 <sup>a</sup>	1.072±0.03	1.240±0.14
<i>24 sata HPC</i>	0.483±0.58	0.442±0.28	1.028±0.07	0.768±0.04 <sup>a</sup>

Životinje su žrtvovane 15 minuta, 1, 6 i 24 sata nakon intracerebroventrikularne primjene streptozotocina (stz) ili otapala (ctr). Ekspresija kinaze ovisne o ciklinu 5 (CDK5) i neuron specifičnih aktivatora p25 i p35, ovdje prikazana u obliku omjera (p25/p35) u hipokampusu (HPC) i parijetalnom korteksu (PC) mjerena je Western blot analizom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška srednje vrijednosti (SEM) i analizirani neparametrijskim Kruskal- Wallis i Mann-Whitney U testovima uz razinu značajnosti  $p < 0,05$ . <sup>a</sup> $p < 0,05$



(A)



(B)

**Slika 16. Ekspresija kinaze ovisne o ciklinu 5 i neuron specifičnih aktivatora p25 i p35 u parijetalom korteksu i hipokampusu miša (A) i štakora (B) nakon intracerebroventrikularne primjene streptozotocina.** Životinje su žrtvovane 15 minuta, 1, 6 i 24 sata nakon intracerebroventrikularne primjene streptozotocina (STZ-icv) ili otapala (ctr). Ekspresija ciklin ovisne kinaze 5 (CDK5) i neuron specifičnih aktivatora p25 i p35, ovdje prikazana u obliku omjera (p25/35) u hipokampusu (HPC) i parijetalnom korteksu (PC) mjerena je Western blot analizom, a svaka točka predstavlja srednju vrijednost skupine izraženu u % u odnosu na odgovarajuću kontrolu, izračunatim temeljem rezultata Tablice 14. Podaci su analizirani neparametrijskim Kruskal- Wallis i Mann-Whitney U testovima. \*  $p < 0,05$ .

Izmjerenu ekspresiju proteina p35 i njegovog skraćenog oblika p25, inače neuron-specifičnih aktivatora CDK5 izrazili smo u omjerima p25/p35, pa je tako u PC-u miša nakon 15 min ekspresija snižena -46% ( $p < 0,05$ ), potom izrazito povećana nakon 6h (+289%,  $p < 0,05$ ), da bi se tijekom ispitivanog vremena pratio postupan pad ali uz i dalje prisutnu značajnu razliku od ispitivane skupine +62% nakon 24h ( $p < 0,05$ ) (Slika 16 A, Tablica 7). Omjer p25/35 u PC-u štakora pokazuje također u ranoj fazi od 1h nakon STZ-icv primjene značajan pad od -21% ( $p < 0,05$ ), nakon čega slijedi kontinuiran rast sve do 24h kad imamo značajnu razliku od +85% ( $p < 0,05$ ) (Slika 16 B, Tablica 7). HPC miša u najranijem mjerenom razdoblju od 15min pokazuje značajan porast p25/35 omjera od +73% ( $p < 0,05$ ) nakon čega slijedi pad i približavanje srednjim vrijednostima kontrole u odnosu na koju nema značajne razlike sve do 24h (Slika 16 A, Tablica 7). U HPC-u štakora nisu nađene značajne razlike omjera p25/35 tijekom cijelog ispitivanog razdoblja (Slika 16 B, Tablica 7).

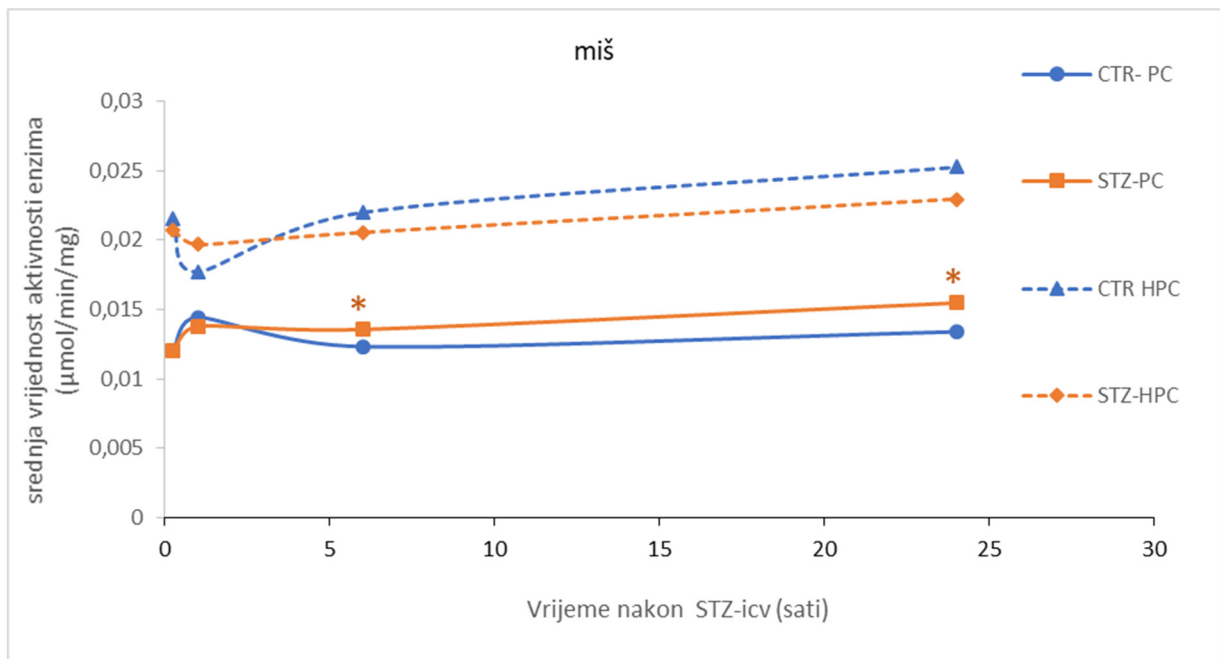
### **5.3. UTJECAJ STREPTOZOTOCINA NA ENZIME KOJI REGULIRAJU HOMEOSTAZU ACETILKOLINA**

Procjena učinka STZ-icv primjene na kolinergičnu transmisiju u mozgu miša i štakora temeljena je na analizama dva enzima ključna za homeostazu acetilkolina; ekspresiji kolin-acetiltransferaze (ChAT), enzima važnog za sintezu acetilkolina i aktivnosti acetilkolinesteraze (AChE), enzima koji razgrađuje acetilkolin. Aktivnost AChE u mozgu ovih dviju životinjskih vrsta pokazuje značajne promjene nakon STZ-icv primjene, ovisno o regiji i vremenu, a najizraženije u PC-u te slično u obje vrste životinja. U mozgu miša aktivnost AChE značajno je povišena u PC-u 6h nakon STZ-icv primjene (+10%,  $p < 0,05$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu životinja, uz daljnju blagu tendenciju porasta do +15,5% nakon 24h ( $p < 0,05$ ) (Slika 17 A, Tablica 8). Slične promjene uočene su i u istoj regiji štakora gdje se nakon 15 min u STZ-icv grupi mjeri značajan porast aktivnosti AChE od +35% ( $p < 0,05$ ) nakon čega slijedi pad aktivnosti od -18% ( $p < 0,05$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu nakon 6h, ali uz daljnju tendenciju porasta koja je nakon 24h značajno povišena na +17% ( $p < 0,05$ ), vrlo slično kao i u PC-u miša (Slika 17 B, Tablica 8). U HPC-u miša niti u HPC-u štakora nema statistički značajnih razlika između ispitivanih i kontrolnih skupina životinja u promatranom vremenu, ali se ipak uočava vrlo sličan obrazac početnog porasta aktivnosti AChE. nakon kojeg slijedi kratkotrajni pad kojeg prati polagan ali ipak jasan porast aktivnosti u HPC-u štakora. slično kao i miša (Slika 17, Tablica 8).

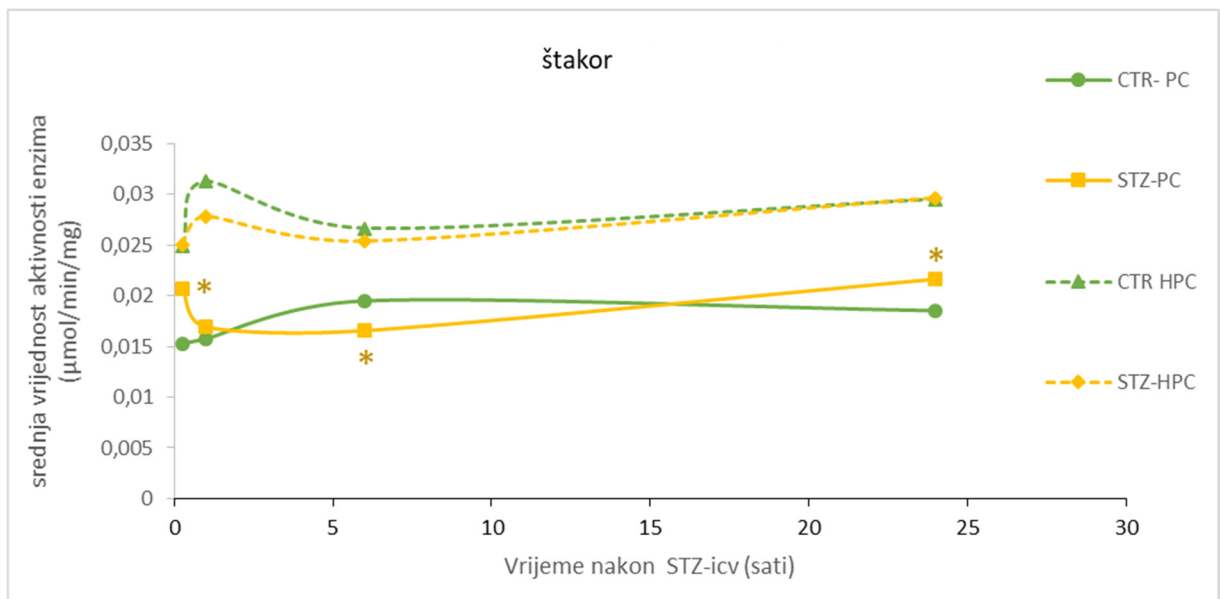
**Tablica 8. Aktivnost acetilkolinesteraze u hipokampusu i parijetalnom korteksu miša i štakora nakon intracerebroventrikularne primjene streptozotocina.**

<i>AChE</i>	MIŠ		ŠTAKOR	
	CTR	STZ	CTR	STZ
<i>15 min PC</i>	0.012±4.2 *10 <sup>-4</sup>	0.012±6,3*10 <sup>-4</sup>	0.015±7.2*10 <sup>-4</sup>	0.020±9.7*10 <sup>-4</sup> <sup>a</sup>
<i>15 min HPC</i>	0.021±10.4*10 <sup>-4</sup>	0.020±8.5*10 <sup>-4</sup>	0.025±13.3*10 <sup>-4</sup>	0.025±4*10 <sup>-4</sup>
<i>1 sat PC</i>	0.014±4.4*10 <sup>-4</sup>	0.013±4.9*10 <sup>-4</sup>	0.015±8.8*10 <sup>-4</sup>	0.017±3.7*10 <sup>-4</sup>
<i>1 sat HPC</i>	0.017±5.5*10 <sup>-4</sup>	0.019±16.5*10 <sup>-4</sup>	0.031±1.9*10 <sup>-4</sup>	0.028±16.6*10 <sup>-4</sup>
<i>6 sati PC</i>	0.012±5.9*10 <sup>-4</sup>	0.013±2.6 <sup>z</sup> *10 <sup>-4</sup> <sup>a</sup>	0.019±9.7*10 <sup>-4</sup>	0.016±8.1*10 <sup>-4</sup> <sup>a</sup>
<i>6 sati HPC</i>	0.021±19.8*10 <sup>-4</sup>	0.020±1.6*10 <sup>-4</sup>	0.026±6.9*10 <sup>-4</sup>	0.025±16.4*10 <sup>-4</sup>
<i>24 sata PC</i>	0.013±7.7*10 <sup>-4</sup>	0.015±7.1*10 <sup>-4</sup> <sup>a</sup>	0.018±11.1*10 <sup>-4</sup>	0.021±4.6 *10 <sup>-4</sup> <sup>a</sup>
<i>24 sata HPC</i>	0.025±13.3*10 <sup>-4</sup>	0.022±12.2*10 <sup>-4</sup>	0.029±15.1 *10 <sup>-4</sup>	0.029±9.4*10 <sup>-4</sup>

Životinje su žrtvovane 15 minuta, 1, 6 i 24 sata nakon intracerebroventrikularne primjene streptozotocina (STZ) ili otapala (CTR). Aktivnost acetilkolinesteraze (AChE) mjerena je kolorimetrijskom metodom u hipokampusu (HPC) i parijetalnom korteksu (PC) obje vrste životinja. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (μmol/min/mg) ± standardna pogreška srednje vrijednosti (SEM) analizirani neparametrijskim Kruskal- Wallis i Mann-Whitney U testovima uz razinu značajnosti p<0,05. <sup>a</sup>p<0,05.



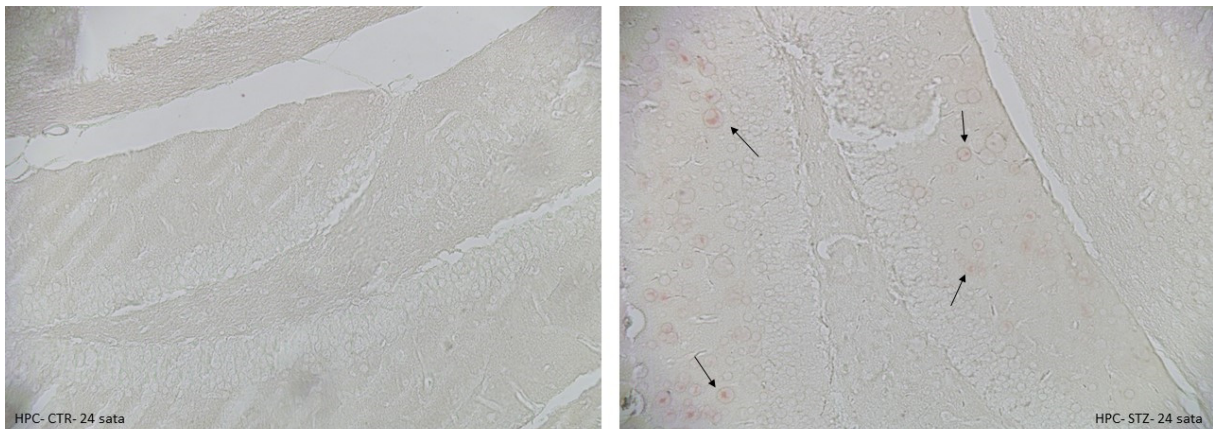
(A)



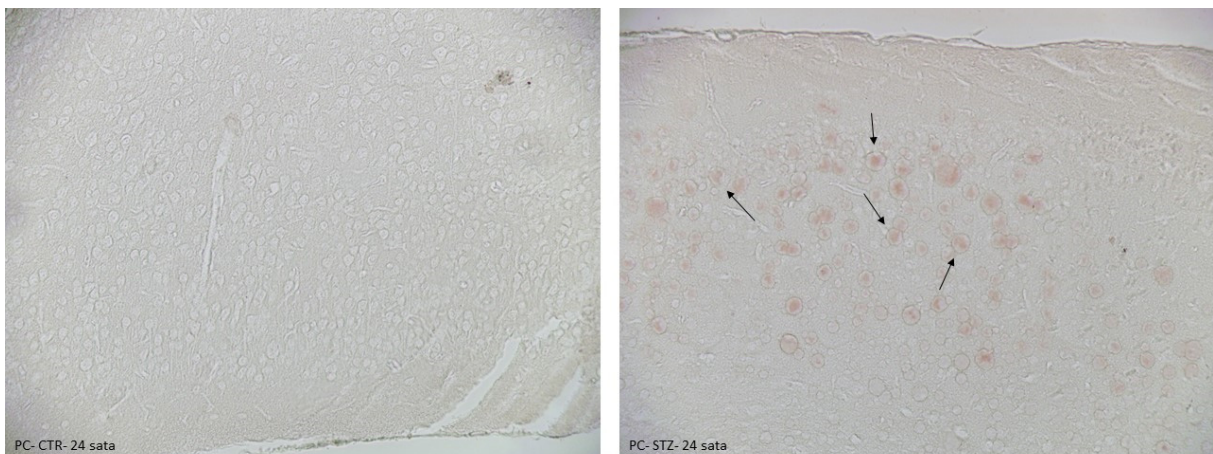
(B)

**Slika 17. Aktivnost acetilkolinesteraze u hipokampusu i parijetalnom korteksu miša (A) i štakora (B) nakon intracerebroventrikularne primjene streptozotocina.** Životinje su žrtvovane 15 minuta, 1, 6 i 24 sata nakon intracerebroventrikularne primjene streptozotocina (STZ) ili otapala (CTR). Aktivnost acetilkolinesteraze (AChE) mjerena je kolorimetrijskom metodom u hipokampusu (HPC) i parijetalnom korteksu (PC). Svaka točka predstavlja srednju vrijednost skupine. Podaci su analizirani neparametrijskim Kruskal- Wallis i Mann-Whitney U testovima. \*  $p < 0,05$ .

**Imunohistokemijskom metodom** mjerena je ekspresija ChAT u PC-u i HPC-u miša i štakora (Slike 18 i 19), a kao potvrda specifičnosti signala prikazan je ChAT imunoreaktivni signal u bazalnoj Meynert-ovoj jezgri koju primarno obilježavaju kolinergični neuroni (Slika 19 B). Rezultati upućuju da se 24h nakon aplikacije STZ-icv u ispitivanoj skupini obje vrste životinja javljaju početne promjene u smislu pojačane specifične ChAT imunoreaktivnosti, koja se doima kao nešto izraženija u PC-u miša u odnosu na štakora (Slika 18 B i 19 A). U HPC-u miša vide se tek diskretne promjene imunoreaktivnog ChAT signala koje su u potpunosti odsutne u HPC-u štakora (Slika 18 A).



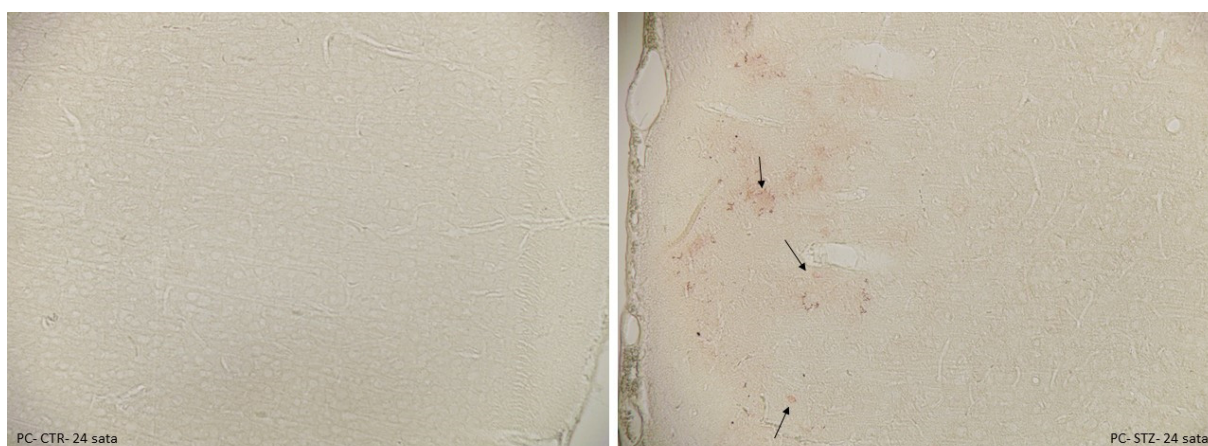
**(A)**



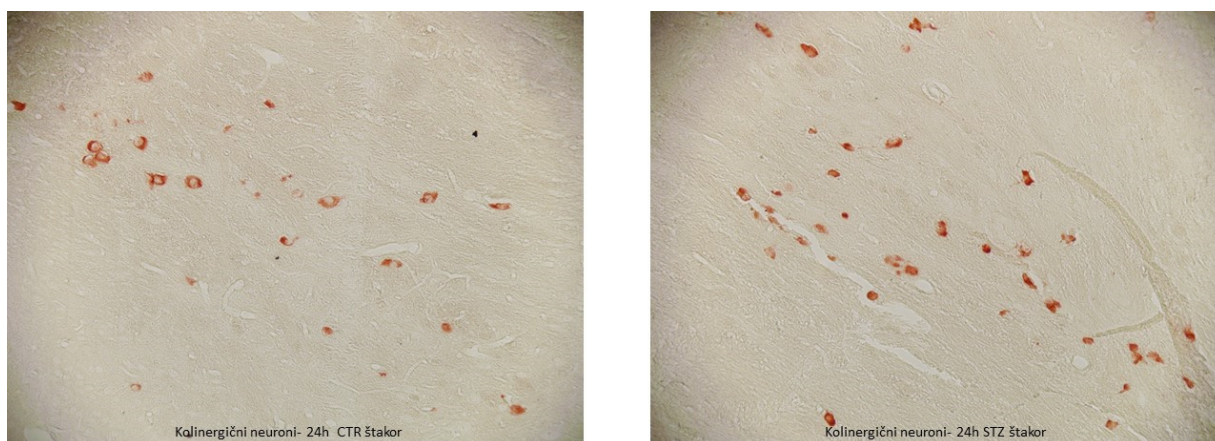
**(B)**

**Slika 18. Ekspresija kolin-acetiltransferaze metodom imunohistokemije u hipokampusu (A) i parijetalnom korteksu (B) miša tretiranih intracerebroventrikularno streptozotocinom.** Životinje su žrtvovane 24 sata nakon intracerebroventrikularne primjene streptozotocina (STZ) ili otapala (CTR). Proteinska ekspresija kolin-acetiltransferaze (ChAT) u hipokampusu (HPC) i parijetalnom korteksu (PC) vizualizirana je imunohistokemijskom metodom te su predočene reprezentativne slike pozitivnog specifičnog imunoreaktivnog signala crvene boje u HPC-u (A) i PC-u (B) označene crnom strelicom. Mjerilo = 100  $\mu$ m.





(A)



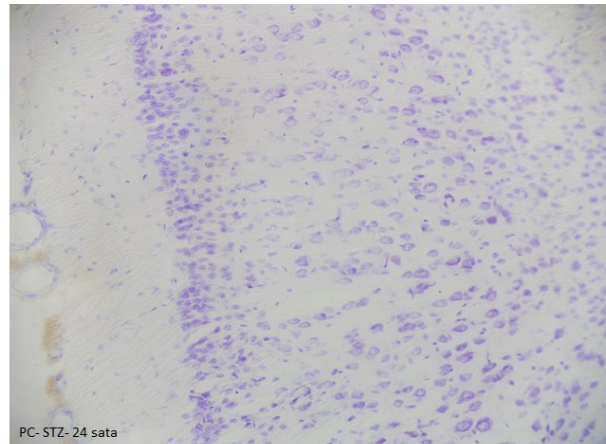
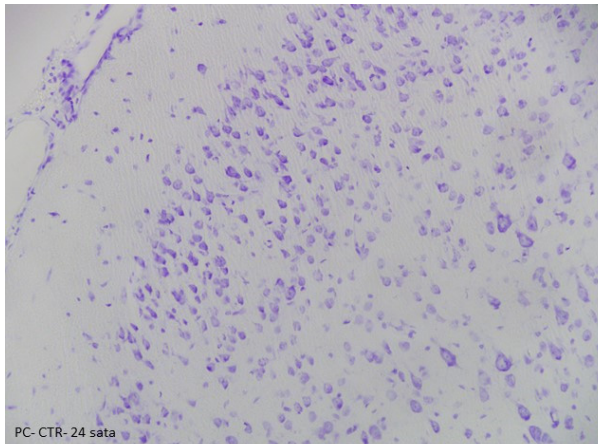
(B)

**Slika 19. Ekspresija kolin-acetiltransferaze metodom imunohistokemije u parijetalnom korteksu (A) i bazalnim jezgrama (B) štakora tretiranih intracerebroventrikularno streptozotocinom.** Životinje su žrtvovane 24 sata nakon intracerebroventrikularne primjene streptozotocina (STZ) ili otapala (CTR). Proteinska ekspresija kolin-acetiltransferaze (ChAT) vizualizirana je imunohistokemijskom metodom, te su ovdje predložene reprezentativne slike pozitivnog specifičnog imunoreaktivnog signala crvene boje u parijetalnom korteksu (PC) (A) i bazalnim Meynert-ovim jezgrama (B) 24h nakon STZ-icv. Mjerilo = 100  $\mu$ m.

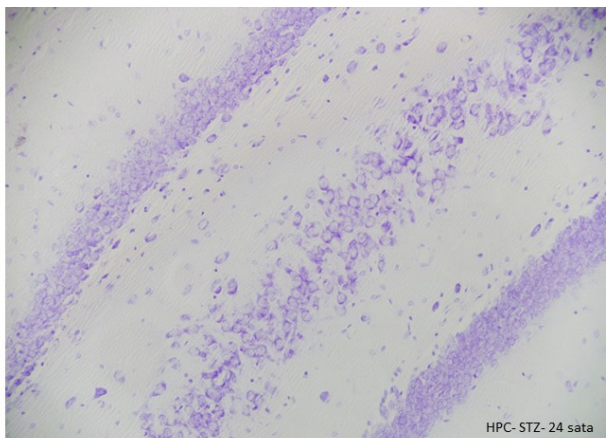
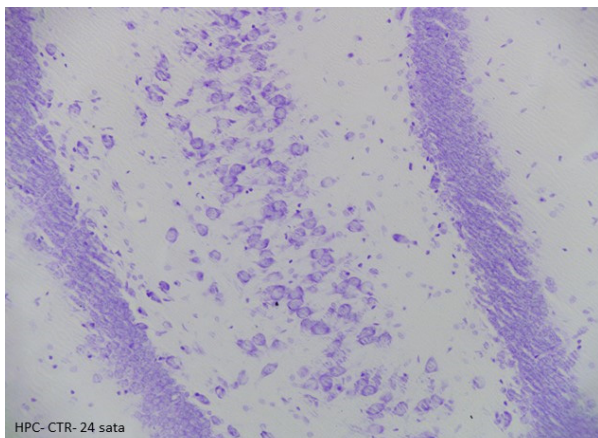
## 5.4. UTJECAJ STREPTOZOTOCINA NA ASTROGLIOZU I STRUKTURNE PROMJENE

**Nissl bojenje** koje detektira tijelo i dendrite neurona imalo je za cilj prikazati moguće morfološke promjene u vidu gubitka neurona u parijetalnom korteksu i hipokampusu unutar 24h od STZ-icv primjene u obje vrste životinja. Rezultati Nissl bojanja upućuju da u ispitivanim skupinama u navedenom vremenu u miša nema jasno vidljivih strukturnih promjena u PC-u i HPC-u u odnosu na kontrolnu skupinu (stoga slike nisu predočene). Nasuprot tome u mozgu štakora se ipak uočava početni gubitak neurona u PC-u i HPC-u ispitivane skupine, ali tek nakon 24h po STZ-icv primjeni (Slika 20 A i B).

**Imunohistokemijskom metodom** smo također ispitali i nastanak i vremenski tijek astroglioze kao pokazatelja neuroinflamacijskog procesa u mozgu miša i štakora unutar 24h od STZ-icv primjene. S obzirom na aktivaciju astrocita kao odgovora na oštećenje moždanog parenhima odredili smo ekspresiju kiselog vlaknastog proteina glije (GFAP) kao markera astroglioze u PC-u i HPC-u ispitivanih životinja. Imunoreaktivnost GFAP smo detektirali imunofluorescentnim setom te smo pozitivan signal našli u obje ispitivane regije. U PC-u miša nije primijećena razlika signala GFAP između ispitivane i kontrolne skupine u svim promatranim vremenskim točkama (stoga slike nisu prikazane). Povećana prisutnost specifičnog imunoreaktivnog GFAP uočena je u PC-u i HPC-u štakora već nakon 1h, što su pokazali preliminarni rezultati promjena nađenih u štakora koji su kao dio ovog istraživanja objavljeni u radu (215) (Slika 21), a u HPC-u ispitivanih skupina u obje vrste životinja zatim 6h i 24h nakon STZ-icv primjene (Slike 22 i 23).

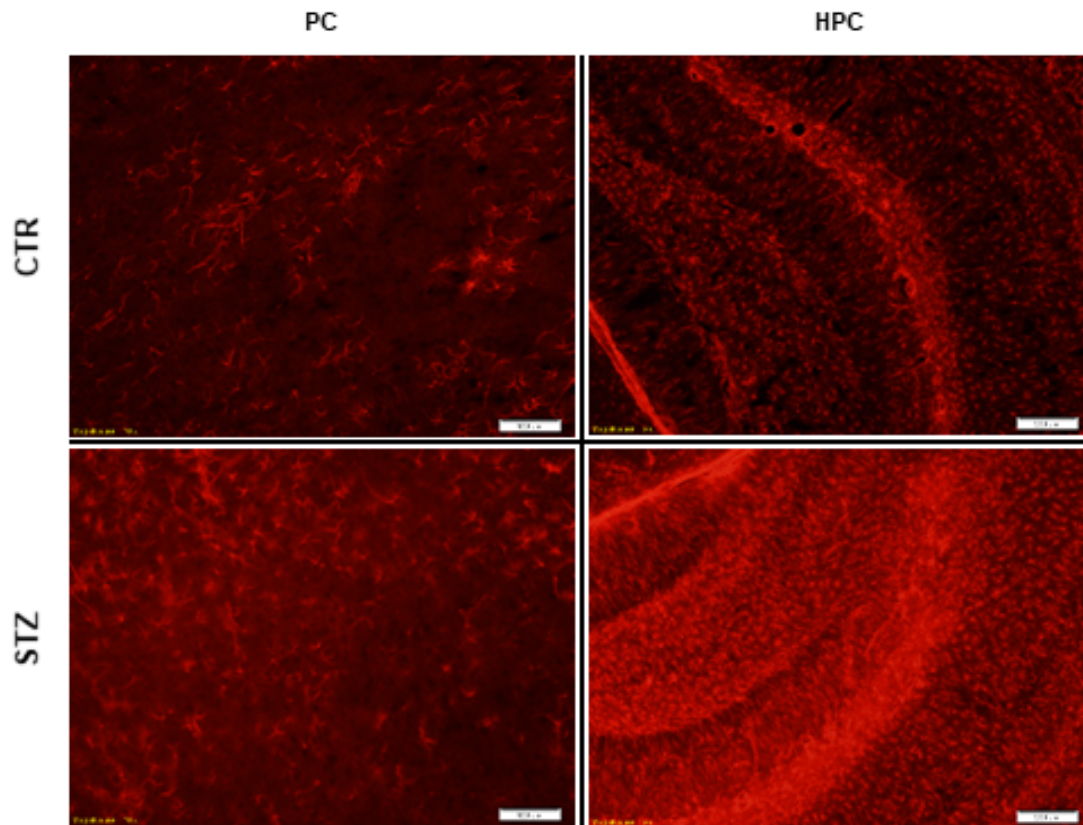


(A)

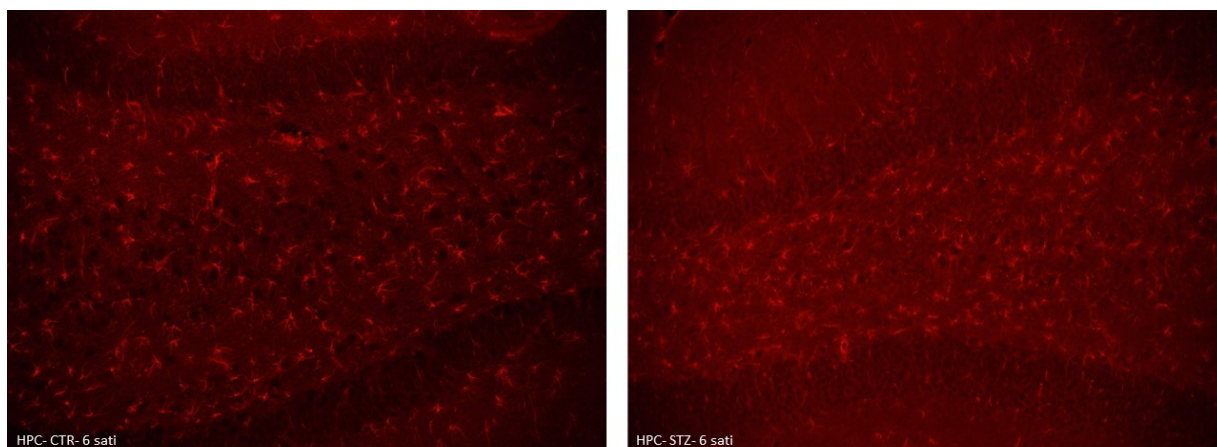


(B)

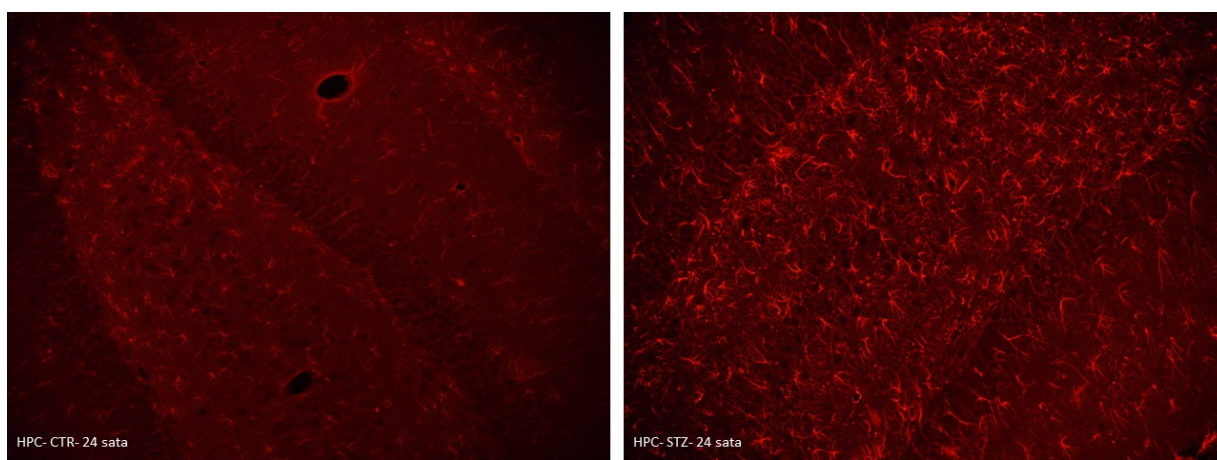
**Slika 20. Morfološke promjene prikazane Nissl bojenjem u parijetalnom korteksu (A) i hipokampusu (B) štakora tretiranih intracerebroventrikularno streptozotocinom. Životinje su žrtvovane 24 sata nakon intracerebroventrikularne primjene streptozotocina (STZ) ili otapala (CTR). Slika prikazuje Nissl bojanje reprezentativnih uzoraka tkiva na kojima su predočene promjene u parijetalnom korteksu i hipokampusu nakon 24 sata. Mjerilo = 100  $\mu$ m.**



**Slika 21.** Ekspresija kiselog vlaknastog proteina glije u parijetalnom korteksu i hipokampusu štakora 1h nakon intracerebroventrikularne (icv) primjene streptozotocina (STZ). Prezezi moždanog tkiva podvrgnuti su imunohistokemijskom postupku s protutijelom na kiseli vlaknasti protein glije (GFAP). Na slici su prikazani prezezi parijetalnog korteksa (PC) i hipokampusa (HPC) štakora 1h nakon icv aplikacije STZ ili pufera (CTR) na kojima crvena boja označava GFAP imunoreaktivnost. Mjerilo = 200  $\mu$ m. (preuzeto iz (215))

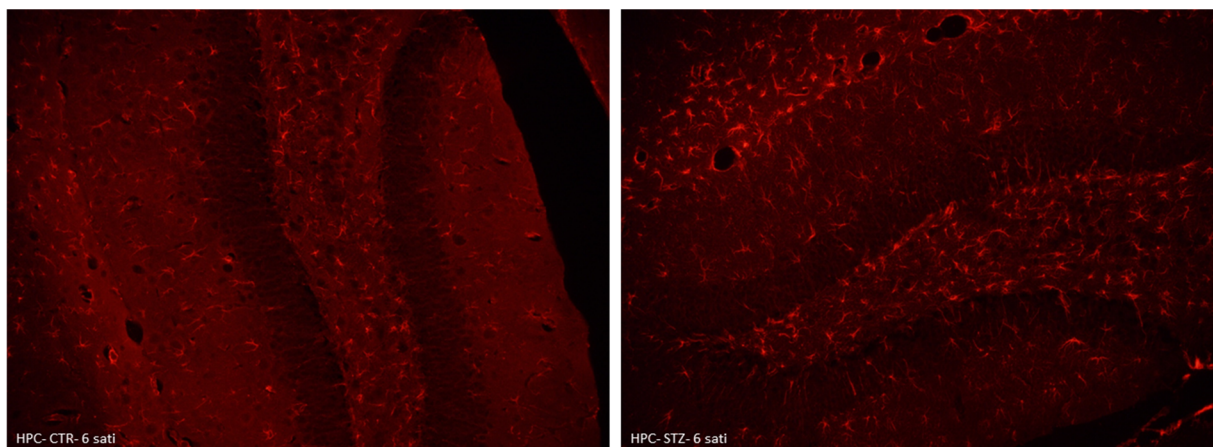


(A)

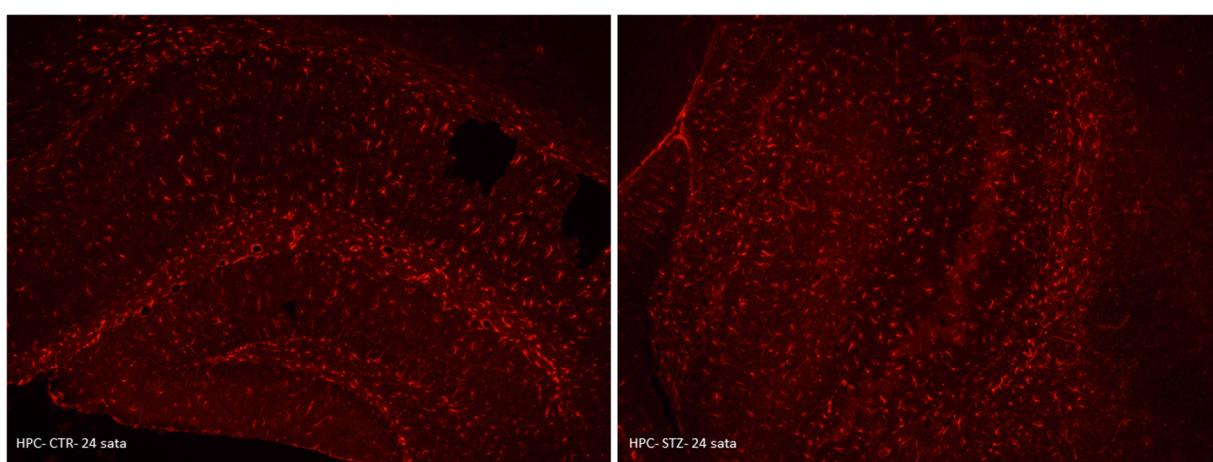


(B)

**Slika 22. Ekspresija kiselog vlaknastog proteina glije u hipokampusu štakora 6h (A) i 24 h (B) nakon intracerebroventrikularne (icv) primjene streptozotocina (STZ).** Prezezi moždanog tkiva podvrgnuti su imunohistokemijskom postupku s protutijelom na kiseli vlaknasti protein glije (GFAP). Na slici su prikazani prezezi hipokampusa (HPC) štakora 6h i 24 h nakon icv aplikacije STZ ili pufera (CTR) na kojima crvena boja označava GFAP imunoreaktivnost. Mjerilo = 100  $\mu$ m.



(A)



(B)

**Slika 23. Ekspresija kiselog vlaknastog proteina glije u hipokampusu miša 6h (A) i 24h (B) nakon intracerebroventrikularne primjene streptozotocina.** Prerezi moždanog tkiva podvrgnuti su imunohistokemijskom postupku s protutijelom na kiselu vlaknasti protein glije (GFAP). Na slici su prikazani prerezi hipokampusa (HPC) miša 6 h i 24h nakon icv aplikacije STZ ili pufera (CTR), na kojima crvena boja označava GFAP imunoreaktivnost. Mjerilo = 200  $\mu$ m.

## 6. RASPRAVA

Životinjski modeli se u laboratorijima diljem svijeta koriste za istraživanje bolesti kod ljudi. Alzheimerova bolest (AB) nije iznimka, dapače, kao neizlječiva bolest nepoznatog uzroka, dugog asimptomatskog razdoblja i konačno progresivnog tijeka koji dovodi do smrtnog ishoda, jedna je od najzastupljenijih bolesti u istraživanju na životinjskim modelima. Životinjski modeli se temelje na analogiji s patološkim procesima koji se zbivaju u ljudi, a koje pokušavamo što vjernije oponašati u životinja. U suvremenoj neuroznanosti još uvijek je veliki izazov pronaći odgovarajući AB model u životinja, jer do sada najzastupljeniji od svih modela, transgenični mišji model, ima značajne nedostatke, pogotovo kad je u pitanju etiologija i istraživanje mogućih okolišnih čimbenika i ranih promjena koji su značajni u razvoju sporadičnog oblika ove bolesti. Netransgenički štakorski model sAB-a koji je dizajniran središnjom primjenom streptozotocina (STZ-icv) (130,165) u uporabi je već skoro 30 godina, dok se mišji model dobiven istom metodom počeo koristiti u istraživanjima znatno kasnije (216). Iako literaturni podaci upućuju na moguće razlike u patologiji eksperimentalno izazvane sAB između miša i štakora (97), zanimljivo je da se ovi modeli u istraživanjima koriste alternativno, uspoređujući međusobno rezultate pojedinačnih pokusa različitih istraživačkih skupina, a da do sada nisu provedena komparativna istraživanja koja bi potvrdila identičnost promjena i opravdala alternativno korištenje mišjeg i štakorskog STZ-icv modela kao modela za sAB.

Također, nedostatak dosadašnjih istraživanja ovih modela je u fokusiranju na promjene nastale načelno samo u razdoblju od 2 tjedna do 3 mjeseca nakon aplikacije STZ-icv (217,218). Ove promjene su uglavnom istraživane na štakorskom modelu, na kojem su također provedena i opsežna praćenja histopatoških, kognitivnih i kolinergičnih promjena, kao i promjena inzulinskog sustava u mozgu tijekom razdoblja od 9 mjeseci nakon STZ-icv primjene (145,163). Međutim, s obzirom na to da STZ nakon periferne primjene djeluje na različite membranske i unutarstanične strukture i dovodi do nitrozooksidativnog stresa (135) što zatim ima dugoročne posljedice manifestirane u nastanku dijabetesa tipa 1 ili 2, ili citotoksičnog učinka npr. na poseban tumor - inzulinom, za nastanak dugoročnih promjena nakon središnje primjene izuzetno je važno ispitati akutne učinke u mozgu unutar 24 sata po primjeni. U dostupnoj literaturi nema podataka o istraživanjima provedenim u prvih 24 sata od STZ-icv primjene u mišjem modelu, dok je u štakorskom modelu ispitivana samo radna memorija

*Morris Water Maze* testom (MWM), kojim je nađeno oštećenje pamćenja 3h nakon STZ-icv (157). U oba modela do sada nisu ispitivana nikakva biokemijska, strukturna niti histopatološka obilježja unutar 24h po STZ-icv, uz izuzetak objavljenih preliminarnih rezultata naših istraživanja koji su dio ove disertacije (215). S obzirom na ove nedostatke, imajući u vidu različitu osjetljivost pojedinih životinjskih vrsta na periferno primijenjeni STZ (219), u okviru ovog doktorata provedeno je komparativno istraživanje ranih promjena u mozgu miša i štakora, na razini inzulinskog i kolinergičnog sustava, proteina tau, astroglioze i gubitka neurona.

## **6.1. PROMJENE U INZULINSKOM SUSTAVU**

Novija istraživanja sve više podupiru koncept inzulinske rezistencije u mozgu (IRBS) i središnjeg hipometabolizma glukoze kao ključnih patofizioloških događaja u sAB-u. Inzulinski sustav mozga donekle se razlikuje u glodavaca u odnosu na čovjeka jer je inzulin u miša i štakora kodiran od strane dva nezavisna gena - proinzulin I i II, oba lokalizirana na kromosomu 1 (220). Ekspresija navedenih gena je u STZ-icv modelu značajno snižena u HPC-u i korteksu štakora nakon 12 tjedana (131), a također je i dokazan smanjeni unutarstanični oksidativni katabolizam glukoze (181). Rezultati ovog istraživanja pokazuju da se poremećaj inzulinskog sustava javlja vrlo brzo nakon STZ-icv primjene, a da to osim IR uključuje i promjene ekspresije GLUT2.

Već u najranijoj fazi, nakon 15 min u korteksu miša zabilježena je značajno snižena ekspresija GLUT2 (Slika 13). Nešto kasnije, nakon 1 sat nađena je i značajno snižena razina IR u ovoj regiji, što je u skladu s rezultatima studije koji su pokazali da je GLUT2 ciljna molekula djelovanja STZ-a, te da STZ smanjuje ekspresiju GLUT2 ovisno o koncentraciji (221). Dakle, moguće se radi o direktnom toksičnom učinku STZ-a u PC-u kao kortikalnoj regiji koja je bila prva u kontaktu sa STZ prilikom primjene iglom. Ovi rezultati podupiru pretpostavku da bi mehanizam djelovanja STZ-a u mozgu akutno nakon icv primjene doista mogao biti sličan ili jednak onome na periferiji (222,223).

Prema literaturnim podacima STZ ulazi u stanicu preko GLUT2 i djeluje kao citotoksični spoj stvarajući unutar stanice slobodne radikale, dušik-II-oksidi (NO) i vodikov peroksid (135), a otpuštanje NO u  $\beta$  stanicama gušterače štakora nađeno je već 2 sata nakon tretmana STZ-om (224). Naši rezultati upućuju da bi akutna toksičnost STZ-icv prema GLUT2 u mozgu mogla



biti uzrokom posljedičnog kompenzacijskog porasta ekspresije GLUT2 uočenog nakon 24h u obje regije u obje životinjske vrste (Slike 13 A i B).

Nasuprot mišjem modelu u kojem su promjene nakon 24h različitog smjera samo u HPC-u, u mozgu štakora promjene ekspresije IR i GLUT2 pokazuju suprotan smjer u obje regije nakon 24h (Slike 12 i 13). Jedno od mogućih objašnjenja bi moglo biti da astroglia, kao jedan od markera neuroinflamacije koju uzrokuje STZ u navedenom razdoblju (Slika 22 B) stvara stanje povećane metaboličke potrebe koju stanica pokušava kompenzirati tako da poveća dotok glukoze, na način da povisi membransku ekspresiju GLUT2 (225). Također, treba uzeti u obzir mogućnost da na IR djeluje STZ ili neki biološki produkt STZ-a poput učinka oksidativnog stresa s unutarstanične strane, što može biti posljedica djelovanja STZ-a na GLUT2 kao ciljne molekule u istoj stanici. Imajući u vidu nađenu negativnu korelaciju ekspresije navedenih proteina u ranoj fazi po STZ-icv primjeni, potrebno je u budućim istraživanjima dodatno istražiti moguće interakcije između GLUT2 i IR. Također, u našim istraživanjima mjerena je samo ekspresija IR, a ne i tirozin-kinazna aktivnost IR koja također može neizravno utjecati na ekspresiju IR. Naime, literaturni podaci upućuju da je periferna primjena STZ-a u pokusima u kojima se promatrao rani učinak STZ na  $\beta$  stanice gušterače, dovela do povećanja ukupne ekspresije IR, uz smanjenu autofosforilaciju (226), što se možda ne može u potpunosti isključiti kao jedan od mogućih uzroka povećane ekspresije IR u PC-u miša nakon 24 h.

Ekspresija IR pokazuje vremensku i regionalnu specifičnost; promjene u miša nastaju ranije i izraženije su u korteksu, za razliku promjena u hipokampusu koje nastaju kasnije i suprotnog su smjera od onih u korteksu. Slična regionalna specifičnost promjena IR (snižena aktivnost u HPC-u, povišena u korteksu) nađena je i u kasnijem vremenskom razdoblju, 3 mjeseca nakon STZ-icv u štakora (139). Što se tiče usporedbe između vrsta, u HPC-u su promjene IR u miša i štakora načelno iste, dok se za korteks ne može isključiti moguća razlika u osjetljivosti na STZ među dvije vrste s obzirom da promjene u PC-u štakora nisu pokazale značajnu razliku u promatranom vremenu.

Translacija rezultata dobivenih u ova dva modela u tako akutnom vremenu nakon STZ-icv primjene nije primjenjiva na bolesnika s AB-om, s obzirom na to da u njih nije moguće akutno uočavanje promjena. Poremećaji IR nađeni postmortalno u pacijenata oboljelih od AB slični su promjena IR nađenima u STZ-icv životinjskim modelima koji bi vremenski približno odgovarali ranom ili umjerenom stadiju AB u ljudi (131,134). Ekspresija GLUT2 proteina je slabo ispitana u mozgu pacijenata oboljelih od AB-a, a dostupni rezultati postmortalne analize

pokazuju povećanu ekspresiju GLUT2 u frontalnom korteksu (227), koja se povezuje moguće s promjenama ekspresije GLUT2 na astrocitima i eventualnom kompenzacijskom reakcijom, što svakako indicira da promjene ovog proteina u mozgu mogu imati ulogu u AB patofiziologiji i potrebno ih je dalje ispitati.

Podaci dosadašnjih istraživanja o utjecaju STZ-icv na elemente signalnog puta na koje se putem aktiviranog IR dalje širi signal, značajno su oskudniji u mišjem modelu od onih u štakorskom modelu, a poremećaji regulacije nađeni su 10 tjedana nakon STZ-icv primjene u HPC-u miša (147). Plaschke i suradnici su opisali oštećenje signalnog puta IR 6 mjeseci nakon STZ-icv aplikacije u transgeničnom tg2576 mišjem modelu s ekspresijom ljudskog  $\beta$ APP sa švedskom mutacijom (171). Vezanje inzulina na IR uzrokuje aktivaciju dva paralelna signalna puta, preko fosfatidilinozitol-3-kinaze (PI3K) i protein kinaze aktivirane mitogenom (MAPK) (179). Fosforilacija PI3K dalje aktivira protein-kinazu B (Akt/PBK) koja potiče GLUT4 na translokaciju na membranu i povećanje unosa glukoze u stanicu (228), a dodatno fosforilira izoenzime GSK3 $\alpha$  i GSK3 $\beta$ . Oba izoenzima su značajan čimbenik u daljnjem prijenosu signala važnom za niz staničnih funkcija, od kojih su za potrebe ovog istraživanja posebno važni oni uključeni u patofiziologiju AB-a. GSK3 $\beta$  izoforma igra važnu ulogu u fosforilaciji proteina tau (229) i to na način da je fosforilirani oblik (pGSK3 $\beta$ ) inaktivan i time je uključen u proces kontrolirane fosforilacije proteina tau, dok nefosforilirani oblik postaje aktivan i posljedično nekontrolirano hiperfosforilira protein tau (230,231).

U HPC-u štakora u našim istraživanjima izmjeren je značajan pad omjera fosforiliranog i ukupnog GSK3 $\beta$  (p/tGSK3 $\beta$ ) 24h nakon STZ-icv, što indirektno upućuje da postoji porast aktivnosti GSK3 $\beta$  u navedenom vremenu. Smanjena fosforilacija GSK3 $\beta$  moguće je povezana s padom ekspresije IR nađenim u istoj regiji i istom vremenskom razdoblju, jer oštećenje aktivnosti IR i posljedično njegovog signalnog puta dovodi do smanjenja fosforilacije GSK3 $\beta$ , time i pada p/tGSK3 $\beta$  (232). U PC-u štakora u našem je istraživanju zabilježena također sklonost padu ovog omjera, premda nije bila statistički značajna, a ova sklonost također je pratila tendenciju pada ekspresije IR u istoj regiji, što dodatno podupire mogućnost interpretacije naših rezultata o postojanju pozitivne korelaciji smanjene ekspresije IR i omjera p/t GSK3 $\beta$ .

Do sada dostupni podaci u STZ-icv štakorskom modelu pokazuju pojačanu aktivnost GSK3 $\beta$  u vidu pada omjera p/tGSK3 $\beta$  istraženom najranije 2 tjedna nakon STZ-icv u HPC (140,233), potom 1 mjesec i 3 mjeseca nakon STZ-icv (163,234) što je u skladu s dobivenim rezultatima i

može upućivati da se trend porasta aktivnosti GSK3 $\beta$  uočen nakon 24h u našim rezultatima nastavlja daljnjim tijekom vremena nakon STZ-icv primjene. U HPC-u štakora su promjene IR i GSK3 $\beta$  izraženije nego u PC-u iste vrste iako su uočene u krajnje promatranoj vremenskoj točki od 24h post STZ-icv. To je također u skladu s istraživanjima koja su 1 mjesec nakon STZ-icv primjene u štakora detektirala značajne promjene IR u HPC-u ali ne i u korteksu (139,233), te da su promjene GSK3 $\beta$  izraženije u HPC-u nego u korteksu (233).

Promjene omjera p/tGSK3 $\beta$  u mozgu mišjeg modela bile su podložne izraženijim fluktuacijama po pojedinim vremenskim točkama u odnosu na iste u štakora ali također upućuju da je porast aktivnosti ovog enzima u HPC-u u pozitivnoj korelaciji sa smanjenom ekspresijom IR. Rezultati, stoga, upućuju da su u sustavu IR/GSK3 $\beta$  promjene po smjeru korelacije načelno slične u HPC-u miša i štakora, dok nasuprot tome u PC-u miša rezultati više upućuju u smjeru porasta ekspresije IR uz istovremeni izostanak promjena omjera p/tGSK3 $\beta$  nakon 24h (Slika 12). Iz objavljenih istraživanja na mišjem modelu, mjesec dana po STZ-icv aplikaciji zabilježeno je smanjenje ekspresije pGSK3 $\beta$  mjereno u čitavoj hemisferi mozga, a ne po pojedinim regijama te nije moguće zaključiti jesu li postojale regionalne specifičnosti u promjenama (169).

Teško je spekulirati zbog čega su promjene IR/GSK3 $\beta$  nađene u PC-u miša različite u odnosu na one u HPC-u miša ili pak u mozgu štakora. Moguće da su fluktuacije u ekspresiji navedenih proteina u PC-u miša rezultat blizine uboda injekcije STZ i njegovog ranog toksičnog učinka. Osim toga, mora se uzeti u obzir da osim aktivacije IR signalizacije, važnu ulogu u regulaciji ekspresije GSK3 $\beta$  imaju i drugi receptori i signalni putovi koji nisu ispitivani u našim istraživanjima, a velikim dijelom niti u istraživanjima ostalih istraživačkih grupa te su moguće odgovorni za nekonzistentnost rezultata o ekspresiji GSK3 $\beta$  u STZ-icv modelu (17,139,235). U ljudi oboljelih od AB postmortalno je nađena povećana aktivnost GSK3, što je ekvivalent smanjenog omjera p/tGSK3 (236).

Signalna kaskada IR može utjecati i na IDE - metaloendoproteazu koja razgrađuje inzulin i amilod beta (A $\beta$ ) u mozgu. Inzulin aktivira signalni put IR koji potom pozitivno regulira ekspresiju IDE, što može objašnjavati naizgled paradoksalnu poveznicu između sniženog inzulina u mozgu i povišenog A $\beta$  (237). U pokusima na štakorskom STZ-icv modelu snižena ekspresija IDE u HPC-u je nađena najranije 21 dan nakon STZ –icv (238), a potom 1, 3 i 9 mjeseci nakon STZ-icv primjene (163). U ovom istraživanju nije zabilježena značajna promjena ekspresije IDE unutar 24h u PC-u niti jedne vrste životinja (Slika 13). Pad ekspresije 1h nakon

STZ-icv primjene u miša blizu je statističke značajnosti, a s obzirom da je u istom vremenu i istoj regiji izmjeren pad ekspresije IR, može se pretpostaviti da bi oštećenje signalnog puta IR moglo biti mogući uzrok pada ekspresije IDE. Iako u štakora nije bilo promjena ekspresije IDE niti u HPC-u, u miša je 6 sati nakon STZ-icv primjene razina IDE u HPC-u bila značajno povišena, dok u istoj vremenskoj točki nije bilo promjene ekspresije IR, te nije moguće spekulirati o korelaciji ekspresije ovih dvaju parametara.

Ispitivanja ekspresije IDE u mišjem STZ-icv modelu gotovo i da nema u dostupnoj literaturi. Do sada su najranije promjene ispitane 2,5 mjeseca nakon STZ-icv aplikacije u transgeničnih miševa (5XFAD model), ali nije nađena promjena ekspresije IDE (239). S obzirom na sve navedeno, nije moguće donijeti konkretan zaključak. Za promjene ekspresije IDE, iako oskudne, u pravilu možemo reći da su vrlo slične između regija, slične među vrstama s gotovo istom bifazičnom tendencijom u promatranom vremenu.

S obzirom na to da je inzulin u mozgu dijelom uključen i u metabolizam glukoze (240), promjene funkcioniranja inzulinskog sustava mogle bi se razmatrati i kao jedan od mogućih uzroka hipometabolizma glukoze u mozgu u sAB-u. Praćenje metabolizma glukoze u mozgu pacijenata sAB u FDG-PET studijama pokazalo je oštećenje u parijetotemporalnom i frontalnom korteksu te hipokampusu (60). Hipometabolizam glukoze u mozgu nije potpuno razjašnjen, ali izgleda da je prije uzrok nego posljedica neurodegeneracije jer prethodi kognitivnoj disfunkciji mnogo godina unaprijed (93,94) i do sada je najranije izmjeren poremećaj povezan s AB-om (92). FDG-PET studije provedene su i u STZ-icv modelu ne samo u glodavaca (241) nego i u majmuna (242), te je nađen smanjen metabolizam glukoze u mozgu. Biokemijskim metodama su u mozgu štakora do sada istražene promjene metabolizma glukoze najranije 3 tjedna po STZ-icv administraciji, kad je nađena značajno smanjena iskoristivost glukoze (178), te 6 tjedana nakon STZ-icv kad je nađena također smanjena iskoristivost glukoze u korteksu i HPC-u (165).

## **6.2. PROMJENE U FOSFORILACIJI PROTEINA TAU**

Hiperfosforilacija proteina tau jedna je od glavnih patoloških značajki AB-a. Regulacija fosforilacije odvija se preko protein-kinaza i fosfataza, a među značajnijim kinazama koje sudjeluju u fosforilaciji proteina tau su GSK3 $\beta$  i CDK5 (243). Fosforilirajući mnoge značajne

supstrate, CDK5, prolinom usmjerena serin-treonin protein kinaza igra važnu ulogu u fiziološkom razvoju središnjeg živčanog sustava. Aktivira se neuron-specifičnim aktivatorima p35 i njegovom skraćenom formom p25 (244). Spoj p35/CDK5 je neuroprotektivan (245), a p35 se cijepa na p10 i p25, od kojih potonji zatim aktivira CDK5. Spoj p25/CDK5 puno je stabilniji od spoja p35/CDK5, time i aktivniji te nekontrolirano fosforilira brojne supstrate. Za patofiziologiju AB-a najvažnija je fosforilacija proteina tau na mjestima Ser202/Thr205 (AT8) (246) ali literaturni podaci upućuju da bi omjer p25/CDK5 možda mogao imati utjecaj i na aktivnost GSK3 $\beta$  (244,247,248). Omjer ekspresije p25 i p35 (p25/35) kao važan neizravni pokazatelj aktivnosti CDK5 mjerili smo u našem istraživanju.

Slično prethodno navedenim promjenama omjera p/t GSK3 $\beta$ , naši rezultati upućuju da su promjene omjera p25/35 u mišjem modelu daleko izraženije u PC-u nego u HPC-u. Bifazičnog su tijeka sa značajno sniženim vrijednostima neposredno nakon STZ-icv primjene (15 min) nakon čega slijedi značajni porast u vremenskim točkama 6h i 24h. Ovaj porast je praćen sličnim tijekom i smjerom promjena CDK5 u istoj regiji. Sve zajedno ovi nalazi upućuju na pojačanu aktivnost p25/CDK5 u navedenom 24-satnom razdoblju ali samo u ovoj regiji mozga mišjeg modela, s obzirom na to da osim značajnog pada omjera p25/35 i ekspresije CDK5 nakon 15min, u HPC-u miša u kasnijem tijeku nisu zabilježene značajne razlike unutar 24h. Ove rezultate nije moguće usporediti izravno s literaturnim podacima jer u literaturi do sada nema objavljenih istraživanja o ekspresiji proteina CDK5 u STZ-icv mišjem modelu, ali je ekspresija gena CDK5 značajno snižena u korteksu miša 6 tjedana nakon STZ-icv, dok u hipokampusu nije nađena značajna promjena ekspresije gena u istom razdoblju (249). Na pokusima provedenim na transgeničnim miševima (P301S) otkriveno je da akumulacija p25, što je analogno rastu omjera p25/35 u našem istraživanju, rezultira poremećajem aktivacije CDK5 i indukcijom brojnih patoloških zbivanja poput neuroinflamacije, gubitka sinapsi, akumulacije A $\beta$  i hiperfosforilacije tau (250). Navedena istraživanja podupiru nalaze da p25/CDK5 igra značajnu ulogu u taupoatiji u eksperimentalnoj i humanoj AB (251).

Slično mišjem modelu, u STZ-icv štakorskom modelu u našim istraživanjima, promjene su također izraženije u PC-u nego u HPC-u. U PC-u je omjer p25/35 nakon 1h snižen, a 24h nakon STZ-icv značajno povišen, dakle sličnog bifazičnog obrasca kao promjene u istoj regiji miša, ali one nisu bile praćene značajnim promjenama u ekspresiji CDK5 u ovoj regiji (Slika 16 B). U HPC-u štakora nije izmjereno značajnih promjena omjera p25/35, što je donekle slično kao u miša, ali je unatoč tome ekspresija CDK5 značajno povišena nakon 1h, te značajno snižena nakon 24h post STZ-icv.

Od podataka o ekspresiji CDK5 i p25/35 u STZ-icv štakorskom modelu, kojih gotovo i da nema u dostupnoj literaturi, možemo izdvojiti kongresni sažetak rada iz našeg laboratorija gdje je ekspresija CDK5 bila je značajno snižena 2 tjedna nakon STZ-icv (272). Mali broj radova pokazuje da se CDK5 istraživao u ostalim štakorskim AB modelima. U modelu izazvanom intracerebralnom primjenom  $A\beta_{(1-40)}$  i ibotenične kiseline (IBO) u hipokampusu štakora su nakon 4 tjedna izmjerene povišene vrijednosti CDK5 (252). Na kulturi stanica štakorskog hipokampusa prekomjerna ekspresija CDK5 uzrokovala je smanjenje ekspresije IDE i rezultirala smanjenjem uklanjanja  $A\beta$  i posljedično povećanjem nakupljanja  $A\beta$  (253). Nadalje, p25/CDK5 uzrokuje poremećenu fosforilaciju APP koja utječe na stvaranje  $A\beta$  koji potom doprinosi abnormalnoj aktivnosti CDK5 i time stvara začarani krug koji okida daljnja patološka zbivanja u AB-u (244).

Sumarno se može zaključiti da promjene u vidu pojačane ekspresije CDK5 i povišenog omjera p25/35 prate međusobno vrlo sličan obrazac u mozgu miša, u obje regije, ali jasnije u PC-u i najizraženije 24h nakon STZ-icv što govori u prilog pojačane aktivnosti p25/CDK5 u ovom patološkom stanju, opisane do sada u literaturi (244). U usporedbi s mišem, sličan obrazac promjena CDK5 i p25/35 se vidi i u mozgu štakora, pogotovo u PC-u gdje je i najbližnji među vrstama.

Pojačana aktivacija CDK5 dovodi do disfunkcije mitohondrija i oksidativnog stresa, što dovodi do smrti neurona i posljedično pada ekspresije CDK5 koja također utječe na apoptozu i time čini začarani krug (244). Stoga su potrebna buduća istraživanja koja bi pratila tijek promjena CDK5 i korelaciju ovih promjena s drugim parametrima u svrhu otkrivanja njihove dugoročne interakcije.

Kao što je navedeno, CDK5 sudjeluje u fosforilaciji proteina tau na mjestima Ser202/Thr205 (AT8) (246,254), što predstavlja jedan od najranije zabilježenih događaja u patologiji proteina tau, u fazi prije formiranja neurofibrilarnih snopića i agregacije, dok je takav hiperfosforilirani tau još uvijek topiv i nalazi se u proksimalnom aksonu (26). Isto potvrđuju i nalazi u ranoj fazi blagog kognitivnog oštećenja (MCI), kad je samo imunoreaktivnost AT8 pronađena u entorinalnom korteksu i temporalnom izokorteksu (10). U našim je istraživanjima omjer AT8 i ukupnog proteina tau (AT8/tTAU) u PC-u miša pokazao značajan porast nakon 1h i 24h, što može biti posljedica povećane ekspresije p25/CDK5 nađene u istoj regiji, dok su promjene u HPC-u načelno bile suprotnog smjera (pad AT8/tTAU nakon 6h i 24h), upućujući na regionalnu specifičnost u osjetljivosti na STZ-icv primjenu u ovom ranom razdoblju. Ispitivanjem

imunoreaktivnosti AT8 imunohistokemijskom metodom u obje regije mišijeg mozga nakon STZ-icv primjene nismo uočili promjene u odnosu na kontrolu niti u jednoj vremenskoj točki. Većina mjerenih parametara u HPC-u miša, između ostalih i druga izoforma fosforiliranog proteina tau koju smo mjerili - PHF13, pokazuju 6h nakon STZ-icv suprotnu tendenciju početnih promjena. Jedno od mogućih objašnjenja je da se radi o pokušaju kompenzacije početnih promjena uzrokovanih toksičnim djelovanjem STZ-a.

Najranija vremenska točka u kojoj su u dostupnoj literaturi ispitivane promjene fosforilacije proteina tau u modelu STZ-icv miša je 14 dana nakon STZ-icv aplikacije. U tom vremenu je nađen povećan omjer fosforiliranog tau na Ser199/202 i ukupnog tau (148). Fosforilacija proteina tau je također bila povišena 2,5 mjeseca nakon STZ-icv na epitopima Ser199/202 i Thr205 (147). U transgeničnom modelu miša s prekomjernom ekspresijom p25/CDK5 nađena je hiperfosforilacija AT8 i PHF1 (Ser396/404) u HPC-u nakon 3 mj, ali uz zaključak da p25/CDK5 uzrokuje navedene promjene neposredno, preko regulacije aktivnosti GSK3 $\beta$  (255,256).

U našim istraživanjima putem Western blot analize nije bilo promjena omjera AT8/tTAU u PC-u štakora u promatranom vremenu, dok je u HPC-u zabilježen značajan porast ovog omjera 24h nakon STZ-icv. Imunohistokemijske analize načelno su poduprle ove rezultate jer je u mozgu štakora zabilježena povećana imunoreaktivnost AT8, uz dojam da su promjene najizraženije u skupini od 6h i 24h u HPC-u, a nešto manje izražene u PC iste skupine. S obzirom na to da je omjer p/tGSK3 $\beta$  nakon 24h značajno snižen, dakle pojačana je aktivnost ovog enzima u štakorskom HPC-u, a GSK3 $\beta$  također dijelom može fosforilirati AT8 (257), ne možemo isključiti da je prekomjerna aktivacija GSK3 $\beta$  možda razlog povišene fosforilacije proteina tau na AT8 epitopu nađene 24h nakon STZ-icv primjene. Do sada najranije istražena povećana imunoreaktivnost AT8 u štakorskom STZ-icv modelu je uočena u PC i HPC nakon 1 mj i ostaje značajno povišena do 9 mjeseci (145). Povišena razina fosforiliranog proteina tau na Ser199/202 nađena je 15 dana po STZ-icv u štakorskom neokorteksu i bazalnim ganglijima, ali bez značajne promjene u hipokampusu (157).

Fosforilacija proteina tau na Ser396 (PHF13) smatra se jednom od ključnih koja rezultira odvajanjem proteina tau od mikrotubula, potičući auto-agregaciju proteina tau i formiranje filamenata (254). Dosadašnja istraživanja sugeriraju da se fosforilacija PHF13 odvija preko GSK3 $\beta$ , ali i neposredno preko CDK5 i p25 koji utječu na aktivnost GSK3 $\beta$  (255). U našim istraživanjima omjer PHF13/tTAU pokazuje sličan tijek promjena, dijelom bifazičnog oblika u

obje ispitivane regije u obje vrste životinja. Omjer p/tGSK3 $\beta$ , koji neposredno govori o aktivnosti GSK3 $\beta$  u istom razdoblju nije pokazao smjer promjena u mozgu miša koje bi bile u skladu s ovdje zabilježenim porastom PHF13/tTAU u PC-u i HPC-u i do sada opisanim rezultatima u drugim studijama. Moguće je da u tako ranoj fazi toksični učinak STZ-a djeluje na fluktuaciju ekspresije raznih proteina, a kako je i ranije navedeno, do sada je u više navrata opisana nekonzistentnost promjena GSK3 $\beta$ , te su potrebna daljnja ispitivanja za konkretnije zaključke.

U mozgu štakora promjene PHF13/tTAU omjera gotovo su identične u HPC-u i PC-u, te su izraženije nego u mozgu miša. Aktivnost GSK3 $\beta$  također je povišena 24h nakon STZ-icv u HPC štakora, što može biti razlog uočenog porasta PHF13/tTAU u ovoj vremenskoj točki. Prema dostupnoj literaturi, do sada je fosforilacija proteina tau na PHF13 epitopu mjerena i nađena povišenom najranije 21 dan nakon STZ-icv primjene u mozgu štakorskog modela (162), a u HPC-u nakon 3 mjeseca (259). Međutim, U HPC-u štakora je povišena fosforilacija tau na epitopima Ser396/404 nađena već nakon 2 tjedna, a pretpostavljeno je da bi mogla biti posljedica oštećenja signalnog puta IR (163,258). U skopolamin-modelu AB u mozgu štakora je izmjerena je povišena fosforilacija PHF13 uz povišenu aktivnost GSK3 $\beta$  (254).

Od svih do sada ispitivanih parametara u našem istraživanju najizraženije razlike među vrstama su nađene upravo u fosforilaciji proteina tau. Štakor se doima osjetljiviji na ovu vrstu patologije od miša, s obzirom na to da je najranija promjena zabilježena u mozgu štakora upravo porast PHF13/tTAU i javlja se već 15min nakon aplikacije STZ-icv, jednako u PC i HPC. U HPC-u miša i štakora se nalaze gotovo suprotne tendencije kad je fosforilacija proteina tau u pitanju, slično kod AT8 i PHF13. S obzirom na navedene razlike među vrstama i moguće dugoročne promjene koje mogu uslijediti, za bolju karakterizaciju modela, potrebno je provesti daljnje pokuse vezane za fosforilaciju proteina tau na različitim epitopima i u različitim regijama mozga, posebno u ranoj fazi nakon primjene STZ-icv.

### **6.3. PROMJENE U KOLINERGIČNOM SUSTAVU**

Najdosljedniji poremećaj neurotransmisije nađen u AB je poremećaj kolinergičnog sustava. Gubitak ChAT u Meynertovim bazalnim jezgrama (9), poremećaj AChE (43) i korelacija između gubitka kolinergičnih neurona, poremećene kolinergične neurotransmisije i



kognitivnog deficita (44), dovela je do kolinergične hipoteze AB (45). Glavna funkcija AChE je da brzo hidrolizira ACh na kolinergičnim sinapsama (52) pa se sukladno tome u liječenju AB-a nastojalo povećati kolinergičnu transmisiju razvojem AChE inhibitora, koji su do danas najkorišteniji i uz memantin, jedini lijekovi za AB (53). Stoga je i detektiranje promjena kolinergičnog sustava u mozgu neposredno nakon STZ-icv primjene važno za karakterizaciju ovog modela, pogotovo stoga što se kolinergični sustav ne smatra ciljnom metom STZ-a.

Naša istraživanja aktivnosti AChE upućuju na očiglednu regionalnu specifičnost promjena, s obzirom na to da u HPC-u miša i štakora nije zabilježeno značajnih promjena aktivnosti AChE. S druge strane, značajan porast aktivnosti AChE u PC-u miša izmjeren je nakon 6h i 24h po STZ-icv primjeni, uz tendenciju daljnjeg porasta, što upućuje na rano oštećenje kolinergičnog sustava nakon STZ-icv, izraženo u moždanom korteksu. Do sada su najranije promjene kolinergičnog sustava na mišjem modelu uočene 5. dan nakon STZ-icv u vidu porasta aktivnosti AChE (150). U transgeničnom mišu s prekomjernom ekspresijom AChE vidljivo je progresivno kognitivno propadanje (48).

Naši rezultati pokazuju da je u PC-u štakora aktivnost AChE značajno povišena već nakon 15 min, iza čega slijedi prolazni pad aktivnosti nakon 6h, moguće kao posljedica kompenzatornih mehanizama koji zatim postaju nedostadni jer dolazi do ponovnog značajnog porasta aktivnosti AChE 24h nakon STZ-icv primjene. U dosadašnjim istraživanjima najranije promjene aktivnosti AChE u štakorskom STZ-icv modelu su ispitivane nakon 1 tjedan, kad je u HPC-u izmjerena povišena aktivnost AChE, a prethodila je nastanku kognitivnih poremećaja, dok je u korteksu istog modela značajan porast aktivnosti uočen tek nakon 6 mjeseci (273). Rezultati drugih skupina pokazuju da je 3 tjedna nakon STZ-icv primjene u HPC-u i korteksu štakora također zabilježen porast AChE (260), zajedno s padom ekspresije IR (161,175).

Smanjen energetskei metabolizam i sinteza acetyl-CoA u konačnici rezultira kolinergičnim deficitom i oštećenjem memorije, što je u suglasnosti s nađenim promjenama u ranijim studijama (261). Imunoreaktivnost ChAT u Meynertovim bazalnim jezgrama nije pokazala značajne razlike u promatranom vremenu u obje vrste životinja u našem istraživanju, dok je dojam da su vidljive razlike signala ChAT u PC-u tek nakon 24h, slične u miša i štakora. Ekspresija ChAT-a 24h nakon STZ-icv mjerena Western blot analizom pokazala je značajno sniženje ekspresije u HPC-u štakora, dok nije bilo značajne promjene u PC-u, kao niti promjene u mišjem mozgu u obje regije. U istraživanju drugih autora provedenom na mišjem STZ-icv modelu, razina ChAT-a se u HPC-u nije značajno mijenjala unutar 21 dan (148), dok su rezultati

mjerenja u ovoj regiji u štakorskom modelu pokazali sniženje nakon 14 dana (262) i 21 dana (151). Ovi rezultati upućuju na postojanje dugoročnih razlika u kolinergičnoj transmisiji u mozgu između mišjeg i štakorskog modela.

Zaključno, temeljem rezultata dva ključna enzima za homeostazu acetilkolina, rezultati naših istraživanja upućuju da poremećaj kolinergične aktivnosti pokazuje regionalnu specifičnost u vidu izraženijih promjena kolinergičnog deficita u korteksu, jednako u obje vrste životinja, s također sličnom tendencijom pogoršanja nakon 24 sata.

#### **6.4. PROMJENE U STRUKTURI I ASTROGLIOZA**

Neuroinflamacija je jedna od najranije izraženih promjena u mozgu oboljelih od AB-a, koja uključuje aktivaciju glija-stanica, i to uglavnom astrocita (263). Astrocitoza je u pacijenata s MCI i blagom AB dokazano rani fenomen, sudeći prema PET analizi (264). Novija istraživanja upućuju da neuroinflamacija posredovana aktivacijom astrocita doprinosi neurodegeneraciji, a moguće je i glavna značajka bolesti (265). Astrocitoza se tipično karakterizira povišenom ekspresijom GFAP (265). Studije na ljudima su pokazale da se odgovor astrocita mjeren povišenom ekspresijom GFAP javlja rano u odnosu na razvoj neuropatologije u AB-u (266).

Naša su istraživanja pokazala pojavu i progresiju astrogilozе 6h i 24h nakon STZ-icv primjene u obje vrste životinja u vidu povećanog signala imunoreaktivnosti GFAP u HPC-u. Uzroci neuroinflamacije bi se mogli objasniti literaturnim podacima da 24-satna inkubacija STZ u astrocitima štakorskog mozga uzrokuje citotoksičnost, otpuštanje NO, slobodnih kisikovih radikala, porast formiranja malondialdehida i deficit glutaciona (267). Prethodna istraživanja sugeriraju da je oštećenje uzrokovano primjenom STZ u lateralne ventrikule ograničeno u područja mozga blizu mjesta injekcije (184,268). U našem istraživanju, astroglioza u blizini mjesta gdje je STZ otpušten - HPC je bila izraženija u usporedbi s kontrolom kojoj je injiciran citratni pufer, a u istraživanju u kojem su objavljeni i preliminarni rezultati koji su dio ove disertacije vidljivo je da se astroglioza javlja već 1h nakon STZ-icv i to u PC-u i HPC-u štakora (215). Osim navedenih rezultata, s obzirom na ipak kratak period nakon STZ-icv teško je uspoređivati ostale literaturne podatke, kad su promjene promatrane tjednima ili mjesecima nakon STZ-icv (131). U štakorskom STZ-icv modelu je uočen porast ekspresije GFAP nakon 2 tjedna u HPC-u (262), dok je u mišjem STZ-icv modelu nakon 6 tjedana izmjerena povećana

ekspresija GFAP difuzno, u gotovo svim regijama mozga (269). Sumarno, na temelju naših istraživanja možemo zaključiti da se astroglioza javlja rano, već 1h nakon STZ-icv u korteksu štakora ali ne i miša, s daljnjim vremenski i regionalno specifičnim tijekom izraženim promjena u HPC-u obje vrste životinja.

U svezi strukturnih promjena, obdukcija preminulih bolesnika koji su bolovali od AB-a pokazuje, gotovo bez iznimke, izraženu atrofiju mozga uz posljedično povećanje ventrikula i izraženu atrofiju hipokampusa. Mikroskopski pregled mozga pokazuje gubitak neurona i značajan gubitak sinapsi, koji se smatra najznačajnijim patohistološkim korelatom kognitivnog propadanja, te se smatra da je stupanj gubitka sinapsi direktno povezan s funkcionalnim oštećenjem (6,41). Analiza strukturnih promjena u humanom mozgu u ranim stadijima nije moguća jer bolest još nije dijagnosticirana, stoga su nalazi u eksperimentalnih modela izrazito vrijedni za razumijevanje nastanka i tijeka patofiziologije AB-a. U štakorskom STZ-icv modelu je nakon mjesec dana uočen blagi ali značajni gubitak kortikalne mase u PC-u, a 9 mj nakon STZ-icv značajno stanjenje korpus kalozuma i korteksa (145). Slične promjene, povezane s oštećenim kognitivnim statusom su nađene i u ljudi (270,271).

Naši rezultati nissl bojenja nisu pokazali morfološke promjene u mišjem mozgu u promatranom vremenu, u obje regije. Slično odsustvo jasne razlike u morfologiji nađeno je i u štakorskom mozgu, iako je dojam da nakon 24h postoji početan gubitak neurona izraženije u PC-u nego HPC-u. Međutim, s obzirom na mali broj histoloških uzoraka rezultate nije bilo moguće kvantificirati. Zaključno, u razdoblju do 24h po aplikaciji STZ-icv morfološke razlike nisu jasno uočljive niti u jedne od ispitivanih vrsta životinja, bez razlika u vremenu i regijama.

## **6.5. USPOREDBA MJERENIH PARAMETARA U ŠTAKORSKOM I MIŠJEM STZ-icv MODELU**

Razlike i sličnosti između izmjerenih parametra u mišjem i štakorskom STZ-icv modelu unutar 24h po STZ-icv primjeni navedene su u Tablici 9. Sumarno, za većinu mjerenih parametara promjene su prisutne samo u jednoj vrsti životinja (=/\*) i ta je razlika puno izraženija u parijetalnom korteksu nego u hipokampusu, posebno u najranijem razdoblju do 1h, dok se tendencija nastajanja promjena istog smjera (+) počinje uočavati tek 24h nakon STZ-icv

primjene. Pri interpretaciji rezultata, međutim, ne treba zaboraviti anatomske razlike u veličini mozga, debljini korteksa i veličini lateralnih moždanih komora, koje su mogle dijelom utjecati na razlike u rezultatima uočene u miša i štakora tretiranih istom dozom STZ-a računatom po mg/kg tjelesne težine, a ne po mg/kg težine mozga. Unatoč tome, a imajući u vidu da se iste doze koriste u istraživanjima ostalih, ovi rezultati promjena uočenih unutar 24h ne podupiru u potpunosti hipotezu disertacije temeljenu na literaturnim podacima duljih opservacijskih vremenskih točaka, da su promjene među ova dva modela načelno slične.

**Tablica 9. Usporedba promjena u parijetalnom korteksu (PC) i hipokampusu (HPC) miša i štakora nakon intracerebroventrikularne primjene streptozotocina.**

	PC				HPC			
	15 min	1h	6h	24h	15 min	1h	6h	24h
<b>IR</b>	=	=/*M	=/*M	=/*M	=	=	=	+
<b>IDE</b>	=	=	=	=	=	=	=/*M	=
<b>GLUT2</b>	=/*M	=	=	=/*Š	=/*M	=/*Š	=/*M	+
<b>GSK3β</b>	=/*M	=/*M	=	=	=	=	=/*M	=/*Š
<b>AT8</b>	=	=/*M	=	=/*M	=	=	=/*M	-
<b>PHF13</b>	=/*Š	=/*M	=	=/*Š	=/*Š	=/*M	=/*M	=/*Š
<b>CDK5</b>	=	=	=/*M	=/*M	=	=/*Š	=	=/*Š
<b>P25/35</b>	=/*M	=/*Š	=/*M	+	=/*M	=	=	=
<b>AChE</b>	=/*Š	=	-	+	=	=	=	=

„+“ značajne promjene su zabilježene u obje vrste i u istom su smjeru. „-“ značajne promjene su zabilježene u obje vrste ali u suprotnim smjerovima. „/\*“ značajne promjene su zabilježene samo u jednoj vrsti- M- miš, Š- štakor; „=-“ bez značajnih promjena u obje vrste. IR- inzulinski receptor; IDE- enzim koji razgrađuje inzulini; GLUT2- nosač za glukozu 2; GSK3β- glikogen sintaza kinaza 3 beta; AT8- fosfo-tau (Ser202/Thr205); PHF13- fosfo-tau (Ser 396); CDK5- kinaza ovisna o ciklinu 5; p25/35- neuron specifični aktivatori p25 i p35; AChE- acetilkolinesteraza.

## 7. ZAKLJUČCI

1. **Rezultati istraživanja potvrđuju prvi dio hipoteze da intracerebroventrikularna primjena streptozotocina unutar 24 sata dovodi do neurokemijskih i strukturnih promjena u mozgu čiji nastanak pokazuje vremensku i regionalnu specifičnost.** Međutim, rezultati istraživanja ne podupiru drugi dio hipoteze da su promjene u mišjem i štakorskom modelu slične.
  - **Promjene u mozgu miševa i štakora nakon STZ-icv primjene su regionalno specifične i izraženije u PC-u nego u HPC-u,** često uz velike fluktuacije, posebno u miša, što je moguće posljedica blizine mjesta injektiranja STZ-a.
  - **Promjene su također ovisne o vremenu:**
    - **svi ispitivani parametri pokazuju značajne promjene već unutar 1h po STZ-icv primjeni barem u jedne vrste životinja,** poglavito u PC-u, dok se u HPC-u značajne promjene javljaju većim dijelom od 6h do 24h po STZ-icv primjeni
    - **većina izmjerenih parametara u HPC-u miša pokazuje bifazičan vremenski uzorak promjena unutar 24h;** akutnu promjenu u jednom smjeru nakon koje slijedi povratak prema kontrolnim vrijednostima i zatim prijelaz u promjenu suprotnog smjera od početne, što upućuje na moguću tendenciju kompenzacije ranih toksičnih učinaka STZ koja, prema mjerenju u 24h, uglavnom nije pokazala pozitivan ishod.
    - **tendencija promjena u istom smjeru u obje životinjske vrste može se uočiti tek 24h** po STZ-icv primjeni ali tek za mali broj parametara.
  - **Osovina oštećenja signalnog puta IR** (snižen IR → povećana aktivnost GSK3 $\beta$  → povećana fosforilacija tau na mjestima PHF13 i AT8) najizraženija je u HPC-u štakorskog STZ-icv modela nakon 24h. S obzirom na to da štakor ima 6 izoformi proteina tau kao i čovjek moglo bi se zaključiti da bi štakorski STZ-icv model mogao bolje oponašati promjene IR signalnog puta u sAB-u od mišjeg modela.
  - **Interakcije između GLUT2 i IR upućuje na negativnu korelaciju ekspresije ovih proteina,** izraženiju u štakorskom modelu.

- **Fosforilacija proteina tau najizraženija je razlika među vrstama;** štakor se doima osjetljiviji na nastanak tau patologije od miša jer se fosforilacija na epitopu PHF13 javlja već nakon 15 min, jednako u PC i HPC.
  - **Poremećaj kolinergične aktivnosti najbliži je među vrstama; pokazuje regionalnu specifičnost u vidu izraženijih promjena u PC,** s također sličnom tendencijom pogoršanja nakon 24 sata.
  - **Promjene ekspresije CDK5 i p25 su najizraženije nakon 24h, i to dominantnije u PC i načelno slične u obje vrste.**
  - **Astrogliaza se javlja rano, već nakon 1h i pokazuje regionalnu specifičnost, izraženijih promjena u HPC,** jednaku u obje vrste životinja i progredira s vremenom, dok morfološke razlike nisu jasno uočljive niti u jedne od ispitivanih vrsta životinja u promatranom vremenu.
2. **Mozak štakora manje je osjetljiv na učinak STZ-a od miša unutar prvih 24h nakon STZ-icv primjene;** za većinu ispitivanih promjena značajne su se razlike uočavale kasnije u promatranom vremenu ili nisu bile značajno promijenjene, te nisu pokazivale velike fluktuacije tijekom vremena za razliku od miša.
  3. **Između mišjeg i štakorskog STZ-icv modela postoje određene razlike u ispitivanim parametrima unutar 24h po STZ-icv primjeni koje ne podupiru alternativnu uporabu ovih modela kao istog modela za sAB dok se ne provedu dodatna komparativna istraživanja tjeka i progresije patoloških promjena povezanih s AB-om u ovim modelima.**

## 8. SAŽETAK

Alzheimerova bolest (AB) je neizlječiva neurodegenerativna bolest koju klinički obilježava oštećenje kognicije i ponašanja, a neuropatološki nakupljanje senilnih plakova, neurofibrilarnih snopića i gubitak neurona. Najčešći je sporadičan oblik bolesti (sAB) s dugim pretkliničkim tijekom i nepoznatim uzrokom. Intracerebroventrikularni streptozotocinski model (STZ-icv) jedan je od netransgeničnih životinjskih modela koji oponašaju humanu sAB. Cilj istraživanja je bio ispitati rane promjene unutar 24h u mozgu miša i štakora, na razini signalnog puta inzulinskog receptora, fosforilacije proteina tau, kolinergičnog sustava te morfoloških i strukturnih promjena. Promjene načelno pokazuju regionalnu specifičnost izraženiju u parijetalnom korteksu (PC), pogotovo u mišjem modelu, i vremensku specifičnost - svi mjereni parametri promijenjeni su 1h po STZ-icv primjeni, najizraženije nakon 24h. Ekspresija inzulinskog receptora (IR) i nosača za glukozu 2 (GLUT2) upućuje na negativnu korelaciju, jasnije izražnu u štakorskom modelu koji je i osjetljiviji na nastanak tau patologije od mišjeg. Aktivnost acetilkolinesteraze (AChE) je izraženija u PC-u. Astroglia se javlja 1h po STZ-icv i izraženija je u hipokampusu (HPC), dok morfološke promjene nisu zabilježene. Mozak štakora manje je osjetljiv na toksičnost STZ-icv od mišjeg te bolje oponaša humane promjene signalnog puta IR u sAB-u. Između ova dva STZ-icv modela postoje razlike koje ne podupiru alternativnu uporabu ovih modela kao istog, zbog čega su potrebna dodatna komparativna istraživanja.

**Ključne riječi:** Alzheimerova bolest; Streptozotocin; Miš; Štakor; Inzulinski sustav; Protein Tau; Kolinergični sustav; Astroglia

## 9. SUMMARY

### **Early changes in the brain induced by central administration of streptozotocin in the experimental model of sporadic Alzheimer's disease**

**Andrija Lončar, 2020.**

Sporadic Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia, which has a long presymptomatic stage and is of unknown cause. Main characteristics of sAD are cognitive dysfunction, impaired cholinergic transmission, accumulation of senile plaques, neurofibrillary tangles and loss of neurons. We aimed to explore early alterations within 24h in insulin receptor signaling pathway, phosphorylation of tau proteins, cholinergic system, morphological and structural changes in rats and mice treated intracerebroventricularly with streptozotocin (STZ-icv), proposed as a representative sAD model. All measured parameters were altered 1h after STZ-icv, but most pronounced changes were found after 24 hours. Changes were also region-specific and more pronounced in the parietal cortex (PC) than in the hippocampus (HPC), being more clearly expressed in the mice model. The expression of insulin receptor (IR) and glucose transporter 2 (GLUT2) is showing a negative correlation. Rat seems to be more sensitive to hyperphosphorylation of tau protein than the mice. Acetylcholinesterase (AChE) activity is more elevated in PC. Astrogliosis is most pronounced in HPC and occurs 1h post STZ-icv. The rat brain seems to be less sensitive to STZ-icv pathology than the murine one and mimics changes in the human brain IR signaling pathway better. Observed differences do not support the alternative use of these two rodent models as a one model for sAD.



## 10. POPIS LITERATURE

1. Alzheimer A. Über einen eigenartigen schweren Erkrankungsprozeß der Hirnrinde. *Neurol Zentralblatt*. 1906; 23: 1129–36
2. Brookmeyer R, Corrada MM, Curriero FC, Kawas C. Survival following a diagnosis of Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2002; 59(11):1764-7
3. Alzheimer's association. 2019 Alzheimer's Disease Facts and Figures Includes a Special Report on Alzheimer's Detection in the Primary Care Setting: Connecting Patients and Physicians. *Alzheimer's & Dementia* Volume 15, Issue 3. 2019.
4. Wimo A, Prince M. World Alzheimer Report 2010. *Dementia*. 2010; 9(1):1-11.e3
5. Mucke L. Neuroscience: Alzheimer's disease. *Nature*. 2009; 461(7266):895-7
6. Perl DP. Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mount Sinai Journal of Medicine*. 2010; 77(1):32-42
7. Hoyer S. Glucose metabolism and insulin receptor signal transduction in Alzheimer disease. *Eur J Pharmacol*. 2004; 490(1-3):115-25
8. Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends in Pharmacological Sciences*. 1991; 12(10):383-8
9. Whitehouse PJ, Price DL, Clark AW, Coyle JT, DeLong MR. Alzheimer disease: Evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Ann Neurol*. 1981; 10(2):122-6
10. Šimić G, Babić Leko M, Wray S, Harrington C, Delalle I, Jovanov-Milošević N, et al. Protein tau hyperphosphorylation and aggregation in alzheimer's disease and other tauopathies, and possible neuroprotective strategies. *Biomolecules*. 2016; 6(1):6
11. Grieb P. Intracerebroventricular Streptozotocin Injections as a Model of Alzheimer's Disease: in Search of a Relevant Mechanism. *Molecular Neurobiology*. 2016; 53(3):1741-1752
12. De Felice FG, Lourenco M V., Ferreira ST. How does brain insulin resistance develop

- in Alzheimer's disease? *Alzheimer's and Dementia*. 2014; 10(1 Suppl):S26-32
13. De La Monte SM, Tong M. Brain metabolic dysfunction at the core of Alzheimer's disease. *Biochemical Pharmacology*. 2014; 88(4):548-59
  14. Chen Y, Deng Y, Zhang B, Gong CX. Deregulation of brain insulin signaling in Alzheimer's disease. *Neuroscience Bulletin*. 2014; 30(2):282-94
  15. Hoyer S. Oxidative metabolism deficiencies in brains of patients with Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand*. 1996; 165:18-24
  16. Frölich L, Blum-Degen D, Bernstein HG, Engelsberger S, Humrich J, Laufer S, et al. Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *J Neural Transm*. 1998; 105(4-5):423-38
  17. Steen E, Terry BM, Rivera EJ, Cannon JL, Neely TR, Tavares R, et al. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease - Is this type 3 diabetes? *J Alzheimer's Dis*. 2005; 7(1):63-80
  18. Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW. Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J Mol Biol*. 1977; 116(2):227-47
  19. Jeganathan S, Von Bergen M, Mandelkow EM, Mandelkow E. The natively unfolded character of Tau and its aggregation to Alzheimer-like paired helical filaments. *Biochemistry*. 2008; 47(40):10526-39
  20. Sierra-Fonseca JA, Gosselink KL. Tauopathy and neurodegeneration: A role for stress. *Neurobiology of Stress*. 2018; 9:105-112
  21. Goedert M, Spillantini MG. Molecular neuropathology of Alzheimer's disease: In situ hybridization studies. *Cell Mol Neurobiol*. 1990; 10(1):159-74
  22. Dujardin S, Bégard S, Caillierez R, Lachaud C, Delattre L, Carrier S, et al. Ectosomes: A new mechanism for non-exosomal secretion of Protein tau. *PLoS One*. 2014; 9(6):e100760
  23. Morrison JH, Hof PR. Life and death of neurons in the aging brain. *Science* (80- ). 1997; 278(5337):412-9
  24. Bierer LM, Hof PR, Purohit DP, Carlin L, Schmeidler J, Davis KL, et al. Neocortical

- neurofibrillary tangles correlate with dementia severity in Alzheimer's disease. *Arch Neurol.* 1995; 52(1):81-8
25. Hipp MS, Park SH, Hartl UU. Proteostasis impairment in protein-misfolding and -aggregation diseases. *Trends in Cell Biology.* 2014; 24(9):506-14
  26. Braak H, Thal DR, Ghebremedhin E, Del Tredici K. Stages of the pathologic process in alzheimer disease: Age categories from 1 to 100 years. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2011; 70(11):960-9
  27. De Strooper B, Karran E. The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. *Cell.* 2016; 164(4):603-15
  28. Ferrone F. Analysis of protein aggregation kinetics. *Methods Enzymol.* 1999; 309:256-74
  29. Glabe CG, Kaye R. Common structure and toxic function of amyloid oligomers implies a common mechanism of pathogenesis. In: *Neurology.* 2006; 66(2 Suppl 1):S74-8
  30. Meisl G, Kirkegaard JB, Arosio P, Michaels TCT, Vendruscolo M, Dobson CM, et al. Molecular mechanisms of protein aggregation from global fitting of kinetic models. *Nat Protoc.* 2016; 11(2):252-72
  31. Iadanza MG, Jackson MP, Hewitt EW, Ranson NA, Radford SE. A new era for understanding amyloid structures and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2018; 19(12):755-773
  32. Jackson MP, Hewitt EW. Cellular proteostasis: Degradation of misfolded proteins by lysosomes. *Essays Biochem.* 2016; 60(2):173-180
  33. Uttara B, Singh A, Zamboni P, Mahajan R. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Curr Neuropharmacol.* 2009; 7(1):65-74
  34. Olzscha H, Schermann SM, Woerner AC, Pinkert S, Hecht MH, Tartaglia GG, et al. Amyloid-like aggregates sequester numerous metastable proteins with essential cellular functions. *Cell.* 2011; 144(1):67-78

35. Goodchild SC, Sheynis T, Thompson R, Tipping KW, Xue WF, Ranson NA, et al.  $\beta$ 2-microglobulin amyloid fibril-induced membrane disruption is enhanced by endosomal lipids and acidic pH. *PLoS One*. 2014; 9(8):e104492
36. Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, Cairns NJ, et al. Correlation of alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: A review of the literature. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 2012; 71(5):362-81
37. Reixach N, Deeckongkit S, Jiang X, Kelly JW, Buxbaum JN. Tissue damage in the amyloidoses: Transthyretin monomers and nonnative oligomers are the major cytotoxic species in tissue culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(9):2817-22
38. Wu L, Rowley J, Mohades S, Leuzy A, Dauar MT, Shin M, et al. Dissociation between Brain Amyloid Deposition and Metabolism in Early Mild Cognitive Impairment. *PLoS One*. 2012; 7(10):e47905
39. Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, et al. Physical basis of cognitive alterations in alzheimer's disease: Synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol*. 1991; 30(4):572-80
40. Morris JC, Storandt M, McKeel DW, Rubin EH, Price JL, Grant EA, et al. Cerebral amyloid deposition and diffuse plaques in "normal" aging: Evidence for presymptomatic and very mild Alzheimer's disease. *Neurology*. 1996; 46(3):707-19
41. Masliah E, Terry R. The Role of Synaptic Proteins in the Pathogenesis of Disorders of the Central Nervous System. In: *Brain Pathology*. 1993; 3(1):77-85
42. Scheff SW, Price DA, Sparks DL. Quantitative assessment of possible age-related change in synaptic numbers in the human frontal cortex. *Neurobiol Aging*. 2001; 22(3):355-65
43. Perry EK, Gibson PH, Blessed G, Perry RH, Tomlinson BE. Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia. Choline acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase activities in necropsy brain tissue. *J Neurol Sci*. 1977; 34(2):247-65
44. Bergmann K, Tomlinson BE, Blessed G, Gibson PH, Perry RH. Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. *Br Med J*. 1978; 2(6150):1457-9

45. Bartus R, Dean R, Beer B, Lippa A. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* (80- ). 1982; 217(4558):408-14
46. Bliss TVP, Collingridge GL. A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 1993; 361(6407):31-9
47. Frey U, Morris RGM. Weak before strong: Dissociating synaptic tagging and plasticity-factor accounts of late-LTP. In: *Neuropharmacology*. 1998; 37(4-5):545-52
48. Beeri R, Andres C, Lev-Lehman E, Timberg R, Huberman T, Shani M, et al. Transgenic expression of human acetylcholinesterase induces progressive cognitive deterioration in mice. *Curr Biol*. 1995; 5(9):1063-71
49. Andres C, Beeri R, Huberman T, Shani M, Soreq H. Cholinergic drug resistance and impaired spatial learning in transgenic mice overexpressing human brain acetylcholinesterase. In: *Progress in Brain Research*. 1996; 109:265-72
50. Blokland A. Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory? *Brain Research Reviews*. 1995; 21(3):285-300
51. Bartus RT, Dean RL, Beer B. Neuropeptide effects on memory in aged monkeys. *Neurobiol Aging*. 1982; 3(1):61-8
52. Taylor JL, Mayer RT, Himel CM. Conformers of acetylcholinesterase: A mechanism of allosteric control. *Mol Pharmacol*. 1994; 45(1):74-83
53. Birks J. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006; (1):CD005593.
54. Inestrosa NC, Alarcón R, Arriagada J, Donoso A, Alvarez J, Campos EO. Blood markers in Alzheimer disease: Subnormal acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in lymphocytes and erythrocytes. *J Neurol Sci*. 1994; 122(1):1-5
55. Mesulam MM, Mufson EJ, Wainer BH. Three-dimensional representation and cortical projection topography of the nucleus basalis (Ch4) in the macaque: concurrent demonstration of choline acetyltransferase and retrograde transport with a stabilized tetramethylbenzidine method for horseradish p. *Brain Res*. 1986; 367(1-2):301-8
56. Davis KL, Mohs RC, Marin D, Purohit DP, Perl DP, Lantz M, et al. Cholinergic

- markers in elderly patients with early signs of Alzheimer disease. *J Am Med Assoc.* 1999; 281(15):1401-6
57. McNay E. Your Brain on Insulin: From Heresy to Dogma. *Perspect Psychol Sci.* 2014; 9(1):88-90
  58. Ott A, Stolk RP, Hofman A, Van Harskamp F, Grobbee DE, Breteler MMB. Association of diabetes mellitus and dementia: The Rotterdam Study. *Diabetologia.* 1996; 39(11):1392-7
  59. Protas HD, Chen K, Langbaum JBS, Fleisher AS, Alexander GE, Lee W, et al. Posterior cingulate glucose metabolism, hippocampal glucose metabolism, and hippocampal volume in cognitively normal, late-middle-aged persons at 3 levels of genetic risk for alzheimer disease. *JAMA Neurol.* 2013; 70(3):320-5
  60. Mosconi L. Brain glucose metabolism in the early and specific diagnosis of Alzheimer's disease: FDG-PET studies in MCI and AD. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging.* 2005, 32(4):486-510
  61. Devaskar SU, Giddings SJ, Rajakumar PA, Carnaghi LR, Menon RK, Zahm DS. Insulin gene expression and insulin synthesis in mammalian neuronal cells. *J Biol Chem.* 1994; 269(11):8445-54
  62. Hill JM, Lesniak MA, Pert CB, Roth J. Autoradiographic localization of insulin receptors in rat brain: Prominence in olfactory and limbic areas. *Neuroscience.* 1986; 17(4):1127-38
  63. Unger JW, Moss AM, Livingston JN. Immunohistochemical localization of insulin receptors and phosphotyrosine in the brainstem of the adult rat. *Neuroscience.* 1991; 42(3):853-61
  64. Wozniak M, Rydzewski B, Baker SP, Raizada MK. The cellular and physiological actions of insulin in the central nervous system. *Neurochemistry International.* 1993; 22(1):1-10
  65. Kullmann S, Heni M, Hallschmid M, Fritsche A, Preissl H, Häring HU. Brain insulin resistance at the crossroads of metabolic and cognitive disorders in humans. *Physiol Rev.* 2016; 96(4):1169-209

66. Zahniser NR, Goens MB, Hanaway PJ, Vynych J V. Characterization and Regulation of Insulin Receptors in Rat Brain. *J Neurochem.* 1984; 42(5):1354-62
67. Gasparini L, Netzer WJ, Greengard P, Xu H. Does insulin dysfunction play a role in Alzheimer's disease? *Trends in Pharmacological Sciences.* 2002, 23(6):288-93
68. McDermott JR, Gibson AM. Degradation of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid protein by human and rat brain peptidases: Involvement of insulin-degrading enzyme. *Neurochem Res.* 1997; 22(1):49-56
69. Phiel CJ, Wilson CA, Lee VMY, Klein PS. GSK-3 $\alpha$  regulates production of Alzheimer's disease amyloid- $\beta$  peptides. *Nature.* 2003; 423(6938):435-9
70. De Felice FG, Vieira MNN, Bomfim TR, Decker H, Velasco PT, Lambert MP, et al. Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: Insulin signaling prevents the pathogenic binding of A $\beta$  oligomers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106(6):1971-6
71. Reger MA, Watson GS, Green PS, Wilkinson CW, Baker LD, Cholerton B, et al. Intranasal insulin improves cognition and modulates  $\beta$ -amyloid in early AD. *Neurology.* 2008; 70(6):440-8
72. Xie L, Helmerhorst E, Taddei K, Plewright B, Van Bronswijk W, Martins R. Alzheimer's beta-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor. *J Neurosci.* 2002; 22(10):RC221
73. Reagan LP. Neuronal insulin signal transduction mechanisms in diabetes phenotypes. In: *Neurobiology of Aging.* 2005; 26 Suppl 1:56-9
74. Pearson-Leary J, Jahagirdar V, Sage J, McNay EC. Insulin modulates hippocampally-mediated spatial working memory via glucose transporter-4. *Behav Brain Res.* 2018; 338:32-39
75. Park CR, Seeley RJ, Craft S, Woods SC. Intracerebroventricular insulin enhances memory in a passive-avoidance task. *Physiol Behav.* 2000; 68(4):509-14
76. Lan JY, Skeberdis VA, Jover T, Grooms SY, Lin Y, Araneda RC, et al. Protein kinase C modulates NMDA receptor trafficking and gating. *Nat Neurosci.* 2001; 4(4):382-90
77. Degroot A, Kornecook T, Quirion R, DeBow S, Parent MB. Glucose increases

- hippocampal extracellular acetylcholine levels upon activation of septal GABA receptors. *Brain Res.* 2003; 979(1-2):71-7
78. McNay EC, Recknagel AK. Reprint of: "Brain insulin signaling: A key component of cognitive processes and a potential basis for cognitive impairment in type 2 diabetes." *Neurobiology of Learning and Memory.* 2011; 96(4):517-28
79. Åberg MAI, Åberg ND, Palmer TD, Alborn AM, Carlsson-Skwirut C, Bang P, et al. IGF-I has a direct proliferative effect in adult hippocampal progenitor cells. *Mol Cell Neurosci.* 2003; 24(1):23-40
80. Benedict C, Hallschmid M, Hatke A, Schultes B, Fehm HL, Born J, et al. Intranasal insulin improves memory in humans. *Psychoneuroendocrinology.* 2004; 29(10):1326-34
81. Benedict C, Hallschmid M, Schmitz K, Schultes B, Ratter F, Fehm HL, et al. Intranasal insulin improves memory in humans: Superiority of insulin aspart. *Neuropsychopharmacology.* 2007; 32(1):239-43
82. Sims NR, Bowen DM, Allen SJ, Smith CCT, Neary D, Thomas DJ, et al. Presynaptic Cholinergic Dysfunction in Patients with Dementia. *J Neurochem.* 1983; 40(2):503-9
83. Baskin DS, Browning JL, Pirozzolo FJ, Korporaal S, Baskin JA, Appel SH. Brain choline acetyltransferase and mental function in Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 1999; 56(9):1121-3
84. Zhao W, Wu X, Xie H, Ke Y, Yung WH. Permissive role of insulin in the expression of long-term potentiation in the hippocampus of immature rats. *NeuroSignals.* 2011; 18(4):236-45
85. Riederer P, Korczyn AD, Ali SS, Bajenaru O, Choi MS, Chopp M, et al. The diabetic brain and cognition. *Journal of Neural Transmission.* 2017; 124(11):1431-1454
86. Haring H, Kirsch D, Obermaier B, Ermel B, Machicao F. Decreased tyrosine kinase activity of insulin receptor isolated from rat adipocytes rendered insulin-resistant by catecholamine treatment in vitro. *Biochem J.* 1986; 234(1):59-66
87. Watanabe Y, Gould E, Daniels DC, Cameron H, McEwen BS. Tianeptine attenuates stress-induced morphological changes in the hippocampus. *Eur J Pharmacol.* 1992;



222(1):157-62

88. Sousa N, Almeida OFX. Disconnection and reconnection: The morphological basis of (mal)adaptation to stress. *Trends in Neurosciences*. 2012; 35(12):742-51
89. Dhikav V, Anand KS. Glucocorticoids may initiate Alzheimer's disease: A Potential therapeutic role for mifepristone (RU-486). *Med Hypotheses*. 2007; 68(5):1088-92
90. Osmanovic J, Plaschke K, Salkovic-Petrisic M, Grnblatt E, Riederer P, Hoyer S. Chronic exogenous corticosterone administration generates an insulin-resistant brain state in rats. *Stress*. 2010; 13(2):123-31
91. Green KN, Billings LM, Roozendaal B, McGaugh JL, LaFerla FM. Glucocorticoids increase amyloid- $\beta$  and tau pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2006; 26(35):9047-56
92. Cunnane S, Nugent S, Roy M, Courchesne-Loyer A, Croteau E, Tremblay S, et al. Brain fuel metabolism, aging, and Alzheimer's disease. *Nutrition*. 2011; 27(1):3-20
93. Mosconi L, Mistur R, Switalski R, Tsui WH, Glodzik L, Li Y, et al. FDG-PET changes in brain glucose metabolism from normal cognition to pathologically verified Alzheimer's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2009; 36(5):811-22
94. Reiman EM, Caselli RJ, Yun LS, Chen K, Bandy D, Minoshima S, et al. Preclinical evidence of Alzheimer's disease in persons homozygous for the  $\epsilon 4$  allele for apolipoprotein E. *N Engl J Med*. 1996; 334(12):752-8
95. Selkoe DJ. Resolving controversies on the path to Alzheimer's therapeutics. *Nature Medicine*. 2011; 17(9):1060-5
96. Craft S, Baker LD, Montine TJ, Minoshima S, Watson GS, Claxton A, et al. Intranasal insulin therapy for Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment: A pilot clinical trial. *Arch Neurol*. 2012; 8(1):61-64
97. Götz J, Bodea LG, Goedert M. Rodent models for Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience*. 2018; 19(10):583-598
98. Kaushal A, Wani WY, Anand R, Gill KD. Spontaneous and induced nontransgenic animal models of AD: Modeling AD using combinatorial approach. *American Journal*

of Alzheimer's Disease and other Dementias. 2013; 28(4):318-26

99. Lee SE, Hyun H, Park MR, Choi Y, Son YJ, Park YG, et al. Production of transgenic pig as an Alzheimer's disease model using a multi-cistronic vector system. *PLoS One*. 2017; 12(6):e0177933
100. Van Dam D, De Deyn PP. Non human primate models for Alzheimer's disease-related research and drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2017, 12(2):187-200
101. Zheng H, Jiang M, Trumbauer ME, Sirinathsinghji DJS, Hopkins R, Smith DW, et al.  $\beta$ -amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell*. 1995; 81(4):525-31
102. Harada A, Oguchi K, Okabe S, Kuno J, Terada S, Ohshima T, et al. Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking protein tau. *Nature*. 1994; 369(6480):488-91
103. Cai H, Wang Y, McCarthy D, Wen H, Borchelt DR, Price DL, et al. BACE1 is the major  $\beta$ -secretase for generation of A $\beta$  peptides by neurons. *Nat Neurosci*. 2001; 4(3):233-4
104. Herreman A, Serneels L, Annaert W, Collen D, Schoonjans L, De Strooper B. Total inactivation of  $\gamma$ -secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*. 2000; 2(7):461-2
105. Spires TL, Hyman BT. Transgenic models of Alzheimer's disease: Learning from animals. *NeuroRx*. 2005; 2(3):423-37
106. Stéphan A, Phillips AG. A case for a non-transgenic animal model of Alzheimer's disease. *Genes, Brain and Behavior*. 2005; 4(3):157-72
107. Stepanichev MY, Moiseeva Y V., Lazareva NA, Onufriev M V., Gulyaeva N V. Single intracerebroventricular administration of amyloid-beta (25-35) peptide induces impairment in short-term rather than long-term memory in rats. *Brain Res Bull*. 2003; 61(2):197-205
108. Klein AM, Kowall NW, Ferrante RJ. Neurotoxicity and oxidative damage of beta amyloid 1-42 versus beta amyloid 1-40 in the mouse cerebral cortex. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1999; 893:314-20

109. Stoppelkamp S, Bell HS, Palacios-Filardo J, Shewan DA, Riedel G, Platt B. In vitro modelling of Alzheimer's disease: Degeneration and cell death induced by viral delivery of amyloid and tau. *Exp Neurol*. 2011; 229(2):226-37
110. Castello MA, Soriano S. On the origin of Alzheimer's disease. Trials and tribulations of the amyloid hypothesis. *Ageing Research Reviews*. 2014; 13:10-2
111. Bishop GM, Robinson SR. The amyloid hypothesis: Let sleeping dogmas lie? *Neurobiology of aging*. 2002; 23(6):1101-5
112. Drachman DA. The amyloid hypothesis, time to move on: Amyloid is the downstream result, not cause, of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement*. 2014; 10(3):372-80
113. Zhang Z, Simpkins JW. An okadaic acid-induced model of tauopathy and cognitive deficiency. *Brain Res*. 2010; 1359:233-46
114. Li SP, Deng YQ, Wang XC, Wang YP, Wang JZ. Melatonin protects SH-SY5Y neuroblastoma cells from calyculin A-induced neurofilament impairment and neurotoxicity. *J Pineal Res*. 2004; 36(3):186-91
115. Liu SJ, Wang JZ. Alzheimer-like tau phosphorylation induced by wortmannin in vivo and its attenuation by melatonin. *Acta Pharmacol Sin*. 2002; 23(2):183-7
116. HAUGABOOK SJ, LE T, YAGER D, ZENK B, HEALY BM, ECKMAN EA, et al. Reduction of A $\beta$  accumulation in the Tg2576 animal model of Alzheimer's disease after oral administration of the phosphatidyl-inositol kinase inhibitor wortmannin. *FASEB J*. 2001; 15(1):16-18
117. Sun L, Wang X, Liu S, Wang Q, Wang J, Bennecib M, et al. Bilateral injection of isoproterenol into hippocampus induces Alzheimer-like hyperphosphorylation of tau and spatial memory deficit in rat. *FEBS Lett*. 2005; 579(1):251-8
118. Wang DL, Ling ZQ, Cao FY, Zhu LQ, Wang JZ. Melatonin attenuates isoproterenol-induced protein kinase A overactivation and tau hyperphosphorylation in rat brain. *J Pineal Res*. 2004; 37(1):11-6
119. Nakagawa Y, Nakamura S, Kaše Y, Noguchi T, Ishihara T. Colchicine lesions in the rat hippocampus mimic the alterations of several markers in Alzheimer's disease. *Brain Res*. 1987; 408(1-2):57-64

120. Bensimon G, Chermat R. Microtubule disruption and cognitive defects: Effect of colchicine on learning behavior in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1991; 38(1):141-5
121. Nakayama T, Sawada T. Involvement of microtubule integrity in memory impairment caused by colchicine. *Pharmacol Biochem Behav.* 2002; 71(1-2):119-38
122. Talebi M, Farhodi M, Nikanfar M, Majidi J, Fakhari A. Study on serum homocysteine level in Alzheimer's disease and its relationship with the stages of this disease. *Neurosciences.* 2008; 13(4):359-62
123. Luo Y, Zhou X, Yang X, Wang J. Homocysteine induces  $\tau$  hyperphosphorylation in rats. *Neuroreport.* 2007; 18(18):2005-8
124. Dwyer BE, Raina AK, Perry G, Smith MA. Homocysteine and Alzheimer's disease: A modifiable risk? *Free Radic Biol Med.* 2004; 36(11):1471-5
125. Köseoglu E, Karaman Y. Relations between homocysteine, folate and vitamin B12 in vascular dementia and in Alzheimer disease. *Clin Biochem.* 2007; 40(12):859-63
126. Araujo JA, Greig NH, Ingram DK, Sandin J, De Rivera C, Milgram NW. Cholinesterase inhibitors improve both memory and complex learning in aged beagle dogs. *J Alzheimer's Dis.* 2011; 26(1):143-55
127. Rodella LF, Ricci F, Borsani E, Stacchiotti A, Foglio E, Favero G, et al. Aluminium exposure induces Alzheimer's disease-like histopathological alterations in mouse brain. *Histol Histopathol.* 2008; 23(4):433-9
128. Vasudevaraju BP, Govindaraju M, Palanisamy AP, Sambamurti K, Rao KSJ. Molecular toxicity of aluminium in relation to neurodegeneration. *Indian Journal of Medical Research.* 2008; 128(4):545-56
129. Peers C, Dallas ML, Boycott HE, Scragg JL, Pearson HA, Boyle JP. Hypoxia and neurodegeneration. In: *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2009; 1177:169-77
130. Lannert H, Hoyer S. Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long- term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. *Behav Neurosci.* 1998; 112(5):1199-208

131. Salkovic-Petrisic M, Hoyer S. Central insulin resistance as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: An experimental approach. *Journal of Neural Transmission, Supplementa*. 2007; (72):217-33
132. Nitsch R, Mayer G, Galmbacher R, Galmbacher G, Apell V, Hoyer S. Impairment of cerebral glucose metabolism parallels learning and memory dysfunctions after intracerebral streptozotocin. *Alzheimer's Disease. Epidemiology, Neuropathology, Neurochemistry, and Clinics*. 1990; pp 201-209
133. Brentjens R, Saltz L. Islet cell tumors of the pancreas: The medical oncologist's perspective. In: *Surgical Clinics of North America*. 2001; 81(3):527-42
134. De La Monte SM, Tong M. Mechanisms of nitrosamine-mediated neurodegeneration: Potential relevance to sporadic Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis*. 2009; 17(4):817-25
135. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological Research*. 2001; 50(6):537-46
136. Blondel O, Bailbe D, Portha B. Insulin resistance in rats with non-insulin-dependent diabetes induced by neonatal (5 days) streptozotocin: Evidence for reversal following phlorizin treatment. *Metabolism*. 1990; 39(8):787-93
137. Hoyer S, Lannert H. Inhibition of the neuronal insulin receptor causes Alzheimer-like disturbances in oxidative/energy brain metabolism and in behavior in adult rats. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1999; 893:301-3
138. Nitsch R, Hoyer S. Local action of the diabetogenic drug, streptozotocin, on glucose and energy metabolism in rat brain cortex. *Neurosci Lett*. 1991; 128(2):199-202
139. Salkovic-Petrisic M, Tribl F, Schmidt M, Hoyer S, Riederer P. 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(4):1005-15
140. Grünblatt E, Salkovic-Petrisic M, Osmanovic J, Riederer P, Hoyer S. Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated protein tau. *J Neurochem*. 2007; 101(3):757-70

141. Lester-Coll N, Rivera EJ, Soscia SJ, Doiron K, Wands JR, De La Monte SM. Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: Relevance to sporadic Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis.* 2006; 9(1):13-33
142. Sharma M, Gupta YK. Intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats produces both oxidative stress in the brain and cognitive impairment. *Life Sci.* 2001; 68(9):1021-9
143. Shoham S, Bejar C, Kovalev E, Schorer-Apelbaum D, Weinstock M. Ladostigil prevents gliosis, oxidative-nitrative stress and memory deficits induced by intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. *Neuropharmacology.* 2007; 52(3):836-43
144. Salkovic-Petrisic M, Osmanovic-Barilar J, Brückner MK, Hoyer S, Arendt T, Riederer P. Cerebral amyloid angiopathy in streptozotocin rat model of sporadic Alzheimer's disease: A long-term follow up study. *J Neural Transm.* 2011; 118(5):765-72
145. Knezovic A, Osmanovic-Barilar J, Curlin M, Hof PR, Simic G, Riederer P, 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(4):577-92
146. Blokland A, Jolles J. Behavioral and biochemical effects of an ICV injection of streptozotocin in old Lewis rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1994; 47(4):833-7
147. Chen Y, Liang Z, Blanchard J, Dai CL, Sun S, Lee MH, et al. A non-transgenic mouse model (icv-STZ mouse) of Alzheimer's disease: similarities to and differences from the transgenic model (3xTg-AD mouse). *Mol Neurobiol.* 2013; 47(2):711-25
148. Ravelli KG, Rosário B dos A, Camarini R, Hernandez MS, Britto LR. Intracerebroventricular Streptozotocin as a Model of Alzheimer's Disease: Neurochemical and Behavioral Characterization in Mice. *Neurotox Res.* 2017; 31(3):327-333
149. Lee Y, Kim YH, Park SJ, Huh JW, Kim SH, Kim SU, et al. Insulin/IGF signaling-related gene expression in the Brain of a Sporadic Alzheimer's disease monkey model induced by intracerebroventricular injection of streptozotocin. *J Alzheimer's Dis.* 2014; 38(2):251-67

150. Kumar A, Singh N. Inhibitor of Phosphodiesterase-4 improves memory deficits, oxidative stress, neuroinflammation and neuropathological alterations in mouse models of dementia of Alzheimer's Type. *Biomed Pharmacother.* 2017; 88:698-707
151. Hellweg R, Nitsch R, Hock C, Jaksch M, Hoyer S. Nerve growth factor and choline acetyltransferase activity levels in the rat brain following experimental impairment of cerebral glucose and energy metabolism. *J Neurosci Res.* 1992; 31(3):479-86
152. Šalković M, Sabolić I, Lacković Z. Striatal dopaminergic D1 and D2 receptors after intracerebroventricular application of alloxan and streptozocin in rat. *J Neural Transm.* 1995; 100(2):137-45
153. Prickaerts J, De Vente J, Honig W, Steinbusch H, Markerink-Van Ittersum M, Blokland A, et al. Nitric oxide synthase does not mediate neurotoxicity after an i.c.v. injection of streptozotocin in the rat. *J Neural Transm.* 2000; 107:745–766(2000)
154. Deshmukh R, Sharma V, Mehan S, Sharma N, Bedi KL. Amelioration of intracerebroventricular streptozotocin induced cognitive dysfunction and oxidative stress by vinpocetine - a PDE1 inhibitor. *Eur J Pharmacol.* 2009; 620(1-3):49-56
155. Thorens B. Brain glucose sensing and neural regulation of insulin and glucagon secretion. *Diabetes, Obesity and Metabolism.* 2011; 13 Suppl 1:82-8
156. Shah K, DeSilva S, Abbruscato T. The role of glucose transporters in brain disease: Diabetes and Alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Sciences.* 2012; 13(10):12629-55
157. Santos T de O, Mazucanti CHY, Xavier GF, da Silva Torrão A. Early and late neurodegeneration and memory disruption after intracerebroventricular streptozotocin. *Physiol Behav.* 2012; 107(3):401-13
158. Wang H, Wang H, Cheng H, Che Z. Ameliorating effect of luteolin on memory impairment in an Alzheimer's disease model. *Mol Med Rep.* 2016; 13(5):4215-20
159. Kraska A, Santin MD, Dorieux O, Joseph-Mathurin N, Bourrin E, Petit F, et al. In Vivo Cross-sectional Characterization of Cerebral Alterations Induced by Intracerebroventricular Administration of Streptozotocin. *PLoS One.* 2012; 7(9):e46196

160. Pinton S, da Rocha JT, Gai BM, Prigol M, da Rosa LV, Nogueira CW. Neuroprotector effect of p,p'-methoxyl-diphenyl diselenide in a model of sporadic dementia of Alzheimer's type in mice: Contribution of antioxidant mechanism. *Cell Biochem Funct.* 2011; 29(3):235-43
161. Sonkusare S, Srinivasan K, Kaul C, Ramarao P. Effect of donepezil and lercanidipine on memory impairment induced by intracerebroventricular streptozotocin in rats. *Life Sci.* 2005; 77(1):1-14
162. Deng Y, Li B, Liu Y, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Gong CX. Dysregulation of insulin signaling, glucose transporters, O-GlcNAcylation, and phosphorylation of tau and neurofilaments in the brain: Implication for Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 2009; 175(5):2089-98
163. Osmanovic Barilar J, Knezovic A, Grünblatt E, Riederer P, Salkovic-Petrisic M. Nine-month follow-up of the insulin receptor signalling cascade in the brain of streptozotocin rat model of sporadic Alzheimer's disease. *J Neural Transm.* 2015; 122(4):565-76
164. Santos DB, Colle D, Moreira ELG, Peres KC, Ribeiro RP, dos Santos AA, et al. Probucol mitigates streptozotocin-induced cognitive and biochemical changes in mice. *Neuroscience.* 2015; 284:590-600
165. Duelli R, Schröck H, Kuschinsky W, Hoyer S. Intracerebroventricular injection of streptozotocin induces discrete local changes in cerebral glucose utilization in rats. *Int J Dev Neurosci.* 1994; 12(8):737-43
166. C. Correia S, X. Santos R, S. Santos M, Casadesus G, C. LaManna J, Perry G, et al. Mitochondrial Abnormalities in a Streptozotocin-Induced Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res.* 2013; 10(4):406-19
167. Dos Santos JPA, Vizuite A, Hansen F, Biasibetti R, Gonçalves CA. Early and Persistent O-GlcNAc Protein Modification in the Streptozotocin Model of Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis.* 2018; 61(1):237-249
168. De La Monte SM, Tong M, Lester-Coll N, Plater M, Wands JR. Therapeutic rescue of neurodegeneration in experimental type 3 diabetes: Relevance to Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis.* 2006; 10(1):89-109



169. Zhou M, Chen S, Peng P, Gu Z, Yu J, Zhao G, et al. Dulaglutide ameliorates STZ induced AD-like impairment of learning and memory ability by modulating hyperphosphorylation of tau and NFs through GSK3 $\beta$ . *Biochem Biophys Res Commun.* 2019; 511(1):154-160
170. Lin F, Jia J, Qin W. Enhancement of  $\beta$ -amyloid oligomer accumulation after intracerebroventricular injection of streptozotocin, which involves central insulin signaling in a transgenic mouse model. *Neuroreport.* 2014; 25(16):1289-95
171. Plaschke K, Kopitz J, Siegelin M, Schliebs R, Salkovic-Petrisic M, Riederer P, et al. Insulin-resistant brain state after intracerebroventricular streptozotocin injection exacerbates Alzheimer-like changes in Tg2576 A $\beta$ PP-overexpressing mice. *J Alzheimer's Dis.* 2010; 19(2):691-704
172. Rai S, Kamat PK, Nath C, Shukla R. Glial activation and post-synaptic neurotoxicity: The key events in Streptozotocin (ICV) induced memory impairment in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2014; 117:104-17
173. Saxena G, Patro IK, Nath C. ICV STZ induced impairment in memory and neuronal mitochondrial function: A protective role of nicotinic receptor. *Behav Brain Res.* 2011; 224(1):50-7
174. Agrawal R, Tyagi E, Shukla R, Nath C. Insulin receptor signaling in rat hippocampus: A study in STZ (ICV) induced memory deficit model. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2011; 21(3):261-73
175. Agrawal R, Mishra B, Tyagi E, Nath C, Shukla R. Effect of curcumin on brain insulin receptors and memory functions in STZ (ICV) induced dementia model of rat. *Pharmacol Res.* 2010; 61(3):247-52
176. Mukherjee A, Song ES, Kihiko-Ehmann M, Goodman J, St. Pyrek J, Estus S, et al. Insulysin hydrolyzes amyloid  $\beta$  peptides to products that are neither neurotoxic nor deposit on amyloid plaques. *J Neurosci.* 2000; 20(23):8745-9
177. Vekrellis K, Ye Z, Qiu WQ, Walsh D, Hartley D, Chesneau V, et al. Neurons regulate extracellular levels of amyloid  $\beta$ -protein via proteolysis by insulin-degrading enzyme. *J Neurosci.* 2000; 20(5):1657-65

178. Pathan AR, Viswanad B, Sonkusare SK, Ramarao P. Chronic administration of pioglitazone attenuates intracerebroventricular streptozotocin induced-memory impairment in rats. *Life Sci.* 2006; 79(23):2209-16
179. Johnston AM, Pirola L, Van Obberghen E. Molecular mechanisms of insulin receptor substrate protein-mediated modulation of insulin signalling. *FEBS Letters.* 2003; 546(1):32-6
180. Benarroch EE. Brain glucose transporters: Implications for neurologic disease. *Neurology.* 2014; 82(15):1374-9
181. Plaschke K, Hoyer S. Action of the diabetogenic drug streptozotocin on glycolytic and glycogenolytic metabolism in adult rat brain cortex and hippocampus. *Int J Dev Neurosci.* 1993; 11(4):477-83
182. Tahirovic I, Sofic E, Sapcanin A, Gavrankapetanovic I, Bach-Rojecky L, Salkovic-Petrisic M, et al. Reduced brain antioxidant capacity in rat models of betacytotoxic-induced experimental sporadic Alzheimer's disease and diabetes mellitus. *Neurochem Res.* 2007; 32(10):1709-17
183. Ishrat T, Khan MB, Hoda MN, Yousuf S, Ahmad M, Ansari MA, et al. Coenzyme Q10 modulates cognitive impairment against intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. *Behav Brain Res.* 2006; 171(1):9-16
184. Shoham S, Bejar C, Kovalev E, Weinstock M. Intracerebroventricular injection of streptozotocin causes neurotoxicity to myelin that contributes to spatial memory deficits in rats. *Exp Neurol.* 2003; 184(2):1043-52
185. Sharma B, Singh N, Singh M. Modulation of celecoxib- and streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's disease by pitavastatin and donepezil. *J Psychopharmacol.* 2008; 22(2):162-71
186. Dalla Y, Singh N, Jaggi AS, Singh D. Memory restorative role of statins in experimental dementia: An evidence of their cholesterol dependent and independent actions. *Pharmacol Reports.* 2010; 62(5):784-96
187. Javed H, Khan MM, Ahmad A, Vaibhav K, Ahmad ME, Khan A, et al. Rutin prevents cognitive impairments by ameliorating oxidative stress and neuroinflammation in rat

- model of sporadic dementia of Alzheimer type. *Neuroscience*. 2012; 210:340-52
188. Rinwa P, Jaggi AS, Singh N. Pharmacological investigation of memory restorative effect of riluzole in mice. *Indian J Pharmacol*. 2012; 44(3):366-71
189. Tota S, Kamat PK, Saxena G, Hanif K, Najmi AK, Nath C. Central angiotensin converting enzyme facilitates memory impairment in intracerebroventricular streptozotocin treated rats. *Behav Brain Res*. 2012; 226(1):317-30
190. Weinstock M, Shoham S. Rat models of dementia based on reductions in regional glucose metabolism, cerebral blood flow and cytochrome oxidase activity. *Journal of Neural Transmission*. 2004; 111(3):347-66
191. Ellenbroek B, Youn J. Rodent models in neuroscience research: Is it a rat race? *DMM Dis Model Mech*. 2016; 9(10):1079-1087
192. Hanes J, Zilka N, Bartkova M, Caletkova M, Dobrota D, Novak M. Rat tau proteome consists of six tau isoforms: Implication for animal models of human tauopathies. *J Neurochem*. 2009; 108(5):1167-76
193. D.-B. L, J. T, X.-T. F, M. S, H.-W. X, Y. B. Comparative study of histopathology changes between the PS1/APP double transgenic mouse model and A $\beta$ 1-40 -injected rat model of Alzheimer disease. *Neurosci Bull*. 2006; 22(1):52-7
194. Kloskowska E, Pham TM, Nilsson T, Zhu S, Öberg J, Codita A, et al. Cognitive impairment in the Tg6590 transgenic rat model of Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med*. 2010; 14(6B):1816-23
195. Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, et al. Correlative memory deficits, A $\beta$  elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* (80- ). 1996; 274(5284):99-102
196. Schubert M, Gautam D, Surjo D, Ueki K, Baudler S, Schubert D, et al. Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(9):3100-5
197. Eizirik DL, Pipeleers DG, Ling Z, Welsh N, Hellerström C, Andersson A. Major species differences between humans and rodents in the susceptibility to pancreatic  $\beta$ -cell injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91(20):9253-6

198. Schroeter M, Küry P, Jander S. Inflammatory gene expression in focal cortical brain ischemia: Differences between rats and mice. *Mol Brain Res.* 2003; 117(1):1-7
199. Panov A, Dikalov S, Shalbuyeva N, Hemendinger R, Greenamyre JT, Rosenfeld J. Species- and tissue-specific relationships between mitochondrial permeability transition and generation of ROS in brain and liver mitochondria of rats and mice. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 2007; 292(2):C708-18
200. Steppan SJ, Adkins RM, Anderson J. Phylogeny and divergence-date estimates of rapid radiations in muroid rodents based on multiple nuclear genes. *Syst Biol.* 2004; 53(4):533-53
201. Van zegeren K. Variation in aggressiveness and the regulation of numbers in house mouse populations. *Netherlands J Zool.* 1979; 30(4), 635-&
202. Whishaw IQ, Tomie JA. Of mice and mazes: Similarities between mice and rats on dry land but not water mazes. *Physiol Behav.* 1996; 60(5):1191-7
203. Kokare DM, Shelkar GP, Borkar CD, Nakhate KT, Subhedar NK. A simple and inexpensive method to fabricate a cannula system for intracranial injections in rats and mice. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2011; 64(3):246-50
204. Vestal BM. Sociability and Individual Distance in Four Species of Rodents. *Proc Oklahoma Acad Sci.* 1977; 57: 98-102
205. Hirst WD, Abrahamsen B, Blaney FE, Calver AR, Aloj L, Price GW, et al. Differences in the Central Nervous System Distribution and Pharmacology of the Mouse 5-Hydroxytryptamine-6 Receptor Compared with Rat and Human Receptors Investigated by Radioligand Binding, Site-Directed Mutagenesis, and Molecular Modeling. *Mol Pharmacol.* 2003; 64(6):1295-308
206. Colacicco G, Welzl H, Lipp HP, Würbel H. Attentional set-shifting in mice: Modification of a rat paradigm, and evidence for strain-dependent variation. *Behav Brain Res.* 2002; 132(1):95-102
207. Branchi I, Alleva E. Communal nesting, an early social enrichment, increases the adult anxiety-like response and shapes the role of social context in modulating the emotional behavior. *Behav Brain Res.* 2006; 172(2):299-306

208. 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(3):281-91
209. Lacković Z, Šalković M. Streptozotocin and alloxan produce alterations in rat brain monoamines independently of pancreatic beta cells destruction. *Life Sci.* 1990; 46(1):49-54
210. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1):265-75
211. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 1961; 7:88-95
212. McGeer PL, McGeer EG, Peng JH. Choline acetyltransferase: Purification and immunohistochemical localization. *Life Sciences.* 1984; 34(24):2319-38
213. Otth C, Concha II, Arendt T, Stieler J, Schliebs R, González-Billault C, et al. A $\beta$ PP induces cdk5-dependent tau hyperphosphorylation in transgenic mice Tg2576. *J Alzheimer's Dis.* 2002; 4(5):417-30
214. Rodrigues L, Dutra MF, Ilha J, Biasibetti R, Quincozes-Santos A, Leite MC, et al. Treadmill training restores spatial cognitive deficits and neurochemical alterations in the hippocampus of rats submitted to an intracerebroventricular administration of streptozotocin. *J Neural Transm.* 2010; 117(11):1295-305
215. Knezovic A, Loncar A, Homolak J, Smailovic U, Osmanovic Barilar J, Ganoci L, 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(6):695-708
216. Sharma B, Singh N, Singh M, Jaggi AS. Exploitation of HIV protease inhibitor Indinavir as a memory restorative agent in experimental dementia. *Pharmacol Biochem Behav.* 2008; 89(4):535-45
217. Nassar SZ, Badae NM, Issa YA. Effect of amylin on memory and central insulin resistance in a rat model of Alzheimer's disease. *Archives of Physiology and Biochemistry.* 2018; 17:1-9
218. Jayant S, Sharma BM, Sharma B. Protective effect of transient receptor potential

- vanilloid subtype 1 (TRPV1) modulator, against behavioral, biochemical and structural damage in experimental models of Alzheimer's disease. *Brain Res.* 2016; 1642:397-408
219. Gvazava IG, Rogovaya OS, Borisov MA, Vorotelyak EA, Vasiliev A V. Pathogenesis of type 1 diabetes mellitus and rodent experimental models. *Acta Naturae.* 2018; 10(1):24-33
220. Todd S, Yoshida MC, Fang XE, McDonald L, Jacobs J, Heinrich G, et al. Genes for insulin I and II, parathyroid hormone, and calcitonin are on rat chromosome 1. *Biochem Biophys Res Commun.* 1985; 131(3):1175-80
221. Gai W, Schott-Ohly P, Schulte Im Walde S, Gleichmann H. Differential Target Molecules for Toxicity Induced by Streptozotocin and Alloxan in Pancreatic Islets of Mice in Vitro. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2004; 112(1):29-37
222. Wang Z, Gleichmann H. Glucose Transporter 2 Expression: Prevention of Streptozotocin-Induced Reduction in Beta-Cells With 5-Thio-D-Glucose. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 1995; 103 Suppl 2:83-97
223. Wang Z, Gleichmann H. GLUT2 in pancreatic islets: Crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice. *Diabetes.* 1998; 47(1):50-6
224. Wada R, Yagihashi S. Nitric oxide generation and poly(ADP ribose) polymerase activation precede beta-cell death in rats with a single high-dose injection of streptozotocin. *Virchows Arch.* 2004; 444(4):375-82
225. Kalsbeek MJT, Mulder L, Yi CX. Microglia energy metabolism in metabolic disorder. *Mol Cell Endocrinol.* 2016; 438:27-35
226. Giorgino F, Chen JH, Smith RJ. Changes in tyrosine phosphorylation of insulin receptors and a 170, 000 molecular weight nonreceptor protein in vivo in skeletal muscle of streptozotocin-induced diabetic rats: Effects of insulin and glucose. *Endocrinology.* 1992; 130(3):1433-44
227. Liu Y, Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Gong CX. Decreased glucose transporters correlate to abnormal hyperphosphorylation of tau in Alzheimer disease. *FEBS Lett.*

2008; 582(2):359-64

228. Vannucci SJ, Clark RR, Koehler-Stec E, Li K, Smith CB, Davies P, et al. Glucose transporter expression in brain: Relationship to cerebral glucose utilization. In: *Developmental Neuroscience*. 1998; 20(4-5):369-79
229. Ishiguro K, Shiratsuchi A, Sato S, Omori A, Arioka M, Kobayashi S, et al. Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  is identical to protein tau kinase I generating several epitopes of paired helical filaments. *FEBS Lett*. 1993; 325(3):167-72
230. Cross DAE, Watt PW, Shaw M, Van Der Kaay J, Downes CP, Holder JC, et al. Insulin activates protein kinase B, inhibits glycogen synthase kinase-3 and activates glycogen synthase by rapamycin-insensitive pathways in skeletal muscle and adipose tissue. *FEBS Lett*. 1997; 406(1-2):211-5
231. Hong M, Lee VMY. Insulin and insulin-like growth factor-1 regulate tau phosphorylation in cultured human neurons. *J Biol Chem*. 1997; 272(31):19547-53
232. Cross DAE, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 1995; 378(6559):785-9
233. Gupta S, Yadav K, Mantri SS, Singhal NK, Ganesh S, Sandhir R. Evidence for Compromised Insulin Signaling and Neuronal Vulnerability in Experimental Model of Sporadic Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol*. 2018; 55(12):8916-8935
234. Shonesy BC, Thiruchelvam K, Parameshwaran K, Rahman EA, Karuppagounder SS, Huggins KW, et al. Central insulin resistance and synaptic dysfunction in intracerebroventricular-streptozotocin injected rodents. *Neurobiol Aging*. 2012; 33(2):430.e5-18
235. Swatton JE, Sellers LA, Faull RLM, Holland A, Iritani S, Bahn S. Increased MAP kinase activity in Alzheimer's and Down syndrome but not in schizophrenia human brain. *Eur J Neurosci*. 2004; 19(10):2711-9
236. Pei JJ, Tanaka T, Tung YC, Braak E, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Distribution, Levels, and Activity of Glycogen Synthase Kinase-3 in the Alzheimer Disease Brain. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1997; 56(1):70-8

237. Zhao L, Teter B, Morihara T, Lim GP, Ambegaokar SS, Ubeda OJ, et al. Insulin-degrading enzyme as a downstream target of insulin receptor signaling cascade: Implications for Alzheimer's disease intervention. *J Neurosci*. 2004; 24(49):11120-6
238. Yang W, Ma J, Liu Z, Lu Y, Hu B, Yu H. Effect of naringenin on brain insulin signaling and cognitive functions in ICV-STZ induced dementia model of rats. *Neurol Sci*. 2014; 35(5):741-51
239. Devi L, Alldred MJ, Ginsberg SD, Ohno M. Mechanisms underlying insulin deficiency-induced acceleration of  $\beta$ -amyloidosis in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2012; 7(3):e32792
240. Banks WA, Owen JB, Erickson MA. Insulin in the brain: There and back again. *Pharmacology and Therapeutics*. 2012; 136(1):82-93
241. Chen Y, Guo Z, Mao YF, Zheng T, Zhang B. Intranasal Insulin Ameliorates Cerebral Hypometabolism, Neuronal Loss, and Astrogliosis in Streptozotocin-Induced Alzheimer's Rat Model. *Neurotox Res*. 2018; 33(4):716-724
242. Heo JH, Lee SR, Lee ST, Lee KM, Oh JH, Jang DP, et al. Spatial distribution of glucose hypometabolism induced by intracerebroventricular streptozotocin in monkeys. *J Alzheimer's Dis*. 2011; 25(3):517-23
243. Ferrer I, Gomez-Isla T, Puig B, Freixes M, Ribe E, Dalfo E, et al. Current Advances on Different Kinases Involved in Tau Phosphorylation, and Implications in Alzheimers Disease and Tauopathies. *Curr Alzheimer Res*. 2005; 2(1):3-18
244. Liu SL, Wang C, Jiang T, Tan L, Xing A, Yu JT. The Role of Cdk5 in Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology*. 2016; 53(7):4328-42
245. Patrick GN, Zukerberg L, Nikolic M, De La Monte S, Dikkes P, Tsai LH. Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature*. 1999; 402(6762):615-22
246. Kimura T, Ishiguro K, Hisanaga SI. Physiological and pathological phosphorylation of tau by Cdk5. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2014; 15:7:65
247. Contreras-Vallejos E, Utreras E, Bórquez DA, Prochazkova M, Terse A, Jaffe H, et al. Searching for novel Cdk5 substrates in brain by comparative phosphoproteomics of



- wild type and Cdk5<sup>-/-</sup> mice. PLoS One. 2014; 21;9(3):e90363
248. Jayapalan S, Natarajan J. The role of CDK5 and GSK3B kinases in hyperphosphorylation of microtubule associated protein tau (MAPT) in Alzheimer's disease. *Bioinformation*. 2013; 9(20):1023-30
  249. Chen J, Li S, Sun W, Li J. Anti-diabetes drug pioglitazone ameliorates synaptic defects in AD transgenic mice by inhibiting cyclin-dependent kinase5 activity. *PLoS One*. 2015; 10(4):e0123864
  250. Seo J, Kritskiy O, Ashley Watson L, Barker SJ, Dey D, Raja WK, et al. Inhibition of p25/Cdk5 attenuates tauopathy in mouse and iPSC models of frontotemporal dementia. *J Neurosci*. 2017; 37(41):9917-9924
  251. Austin SA, Katusic ZS. Loss of Endothelial Nitric Oxide Synthase Promotes p25 Generation and Tau Phosphorylation in a Murine Model of Alzheimer's Disease. *Circ Res*. 2016; 119(10):1128-1134
  252. Feng C, Zhang C, Shao X, Liu Q, Qian Y, Feng L, et al. Enhancement of nose-to-brain delivery of basic fibroblast growth factor for improving rat memory impairments induced by co-injection of  $\beta$ -amyloid and ibotenic acid into the bilateral hippocampus. *Int J Pharm*. 2012; 423(2):226-34
  253. Quan Q, Qian Y, Li X, Li M, Gou X. CDK5 Participates in Amyloid- $\beta$  Production by Regulating PPAR $\gamma$  Phosphorylation in Primary Rat Hippocampal Neurons. *J Alzheimer's Dis*. 2019; 71(2):443-460
  254. Das TK, Jana P, Chakrabarti SK, Abdul Hamid MRW. Curcumin Downregulates GSK3 and Cdk5 in Scopolamine-Induced Alzheimer's Disease Rats Abrogating A $\beta$ 40/42 and Tau Hyperphosphorylation. *J Alzheimer's Dis Reports*. 2019; 3(1):257-267
  255. Engmann O, Giese KP. Crosstalk between Cdk5 and GSK3 $\beta$ : Implications for Alzheimer's disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2009; 2:2
  256. Plattner F, Angelo M, Giese KP. The roles of cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase 3 in tau hyperphosphorylation. *J Biol Chem*. 2006; 281(35):25457-65
  257. Hernández F, Lucas JJ, Cuadros R, Avila J. GSK-3 dependent phosphoepitopes

- recognized by PHF-1 and AT-8 antibodies are present in different tau isoforms. In: *Neurobiology of Aging*. 2003; 24(8):1087-94
258. Salkovic-Petrisic M, Knezovic A, Osmanovic-Barilar J, Smailovic U, Trkulja V, Riederer P, et al. Multi-target iron-chelators improve memory loss in a rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Life Sci*. 2015; 136:108-19
259. Peng D, Pan X, Cui J, Ren Y, Zhang J. Hyperphosphorylation of protein tau in hippocampus of central insulin-resistant rats is associated with cognitive impairment. *Cell Physiol Biochem*. 2013; 32(5):1417-25
260. de Oliveira JS, Abdalla FH, Dornelles GL, Adefegha SA, Palma TV, Signor C, et al. Berberine protects against memory impairment and anxiogenic-like behavior in rats submitted to sporadic Alzheimer's-like dementia: Involvement of acetylcholinesterase and cell death. *Neurotoxicology*. 2016; 57:241-250
261. Sodhi RK, Singh N. Retinoids as potential targets for Alzheimer's disease. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2014; 120:117-23
262. Biasibetti R, Almeida dos Santos JP, Rodrigues L, Wartchow KM, Suardi LZ, Nardin P, et al. Hippocampal changes in STZ-model of Alzheimer's disease are dependent on sex. *Behav Brain Res*. 2017; 316:205-214
263. Ransohoff RM. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science*. 2016; 353(6301):777-83
264. Carter SF, Schöll M, Almkvist O, Wall A, Engler H, Långström B, et al. Evidence for astrocytosis in prodromal Alzheimer disease provided by 11C-deuterium-L-deprenyl: A multitracers PET paradigm combining 11C-Pittsburgh compound B and 18F-FDG. *J Nucl Med*. 2012; 53(1):37-46
265. Garwood CJ, Ratcliffe LE, Simpson JE, Heath PR, Ince PG, Wharton SB. Review: Astrocytes in Alzheimer's disease and other age-associated dementias: a supporting player with a central role. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 2017; 43(4):281-298
266. Simpson JE, Ince PG, Lace G, Forster G, Shaw PJ, Matthews F, et al. Astrocyte phenotype in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain. *Neurobiol*

- Aging. 2010; 31(4):578-90
267. Rajasekar N, Dwivedi S, Nath C, Hanif K, Shukla R. Protection of streptozotocin induced insulin receptor dysfunction, neuroinflammation and amyloidogenesis in astrocytes by insulin. *Neuropharmacology*. 2014; 86:337-52
  268. Terwel D, Prickaerts J, Meng F, Jolles J. Brain enzyme activities after intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats receiving acetyl-L-carnitine. *Eur J Pharmacol*. 1995; 287(1):65-71
  269. Chen Y, Liang Z, Tian Z, Blanchard J, Dai CL, Chalbot S, et al. Intracerebroventricular streptozotocin exacerbates alzheimer-like changes of 3xTg-AD mice. *Molecular Neurobiology*. 2014; 49(1):547-62
  270. Pantel J, Schröder J, Jauss M, Essig M, Minakaran R, Schönknecht P, et al. Topography of callosal atrophy reflects distribution of regional cerebral volume reduction in Alzheimer's disease. *Psychiatry Res - Neuroimaging*. 1999; 90(3):181-92
  271. Black SE, Moffat SD, Yu DC, Parker J, Stanchev P, Bronskill M. Callosal atrophy correlates with temporal lobe volume and mental status in Alzheimer's disease. *Can J Neurol Sci*. 2000; 27(3):204-9
  272. Smailović, Una; Knezović, Ana; Mandel, Silvia; Youdim, Moussa; Šalković-Petrišić, Melita: Therapeutic potential of multifunctional iron-chelating agent M30 in a rat model of sporadic Alzheimer's disease // Drugi simpozij Hrvatskog društva za znanost o laboratorijskim životinjama s međunarodnim sudjelovanjem. Zagreb, Hrvastka, 2014.
  273. Knezović Ana: Kolinergični sustav u mozgu štakorkog modela eksperimentalne Alzheimerove bolesti izazvane streptozotocinom, Disertacija, Sveučilište u Zagrebu 2015.

## 11. BIOGRAFIJA

**ANDRIJA LONČAR**, rođen je 06.04.1984. godine u Zadru gdje je završio prirodoslovno matematičku gimnaziju „Franje Petrića“. Tijekom školovanja je osvojio prvo mjesto u županijskom natjecanju iz biologije. Diplomirao je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2010. godine i stekao zvanje doktora medicine. Pripravnički staž je odradio tijekom 2010. god te je od 2011. do 2015. godine radio kao liječnik u primarnoj zdravstvenoj zaštiti, u ambulantama obiteljske medicine te Zavodu za hitnu medicinu Zagrebačke županije. 2013 godine upisuje Doktorski studij „Biomedicina i zdravstvo“ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, tijekom kojeg izrađuje doktorsku disertaciju. Od 2015. godine je na specijalizaciji iz neurologije u Općoj bolnici Karlovac i KBC-u „Sestre Milosrdnice“. Suradivao je na 3 znanstvena projekta (istraživački Sveučilišni projekt Potpora 2, 2014-2015; istraživački projekt Hrvatske zaklade za znanost, IP-2014-09-4639, 2015–2018; istraživački podprojekt u istraživačkoj skupini 2 Znanstvenog centra izvrsnosti za bazičnu, kliničku i translacijsku neuroznanost Hrvatskog instituta za istraživanje mozga, GA KK01.1.1.01.0007). Aktivno je sudjelovao na mnogim domaćim, stranim i međunarodnim kongresima, seminarima i ljetnim školama, gdje je putem kongresnih sažetaka prezentirao rezultate istraživanja i prikaze slučajeva. Osim liječničkog poziva i znanstvenog rada bavi se igranjem s najslađom kćeri.

### Popis publikacija:

- *„Rat brain glucose transporter-2, insulin receptor and glial expression are acute targets of intracerebroventricular streptozotocin: risk factors for sporadic Alzheimer’s disease?“* A. Knezovic, A. Loncar, J. Homolak, U. Smailovic, J. Osmanovic Barilar, L. Ganoci, N. Bozina, P. Riederer & Melita Salkovic-Petrisic. *Journal of Neural Transmission* (2017).