

# Terapijski potencijal peroralno primijenjene galaktoze za kognitivne i metaboličke promjene u dvama eksperimentalnim modelima Alzheimerove bolesti

---

**Babić Perhoč, Ana**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2021**

*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:105:566097>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-31**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ana Babić Perhoč**

**Terapijski potencijal peroralno  
primijenjene galaktoze za kognitivne i  
metaboličke promjene u dvama  
eksperimentalnim modelima  
Alzheimerove bolesti**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2021.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ana Babić Perhoč**

**Terapijski potencijal peroralno  
primijenjene galaktoze za kognitivne i  
metaboličke promjene u dvama  
eksperimentalnim modelima  
Alzheimerove bolesti**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2021.

Disertacija je izrađena na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

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

*Ovu disertaciju posvećujem svojoj baki Antici, koja je u meni od malih nogu vidjela znanstvenicu i koja je uvijek i bezrezervno vjerovala u mene. Iako upravo zbog Alzheimerove bolesti više nije toga svjesna, nadam se da ipak zna da je bila moja najveća motivacija za ovaj uspjeh.*

*Zahvaljujem se svojoj obitelji, prijateljima, kolegama i mentorici na bezrezervnoj podršci u svakom koraku izrade ove disertacije. Svatko od vas me na svoj način poticao i pomogao mi da ostvarim ono što se u pojedinim trenucima činilo nedostižno i neostvarivo.*

# SADRŽAJ

KRATICE.....	1
POPIS SLIKA .....	1
POPIS TABLICA.....	1
1. UVOD I SVRHA RADA.....	1
1.1. Alzheimerova bolest .....	1
1.1.1. Patofiziologija Alzheimerove bolesti .....	1
1.1.2. Kognitivne promjene i dijagnoza Alzheimerove bolesti .....	10
1.2. Životinjski modeli Alzheimerove bolesti .....	11
1.2.1. Transgenični modeli .....	14
1.2.1.1. Mišji model Tg2576.....	16
1.2.1.2. Ostali transgenični modeli .....	18
1.2.2. Ne-transgenični modeli .....	21
1.2.2.1. Model izazvan intracerebroventrikularnom primjenom streptozotocina ....	22
1.2.2.1.1. Streptozotocin .....	22
1.2.2.1.2. Promjene uzrokovane središnjom primjenom streptozotocina .....	22
1.3. Liječenje Alzheimerove bolesti .....	24
1.3.1. Lijekovi za liječenje dijabetesa u liječenju Alzheimerove bolesti .....	26
1.3.2. Terapijski potencijal nutrijenata u Alzheimerovoj bolesti .....	31
1.3.2.1. Galaktoza .....	32
1.3.2.2. Primjena galaktoze u ljudi .....	32
1.3.2.3. Primjena galaktoze u animalnim modelima.....	33
2. HIPOTEZA .....	37
3. CILJEVI RADA.....	38
4. MATERIJALI I METODE .....	39
4.1. Životinje.....	39

4.2.	Plan istraživanja.....	40
4.3.	Farmakološki tretmani .....	42
4.3.1.	Streptozotocin.....	42
4.3.2.	Galaktoza.....	43
4.4.	Kognitivno i bihevioralno testiranje .....	44
4.4.1.	<i>Morris Water Maze</i> test plivanja u labirintu .....	44
4.4.2.	<i>Passive avoidance</i> test pasivnog izbjegavanja .....	45
4.4.3.	<i>Open field</i> test otvorenog polja .....	46
4.4.4.	<i>Elevated plus maze</i> test uzdignutog križnog labirinta .....	47
4.4.5.	<i>Nesting</i> test .....	48
4.5.	<i>In vivo</i> metaboličko mjerenje .....	49
4.6.	Intraperitonealni test tolerancije glukoze .....	51
4.7.	Uzimanje i priprema uzoraka za analizu .....	51
4.7.1.	Uzimanje krvi i likvora .....	51
4.7.2.	Žrtvovanje .....	52
4.7.3.	Homogeniziranje tkiva .....	53
4.7.4.	Mjerenje koncentracije proteina.....	54
4.8.	Biokemijske analize.....	54
4.8.1.	Mjerenje koncentracije glukoze u plazmi i likvoru.....	54
4.8.2.	Mjerenje koncentracije galaktoze u plazmi i likvoru .....	55
4.8.3.	Mjerenje koncentracije inzulina u plazmi i likvoru.....	55
4.8.4.	Mjerenje koncentracije ukupnog GLP-1 u plazmi i likvoru .....	56
4.8.5.	Mjerenje koncentracije aktivnog GLP-1 u plazmi .....	56
4.8.6.	Mjerenje koncentracije topivog amiloida $\beta$ u hipokampusu .....	57
4.9.	Western blot.....	57
4.10.	Imunohistokemija .....	60
4.11.	Statistička analiza i obrada podataka .....	61

5. REZULTATI.....	62
5.1. Rezultati Pokusa 1 i 2; učinak peroralno primijenjene galaktoze u štakorskom modelu sporadičnog oblika bolesti .....	62
5.1.1. Kognitivni i bihevioralni učinci .....	62
5.1.2. FDG-PET mjerenja .....	68
5.1.3. Biokemijski parametri .....	72
5.1.4. Western blot .....	74
5.1.5. Imunohistokemijska analiza .....	78
5.1.5.1. Biljeg astrocita GFAP .....	78
5.1.5.2. GLP-1 receptor.....	79
5.1.5.3. Fosforilirani protein tau – AT8 .....	82
5.1.5.4. Biljeg neurona NeuN .....	84
5.2. Rezultati pokusa 3 i 4, učinak peroralno primijenjene galaktoze u mišjem modelu familijarnog oblika bolesti.....	86
5.2.1. Kognitivni i bihevioralni učinci .....	86
5.2.2. FDG-PET mjerenja .....	97
5.2.3. Intraperitonealni test tolerancije glukoze (ipGTT).....	100
5.2.4. Biokemijski parametri .....	102
5.2.5. Western blot .....	103
5.2.6. Imunohistokemijska analiza .....	108
5.2.6.1. Biljeg astrocita GFAP .....	108
5.2.6.2. GLP-1 receptor.....	109
5.2.6.3. Fosforilirani protein tau – AT8 .....	111
5.2.6.4. Biljeg neurona NeuN .....	113
6. RASPRAVA .....	116
6.1. Učinak peroralno primijenjene galaktoze u štakorskom modelu sporadičnog oblika bolesti	116

6.2.	Učinak peroralno primijenjene galaktoze u mišjem modelu familijarnog oblika bolesti	123
6.3.	Usporedba patofiziologije i učinaka kronične peroralne primjene galaktoze u štakorskom modelu sAB-a i mišjem modelu fAB-a.....	127
7.	ZAKLJUČAK .....	131
8.	KRATKI SADRŽAJ .....	133
9.	SUMMARY .....	134
10.	POPIS LITERATURE .....	135
11.	KRATKA BIOGRAFIJA .....	185



## KRATICE

AB	-	Alzheimerova bolest
ADP	-	adenozin difosfat (engl. <i>adenosine diphosphate</i> )
AGE	-	krajnji produkti glikacije (engl. <i>advanced glycation end products</i> )
AICD	-	unutarstanična domena amiloidnog prekursorskog proteina (C-terminalni odsječak $\gamma$ )
Akt/PKB	-	protein kinaza B (engl. <i>protein kinase B</i> )
APOE	-	apolipoprotein E
APP	-	amiloidni prekursorski protein (engl. <i>amyloid precursor protein</i> )
AT8	-	fosforilirani protein tau (serin 202 i treonin 205)
ATP	-	adenozin trifosfat (engl. <i>adenosine triphosphate</i> )
A $\beta$	-	amiloid $\beta$
BACE	-	enzim beta-sekretaza 1 (engl. <i>beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1</i> )
BSA	-	goveđi serumski albumin (engl. <i>bovine serum albumin</i> )
C83	-	C-terminalni odsječak duljine 83 aminokiseline
C99	-	C-terminalni odsječak duljine 99 aminokiseline
CAA	-	moždana amiloidna angiopatija (engl. <i>cerebral amyloid angiopathy</i> )
CaMKII	-	kalcij/kalmodulin-ovisna kinaza II (engl. <i>Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependant protein kinase II</i> )
cAMP	-	ciklički adenzin monofosfat (engl. <i>cyclic adenine monophosphate</i> )
CDK5	-	ciklin-ovisna kinaza 5 (engl. <i>cyclin-dependent kinase 5</i> )
COX2	-	ciklooksigenaza 2 (engl. <i>cyclooxygenase 2</i> )
CPD3B	-	ciklička fosfodiesteraza 3- $\beta$ (engl. <i>cyclic phosphodiesterase 3-beta</i> )
CTR	-	kontrolna životinja / grupa kontrolnih životinja (engl. <i>control</i> )

CTX	-	moždana kora (engl. <i>cortex</i> )
dH <sub>2</sub> O	-	destilirana voda
ddH <sub>2</sub> O	-	deionizirana destilirana voda
DM1	-	dijabetes tipa 1 (lat. <i>diabetes mellitus</i> )
DM2	-	dijabetes tipa 2 (lat. <i>diabetes mellitus</i> )
DNK	-	deoksiribonukleinska kiselina
DPP-IV	-	dipeptidil peptidaza-IV (engl. <i>dipeptidyl peptidase-IV</i> )
DTT	-	ditiotritol
EDTA	-	etilendiamintetraoctena kiselina
ELISA	-	imunoenzimski test (engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
EOAD	-	Alzheimerova bolest s ranim nastupom simptoma (engl. <i>early-onset Alzheimer's disease</i> )
EPM	-	test uzdignutog križnog labirinta (engl. <i>Elevated Plus Maze</i> )
fAB	-	familijarna Alzheimerova bolest
FDG	-	fluorodeoksiglukoza
GABA	-	γ-aminomaslačna kiselina (engl. <i>γ-aminobutyric acid</i> )
GAL	-	galaktoza
GALE	-	uridildifosfat-galaktoza epimeraza (engl. <i>uridine diphosphate-galactose 4-epimerase</i> )
GALK	-	galaktokinaza (engl. <i>galactokinase</i> )
GALT	-	galaktoza-1-fosfat uridiltransferaza (engl. <i>galactose-1-phosphate uridylyltransferase</i> )
GFAP	-	kiseli vlaknasti protein glije (engl. <i>glial fibrillary acidic protein</i> )
GLK	-	glukoza
GIP	-	želučani inhibitorni polipeptid; inzulinotropini polipeptid ovisan o glukozi (engl. <i>gastric inhibitory polypeptide</i> )

GLP-1	-	glukagonu sličan peptid 1 (engl. <i>glucagon-like peptide 1</i> )
GLP-1R	-	receptor glukagonu sličnog peptida 1 (engl. <i>glucagon-like peptide 1 receptor</i> )
GLUT	-	nosač glukoze (engl. <i>glucose transporter</i> )
GSK3	-	glikogen sintaza kinaza 3 (engl. <i>glycogen synthase kinase 3</i> )
HPC	-	hipokampus (engl. <i>hippocampus</i> )
HPT	-	hipotalamus (engl. <i>hypothalamus</i> )
HRP	-	peroksidaza iz hrena (engl. <i>horseradish peroxidase</i> )
icv	-	intracerebroventrikularna primjena
IDE	-	enzim koji razgrađuje inzulin (engl. <i>insulin degrading enzyme</i> )
IgG	-	imunoglobulin G
IHC	-	imunohistokemija (engl. <i>immunohistochemistry</i> )
ip	-	intraperitonealna primjena
IR	-	inzulinski receptor (engl. <i>insulin receptor</i> )
IRBS	-	inzulinska rezistencija u mozgu (engl. <i>insulin-resistant brain state</i> )
IRS	-	supstrat inzulinskog receptora (engl. <i>insulin receptor substrate</i> )
LOAD	-	Alzheimerova bolest s kasnim nastupom simptoma (engl. <i>late-onset Alzheimer's disease</i> )
LSWB	-	puffer za ispiranje s niskom količinom soli (engl. <i>low-salt washing buffer</i> )
LRP	-	protein povezan s receptorom za apolipoprotein (engl. <i>lipoprotein receptor-related protein</i> )
LTP	-	dugoročna potencijacija (engl. <i>long-term potentiation</i> )
MAPK	-	mitogenom-aktivirana protein kinaza (engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i> )
MAPT	-	s mikrotubulima povezan protein tau (engl. <i>microtubule-associated protein tau</i> )

MCI	-	blagi kognitivni deficit (engl. <i>mild cognitive impairment</i> )
MMSE	-	test minimalne mentalne procjene (engl. <i>mini mental state exam</i> )
MWM	-	test plivanja u labirintu (engl. <i>Morris water maze</i> )
NAD <sup>+</sup>	-	oksidirani oblik nikotinamid adenin dinukleotida
NADPH	-	reducirani oblik nikotinamid adenin dinukleotid fosfata
NeuN	-	biljeg za ekspresiju neurona
NGF	-	čimbenik rasta živčanih stanica (engl. <i>nerve growth factor</i> )
NO	-	dušikov oksid (engl. <i>nitric oxide</i> )
NOS	-	sintaza dušikovog oksida (engl. <i>nitric oxide synthase</i> )
NP-40	-	nonil fenoksipolietoksiletanol
OF	-	test otvorenog polja (engl. <i>open field</i> )
p.o.	-	peroralna primjena
PAF	-	čimbenik aktivacije trombocita (engl. <i>platelet-activating factor</i> )
PAT	-	test pasivnog izbjegavanja (engl. <i>passive avoidance</i> )
PDK	-	fosfatidilinozitol-ovisna kinaza (engl. <i>phosphatidylinositol-dependent kinase</i> )
PET	-	pozitronska emisijska tomografija
PHF	-	spareni uzvojniti filamenti (engl. <i>paired helical filaments</i> )
Pi3K	-	fosfatidilinozitol kinaza-3 (engl. <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i> )
PPAR- $\gamma$	-	receptor $\gamma$ aktiviran peroksizomskim proliferatorom (engl. <i>peroxisome proliferator-activated receptor <math>\gamma</math></i> )
PSEN	-	presenilin
ROS	-	reaktivni kisikovi spojevi (engl. <i>reactive oxygen species</i> )
sAB	-	sporadična Alzheimerova bolest
SAM	-	mišji model ubrzanog starenja (engl. <i>senescence accelerated mouse</i> )

sAPP $\alpha$	-	topiva ektodomena APP-s $\alpha$
sAPP $\beta$	-	topiva ektodomena APP-s $\beta$
SD	-	standardna devijacija
SDS-PAGE	-	elektroforeza s natrij dodecil sulfat poliakrilamidnim gelovima (engl. <i>sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
SGLT	-	natrij-glukoza kotransporter 2 (engl. <i>sodium/glucose cotransporter</i> )
STZ	-	streptozotocin / streptozotocinom tretirana životinja / grupa streptozotocinom tretiranih životinja
TG	-	transgenična životinja / grupa transgeničnih životinja
UDP	-	uridin difosfat (engl. <i>uridine diphosphate</i> )
UTP	-	uridin trifosfat (engl. <i>uridine triphosphate</i> )
WB	-	Western blot
WT	-	divlji tip životinje / grupa divljih (kontrolnih) životinja (engl. <i>wild type</i> )

## POPIS SLIKA

Slika 1 Proteolitičko cijepanje amiloidnog prekursorškog proteina amiloidogenim i ne-amiloidogenim putem te posljedično nakupljanje plakova amiloida beta u mozgu. ....	3
Slika 2 Hipoteza amiloidne kaskade; prilagođeno prema Hass i Selkoe, 2007. (37).....	4
Slika 3 Uloga proteina tau u zdravom mozgu i u mozgu bolesnika s Alzheimerovom bolesti. 6	
Slika 4 Posljedice inzulinske rezistencije u mozgu; prema Li i Hölscher, 2007. (88). ....	9
Slika 5 Fenotipska karakterizacija promjena u mišjem modelu Tg2576 u odnosu na starost životinje; prema bazi AlzForum.org (209).....	17
Slika 6 Pretpostavljeni mehanizam blagotvornog učinka galaktoze na snižene unutarstanične razine glukoze u modelu sporadične Alzheimerove bolesti izazvanom intracerebroventrikularnom primjenom streptozotocina i metabolizam galaktoze u Leloirovom putu; prema Šalković-Petrišić i sur., 2014. (263).....	36
Slika 7 Tijek provođenja Pokusa 1 i 2 na štakorima. ....	41
Slika 8 Tijek provođenja Pokusa 3 i 4 na miševima. ....	42
Slika 9 Prikaz provođenja Morris Water Maze testa plivanja u labirintu u Pokusu 1 iz programa EthoVisionXT. ....	45
Slika 10 Uređaj za izvođenje testa pasivnog izbjegavanja i provođenje testa u Pokusu 1. ....	46
Slika 11 Prikaz provođenja testa otvorenog polja iz programa EthoVisionXT. ....	47
Slika 12 Instrument za izvođenje testa uzdignutog križnog labirinta i izvođenje testa u Pokusu 4. ....	48
Slika 13 Ocjenjivačka skala nesting testa i primjeri pojedinih ocjena iz provođenja testa u Pokusu 3. ....	49
Slika 14 Raytest ClearPET™ skener za male životinje Instituta Ruđer Bošković na kojem je prodveno in vivo mjerenje unosa <sup>18</sup> F-fluorodeoksiglukoze u stanice mozga. ....	50
Slika 15 Postupak uzimanja likvora iz cisterne magne štakora u Pokusu 2.....	52
Slika 16 Učenje u Morris Water Maze testu plivanja u labirintu u štakora u Pokusu 1. ....	63
Slika 17 Probe trial Morris Water Maze testa plivanja u labirintu u štakora u Pokusu 1. ....	64
Slika 18 Passive avoidance test strahom uvjetovanog učenja u štakora u Pokusu 1.....	64

Slika 19 Aktivnost štakora u Morris Water Maze bazenu u Pokusu 1.....	65
Slika 20 Učenje u Morris Water Maze testu plivanja u labirintu u štakora u Pokusu 2. ....	66
Slika 21 Probe trial Morris Water Maze testa plivanja u labirintu u štakora u Pokusu 2. ....	67
Slika 22 Passive avoidance test strahom uvjetovanog učenja u štakora u Pokusu 2.....	67
Slika 23 Aktivnost štakora u Morris Water Maze bazenu u Pokusu 2.....	68
Slika 24 Pozitronska emisijska tomografija (PET) unosa radioaktivno obilježenog analoga glukoze fluorodeoksiglukeze (FDG) u mozgu štakora u Pokusu 1. ....	70
Slika 25 Pozitronska emisijska tomografija (PET) unosa radioaktivno obilježenog analoga glukoze fluorodeoksiglukeze (FDG) u mozgu štakora u Pokusu 2. ....	72
Slika 26 Rezultati Western blot mjerenja ekspresije proteina povezanih s inzulinskim sustavom, nosačima za glukozu, amiloidnom i tau patologijom te GLP-1 receptorom u hipokampusu štakora u Pokusu 1.....	75
Slika 27 Rezultati Western blot mjerenja ekspresije proteina povezanih s inzulinskim sustavom, nosačima za glukozu, amiloidnom i tau patologijom te GLP-1 receptorom u hipokampusu štakora u Pokusu 2.....	77
Slika 28 Ekspresija kiselog vlaknastog proteina glije (GFAP) u parijetalnoj moždanoj kori štakora iz Pokusa 1 vizualizirana imunohistokemijskom metodom. ....	78
Slika 29 Ekspresija kiselog vlaknastog proteina glije (GFAP) u parijetalnoj moždanoj kori štakora iz Pokusa 2 vizualizirana imunohistokemijskom metodom. ....	79
Slika 30 Ekspresija receptora za glukagonu sličan peptid-1 (GLP-1R) u hipotalamusu štakora iz Pokusa 1 vizualizirana imunohistokemijskom metodom.....	80
Slika 31 Ekspresija receptora za glukagonu sličan peptid-1 (GLP-1R) u hipotalamusu štakora iz Pokusa 2 vizualizirana imunohistokemijskom metodom.....	81
Slika 32 Ekspresija receptora za glukagonu sličan peptid 1 (GLP-1R) u parijetalnoj moždanoj kori štakora iz Pokusa 2 vizualizirana imunohistokemijskom metodom. ....	82
Slika 33 Ekspresija fosforiliranog proteina tau na serinu 202 i treoninu 205 (AT8) u hipokampusu štakora iz Pokusa 1 vizualizirana imunohistokemijskom metodom.....	83
Slika 34 Ekspresija fosforiliranog proteina tau na serinu 202 i treoninu 205 (AT8) u hipotalamusu štakora iz Pokusa 2 vizualizirana imunohistokemijskom metodom.....	84

Slika 35 Ekspresija biljega za neurone NeuN u hipotalamusu štakora u Pokusu 1 vizualizirana imunohistokemijskom metodom. ....	85
Slika 36 Ekspresija biljega za neurone NeuN u parijetalnoj moždanoj kori štakora u Pokusu 2 vizualizirana imunohistokemijskom metodom. ....	86
Slika 37 Učenje u Morris Water Maze testu plivanja u labirintu u miševa u Pokusu 3.....	87
Slika 38 Probe trial Morris Water Maze testa plivanja u labirintu u miševa Pokusu 3.....	88
Slika 39 Passive avoidance test strahom uvjetovanog učenja u miševa Pokusu 3.....	88
Slika 40 Aktivnost miševa u Morris Water Maze bazenu u Pokusu 3. ....	89
Slika 41 Open field test otvorenog polja proveden u miševa u Pokusu 3.....	90
Slika 42 Nesting test svijanja gnijezda proveden u miševa u Pokusu 3.....	91
Slika 43 Učenje u Morris Water Maze testu plivanja u labirintu u miševa u Pokusu 4.....	92
Slika 44 Probe trial Morris Water Maze testa plivanja u labirintu u miševa u Pokusu 4.....	93
Slika 45 Passive avoidance test strahom uvjetovanog učenja u miševa u Pokusu 4.....	93
Slika 46 Aktivnost miševa u Morris Water Maze bazenu u Pokusu 4. ....	94
Slika 47 Open field test otvorenog polja proveden u miševa u Pokusu 4.....	95
Slika 48 Nesting test svijanja gnijezda proveden u miševa u Pokusu 4.....	96
Slika 49 EPM test uzdignutog križnog labirinta proveden u miševa u Pokusu 4. ....	97
Slika 50 Pozitronska emisijska tomografija (PET) unosa radioaktivno obilježenog analoga glukoze fluorodeoksigluoze (FDG) u mozgu miševa u Pokusu 3.....	98
Slika 51 Pozitronska emisijska tomografija (PET) unosa radioaktivno obilježenog analoga glukoze fluorodeoksigluoze (FDG) u mozgu miševa u Pokusu 4.....	100
Slika 52 Intraperitonealni test tolerancije glukoze u miševa u Pokusu 3. ....	101
Slika 53 Intraperitonealni test tolerancije glukoze u miševa u Pokusu 4. ....	102
Slika 54 Rezultati Western blot mjerenja ekspresije proteina povezanih s inzulinskim sustavom, nosačima za glukožu, amiloidnom i tau patologijom te GLP-1 receptorom u hipokampusu miševa u Pokusu 3.....	105
Slika 55 Rezultati Western blot mjerenja ekspresije proteina povezanih s inzulinskim sustavom, nosačima za glukožu, amiloidnom i tau patologijom te GLP-1 receptorom u hipokampusu miševa u Pokusu 4.....	107



Slika 56 Ekspresija kiselog vlaknastog proteina glije (GFAP) u hipotalamusu miševa iz Pokusa 3 vizualizirana imunohistokemijskom metodom. ....	108
Slika 57 Ekspresija kiselog vlaknastog proteina glije (GFAP) u hipokampusu miševa iz Pokusa 4 vizualizirana imunohistokemijskom metodom. ....	109
Slika 58 Ekspresija receptora za glukagonu sličan peptid-1 (GLP-1R) u hipotalamusu miševa iz Pokusa 3 vizualizirana imunohistokemijskom metodom. ....	110
Slika 59 Ekspresija receptora za glukagonu sličan peptid-1 (GLP-1R) u hipotalamusu miševa iz Pokusa 4 vizualizirana imunohistokemijskom metodom. ....	111
Slika 60 Ekspresija fosforiliranog proteina tau na serinu 202 i treoninu 205 (AT8) u hipotalamusu miševa iz Pokusa 3 vizualizirana imunohistokemijskom metodom. ....	112
Slika 61 Ekspresija fosforiliranog proteina tau na serinu 202 i treoninu 205 (AT8) u parijetalnoj moždanoj kori miševa iz Pokusa 4 vizualizirana imunohistokemijskom metodom. ....	113
Slika 62 Ekspresija biljega za neurone NeuN u parijetalnoj moždanoj kori miševa u Pokusu 3 vizualizirana imunohistokemijskom metodom. ....	114
Slika 63 Ekspresija biljega za neurone NeuN u parijetalnoj moždanoj kori miševa u Pokusu 4 vizualizirana imunohistokemijskom metodom. ....	115

## POPIS TABLICA

Tablica 1 Životinjski modeli različitih vrsta demencija i kognitivnog deficita; prema Neha i sur., 2014. (121). .....	12
Tablica 2 Značajne mutacije u istraživanju Alzheimerove bolesti; prema Myers i McGonigle, 2019. (207). .....	15
Tablica 3 Karakteristike najčešće korištenih mišjih transgeničnih modela familijarne Alzheimerove bolesti; prema Myers i McGonigle, 2019. (223) i Alzforum.org (224). .....	18
Tablica 4 Terapijski učinci različitih antidijabetika na obilježja Alzheimerove bolesti u eksperimentalnim životinjskim studijama i kliničkim ispitivanjima (258,291,311–338). .....	27
Tablica 5 Izmjereni biokemijski parametri iz uzoraka krvne plazme, likvora i hipokampusa štakora u Pokusu 1. ....	73
Tablica 6 Izmjereni biokemijski parametri iz uzoraka krvne plazme, likvora i hipokampusa štakora u Pokusu 2. ....	73
Tablica 7 Izmjereni biokemijski parametri iz uzoraka krvne plazme i hipokampusa miševa u Pokusu 3. ....	102
Tablica 8 Izmjereni biokemijski parametri iz uzoraka krvne plazme i hipokampusa miševa u Pokusu 4. ....	103
Tablica 9 Usporedba izmjerenih parametara u dva stadija štakorskog modela sporadičnog oblika i mišjeg modela familijarnog oblika Alzheimerove bolesti te utjecaj peroralne galaktoze na mjerene parametre. ....	128

# **1. UVOD I SVRHA RADA**

## **1.1. Alzheimerova bolest**

Alzheimerova bolest (AB) najčešći je neurodegenerativni poremećaj povezan s progresivnim gubitkom pamćenja te vodeći uzrok morbiditeta i mortaliteta u starijoj populaciji (1,2). AB predstavlja najčešći oblik demencije, i čini 50-70% svih slučajeva demencije (3), a nakon 65. godine, AB je uzrokom demencije u više od 80% dementnih bolesnika (4). Prema posljednjim podacima, 50 milijuna ljudi u svijetu boluje od demencije, a procjenjuje se da će se njihov broj utrostručiti do 2050. godine (5). Iako je u Hrvatskoj točan broj oboljelih nepoznat zbog nedostatka registra bolesnika s AB-om, pretpostavlja se da 10% osoba iznad 65 godina starosti ima neki oblik demencije, pa uz podatak da oko 16% hrvatske populacije čine stariji od 65 godina, dolazimo do brojke od oko 80.000 oboljelih u Hrvatskoj (6). AB i demencija predstavljaju veliki osobni, obiteljski i javnozdravstveni teret čiji je globalni trošak samo u 2018. godini premašio 1 bilijun američkih dolara, a do 2030. godine ta će se brojka udvostručiti (5).

### **1.1.1. Patofiziologija Alzheimerove bolesti**

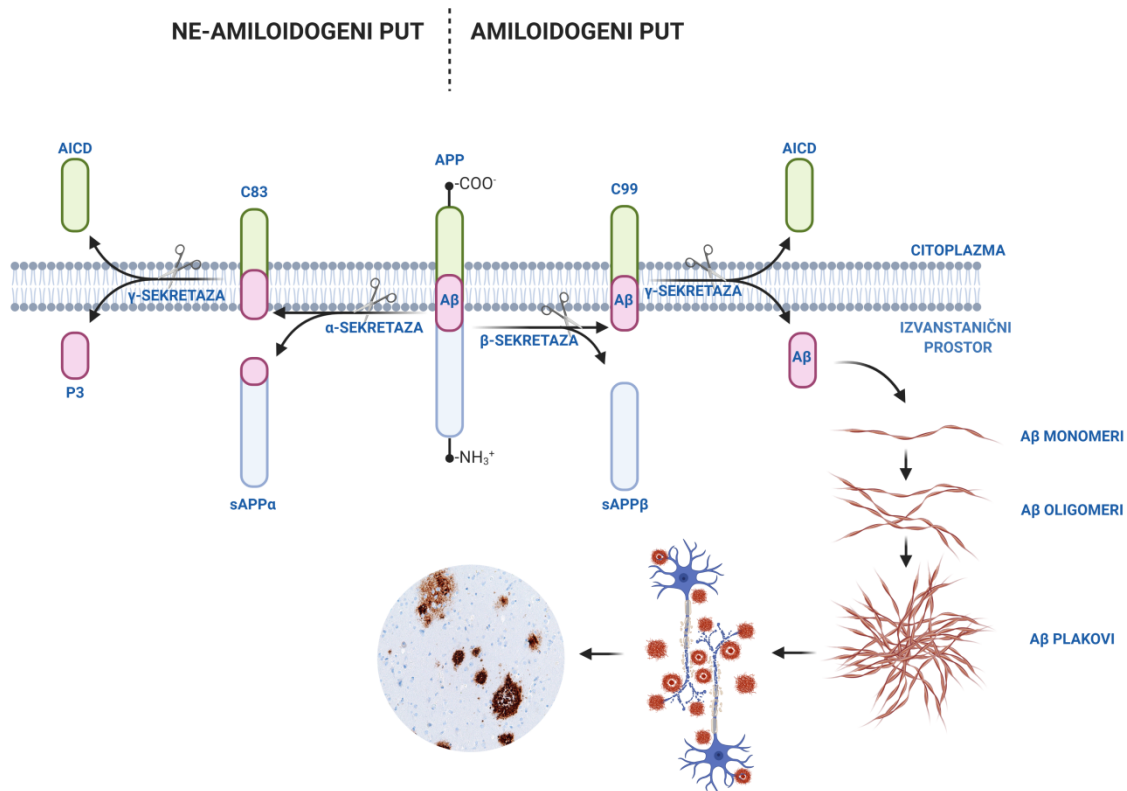
AB je kompleksna, multifaktorijska bolest, čija je precizna patogenetska osnova još uvijek nejasna; što zbog izuzetne složenosti ljudskog mozga, što zbog manjka savršenog animalnog modela koji bi omogućio istovremeno istraživanje svih patofizioloških mehanizama koji dovode do kliničke slike bolesti (7). Osim toga, iako se AB tradicionalno smatra neurološkim poremećajem, eksperimentalni, epidemiološki i klinički podaci ukazuju da znakovi bolesti sežu i dalje od mozga. Sistemske promjene u organizmu vezane uz AB nisu nužno sekundarne posljedice moždane degeneracije u AB-u, nego su vjerojatno odraz pozadinskih procesa koji su povezani s napretkom bolesti (8).

Još od prvog poznatog slučaja 51-godišnje pacijentice Auguste Deter, opisanog od dr. Aloisa Alzheimer 1907. godine (9), poznato je da su glavne patohistološke odrednice AB-a postojanje senilnih plakova beta amiloida i neurofibrilarnih snopića proteina tau u mozgu oboljelih bolesnika. Klinički se, i prije vidljivih patoloških promjena na mozgu, u bolesnika javlja kognitivni deficit, koji uključuje gubitak pamćenja, govorne probleme i izvršnu disfunkciju,

kao i funkcionalni deficiti poput psihijatrijskih simptoma, depresije, halucinacija, deluzija i agitacije (10).

Iako je etiopatogenetska podloga nastanka bolesti dijelom nepoznata, razlikuju se dvije vrste bolesti ovisno o njezinom uzroku; u manjem broju slučajeva, njih 4-8%, radi se o genetski uvjetovanom, familijarnom obliku bolesti (fAB) s ranim nastupom simptoma (EOAD, engl. *early-onset Alzheimer's disease*), dok je većina oboljelih pogođena sporadičnim oblikom AB (sAB) s kasnijim nastupom simptoma (LOAD, engl. *late-onset Alzheimer's disease*) i bez jasne i dokazane nasljedne podloge, ali s mnogim rizičnim faktorima i genima (10,11). Zbog mnogih nepoznanica u etiopatogenezi bolesti, tijekom godina istraživanja razvile su se mnoge hipoteze koje su pokušale objasniti AB, uključujući najprominentniju hipotezu amiloidne kaskade te tau hipotezu, kao i hipotezu kolinergičnog deficita, oksidativnog stresa, upale, i moždane deprivacije glukoze (7,12).

Najzastupljenija, amiloidna hipoteza, koju su 1991. godine predstavili Hardy i Allsop (13), nastala je kao posljedica otkrića mehanizama nastanka fAB (14). fAB je uzrokovana mutacijama na tri gena koje se prenose autosomno dominantno; genu za amiloidni prekursorski protein (APP) na kromosomu 21 te genima za presenilin 1 i 2 (PSEN 1 i 2) na kromosomima 14 i 1 (15). APP je transmembranski protein, prekursor amiloida beta ( $A\beta$ ), dok su PSEN1 i PSEN2 katalitičke jedinice kompleksa  $\gamma$ -sekretaze, enzima koji sudjeluje u cijepanju APP-a i nastanku  $A\beta$  (16). Cijepanje APP-a na peptide  $A\beta$  različitih duljina provodi se dvama različitim putevima, amiloidogenim (koji uključuje enzime  $\beta$ - i  $\gamma$ -sekretazu te je favoriziran kod mutacija APP-a, PSEN-1 i PSEN-2) i ne-amiloidogenim putem (koji uključuje enzime  $\alpha$ - i  $\gamma$ -sekretazu) (Slika 1).

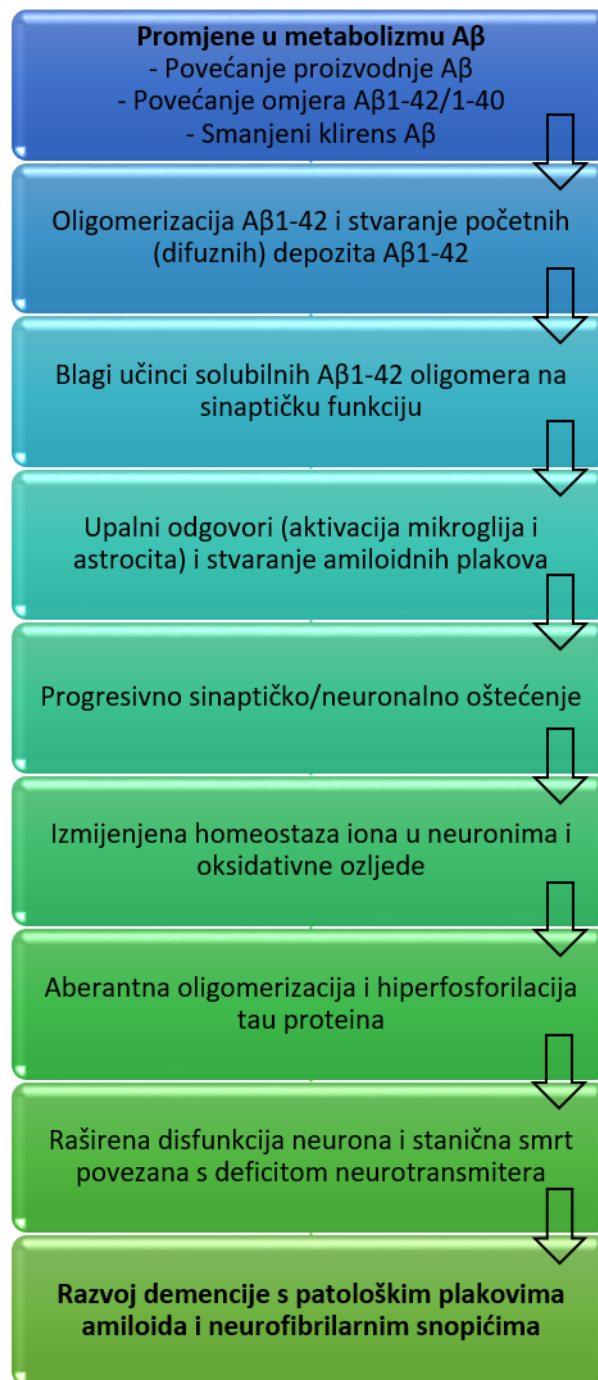


**Slika 1** Proteolitičko cijepanje amiloidnog prekursorškog proteina amiloidogenim i ne-amiloidogenim putem te posljedično nakupljanje plakova amiloida beta u mozgu.

APP – amiloidni prekursorški protein; Aβ – amiloid beta; sAPPα – topiva ektodomena APP-a α; sAPPβ – topiva ektodomena APP-a β; C99 – C-terminalni odsječak duljine 99 aminokiselina; C83 – C-terminalni odsječak duljine 83 aminokiseline; P3 – p3 peptid; AICD – APP unutarstanična domena (C-terminalni odsječak γ).

Proizvodnja Aβ u stanicama sisavaca odvija se tijekom cijelog života te se može detektirati u plazmi i likvoru i u nepatološkim stanjima (17). Ne-amiloidogeni put obrade APP-a započinje cijepanjem α-sekretazom na 16. aminokiselini sekvence APP-a s C-terminalne strane i posljedičnim stvaranjem N-terminalne topive ektodome APP-a α (sAPPα) izvanstanično te C-terminalnog odsječka duljine 83 aminokiseline (C83) unutar stanice (18,19). Odsječak C83 dalje se cijepa γ-sekretazom na manji odsječak peptid p3 (Aβ17-42) i APP unutarstaničnu domenu (AICD; odnosno, C-terminalni odsječak γ) (20). Istraživanja odsječka sAPPα pokazala su da posjeduje neurotrofička i neuroprotektivna svojstva (21,22), te da je njegova razina u likvoru pacijenata oboljelih od AB-a snižena (23,24). Također, odsječak p3, za razliku od duljih varijanti Aβ, općenito nije dio amiloidnih plakova i depozita amiloida u moždanoj vaskulaturi (25,26). S druge strane, amiloidogeni put cijepanja APP-a započinje enzimom β-sekretaza čime se stvara N-terminalna topiva ektodomena APP-a β (sAPPβ) izvan stanice te C-terminalni odsječak duljine 99 aminokiselina (C99) unutar stanice, koji se dalje enzimom γ-sekretaza

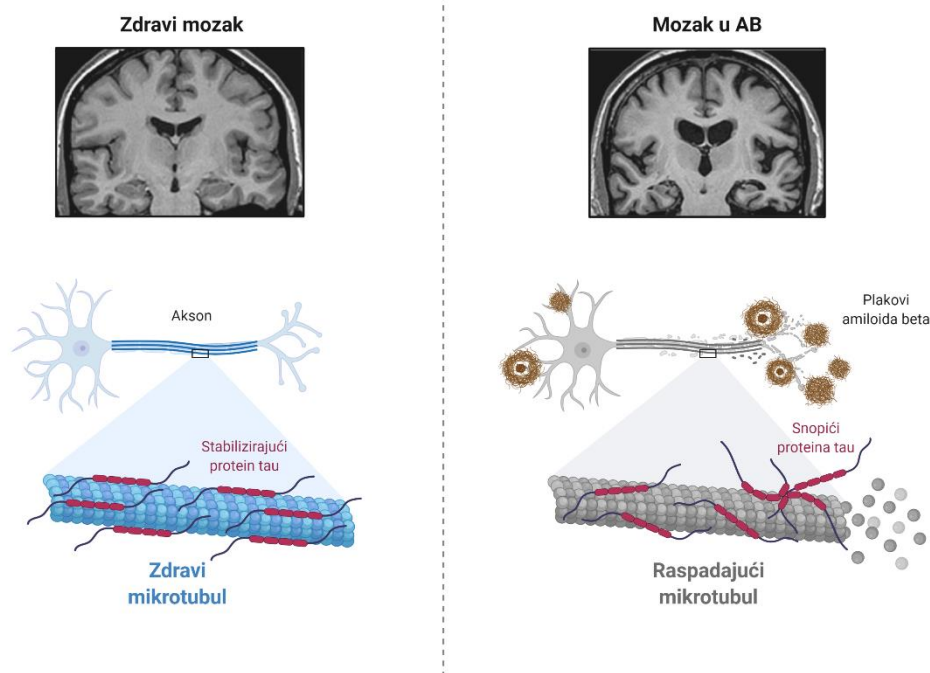
cijepa na odsječke AICD i odsječke A $\beta$  različitih duljina, među kojima je i A $\beta$ 1-42 koji je skloniji nakupljanju i formiranju plakova od prevladavajućeg A $\beta$ 1-40 te pokazuje snažniju neurotoksičnost (27–30). Nakupljanje A $\beta$  i difuzno formiranje plakova posljedično dovode do aktivacije mikroglia, otpuštanja citokina, reaktivne astrocitoze i multi-proteinskog upalnog odgovora (31–33). Biokemijske i strukturne promjene u okolnim neuronima nadalje dovode do gubitka sinapsi i neurona te općenite atrofije mozga (34–36) (Slika 2).



*Slika 2 Hipoteza amiloidne kaskade; prilagođeno prema Hass i Selkoe, 2007. (37).*

U konačnici, amiloidna hipoteza postulira da nakupljanje A $\beta$  u različitim područjima mozga djeluje kao patološki okidač za kaskadu koja uključuje stvaranje intraneuronalnih snopića proteina tau, čiji je krajnji rezultat neuronalna smrt i demencija (17,38). Osim spomenutih mutacija gena za APP, PSEN1 i PSEN2, nakupljanje A $\beta$  povećano je i u pojedinaца nositelja alela  $\epsilon$ 4 gena za apolipoprotein E (APOE). Biokemijske, stanične i animalne studije pokazale su da izoforma APOE4 dovodi do pojačanog nakupljanja peptida A $\beta$  i njegovog smanjenog klirensa u mozgu, što pokreće patogenezu AB-a (39).

Nastavno na amiloidnu hipotezu, razvijena je tau hipoteza nastanka AB-a. Proteini tau poglavito se nalaze na neuronima te pripadaju obitelji proteina povezanim s mikrotubulima (MAPT, engl. *microtubule-associated protein tau*) (40). U odraslom mozgu identificirano je šest izoformi proteina tau koji nastaju alternativnim izrezivanjem jednog gena koji se nalazi na dugom kraku kromosoma 17 (41,42), a čija je uloga važna u stvaranju mikrotubula i stabilizaciji neuronske mreže mikrotubula (43). Fosforilacija proteina tau razvojno je regulirana od fetalne do odrasle dobi (44); proteini tau nezrelog mozga mogu se fosforilirati na 6 do 8 mjesta prisutnih na najkraćim izoformama, dok se u odraslom mozgu fosforilacija odvija na 2 do 3 mjesta u svih šest izoformi proteina (45). Učinkovitost vezivanja proteina tau na mikrotubule regulira se post-translacijski moduliranjem fosforilacije treonina i serina i O-glikozilacije (46). Hiperfosforilacija proteina tau različitim kinazama, poput  $\beta$ -izoforme glikogen sintaza kinaze 3 (GSK3, engl. *glycogen synthase kinase 3*), ciklin-ovisne kinaze 5 (CDK5, engl. *cyclin-dependent kinase 5*), mitogenom-aktivirane protein kinaze (MAPK, engl. *mitogen-activated protein kinase*), Akt kinaze (protein kinaza B), protein kinaze A i kalcij/kalmodulin-ovisne protein kinaze II (CaMKII, engl. *Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase II*), dovodi do smanjenja afiniteta proteina tau prema mikrotubulima (10,47). Hiperfosforilirani protein tau je netopljiv te se spaja s drugim proteinima tau u sparene uzvojite filamente (PHF; od engl. *paired helical filaments*) i neurofibrilarne snopiće (48) (Slika 3).



**Slika 3 Uloga proteina tau u zdravom mozgu i u mozgu bolesnika s Alzheimerovom bolešću.**

Poput oligomera A $\beta$ , agregati proteina tau citotoksični su (49) i dovode do kognitivnih deficita (50,51). Gubitak normalne funkcije proteina tau dovodi do patoloških oštećenja u strukturalnoj i regulatornoj funkciji citoskeleta, što utječe na fiziološke funkcije neurona, poput održavanja odgovarajuće morfologije i aksonalnog transporta, te dovodi do sinaptičke disfunkcije i neurodegeneracije (52). U AB-u, povećane vrijednosti fosforiliranog i ukupnog proteina tau u likvoru koreliraju sa smanjenim rezultatima kognitivnih testova (53). Osim toga, povećane razine fosfo-tau aminokiselina T181 i T231 te ukupnog proteina tau u likvoru čine dobar biomarker za predviđanje nastanka AB-a u pacijenata s blagim kognitivnim deficitom (54–56). Eksperimentalni podaci pokazali su da nakupljanje A $\beta$  prethodi i pokreće nakupljanje proteina tau (57–59) te da s A $\beta$  povezana degeneracija i neurotoksičnost u kulturama stanica i kognitivni deficit u animalnim transgeničnim modelima AB-a zahtijevaju prisustvo endogenog proteina tau (60,61).

Acetilholin je jedan od ključnih neurotransmitera u mnogim fiziološkim procesima poput pažnje, učenja, pamćenja, budnosti, spavanja i senzoričkih procesa (62–66). Stoga su, oštećenje kolinergičnih neurona u Meynartovoj bazalnoj jezgri (67), smanjena aktivnost enzima kolin acetiltransferaze i snižena koncentracija acetilkolina u regijama poput amigdale, hipokampusa i moždane kore koji su nađeni u mozgu oboljelih od AB-a, još 1976. godine doveli do stvaranja

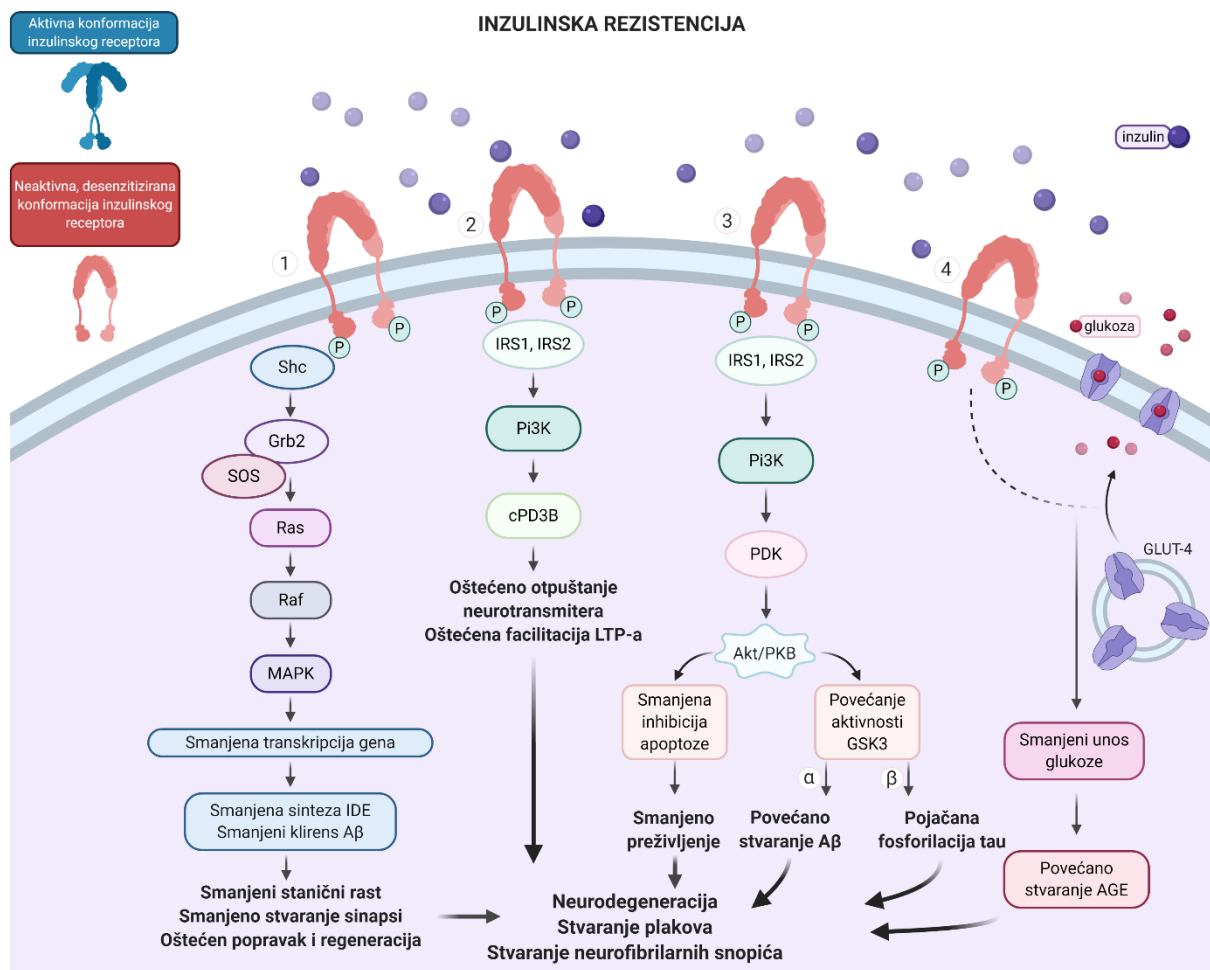


kolinergične hipoteze AB-a (68) i koncepta da je AB posljedica propasti kolinergičnog sustava u mozgu (69). Nastavno na ovu hipotezu razvijeni su i prvi lijekovi za liječenje simptoma AB-a; inhibitori enzima acetilkolinesteraze poput takrina i fizostigmina (70).

U posljednjim je godinama otkriveno sve više dokaza da je AB metabolička neurodegenerativna bolest; odnosno, skup metaboličkih poremećaja koje dovode do promjena u mozgu povezanih s inzulinskom rezistencijom (71). Poremećaji u iskorištenju glukoze u mozgu i energetske metabolizmu mozga predstavljaju vrlo rane promjene u AB-u koje prethode pojavi kognitivnih deficita (72), što je dovelo do razvoja koncepta uloge inzulinske rezistencije u mozgu (IRBS, engl. *insulin-resistant brain state*) u patogenezi AB-a i prijedloga shvaćanja AB-a kao moždanog oblika dijabetesa neovisnog o inzulinu (73), prema nekima smatranim „dijabetesom tipa 3“ (74,75). Dijabetes tipa 2 (DM2) kompleksna je, kronična bolest starije dobi koju karakteriziraju hiperglikemija, stanična inzulinska rezistencija i kronična upala koji uzrokuju ubrzano starenje (76) i dovode do preuranjenog mortaliteta. DM2 predstavlja značajan rizični čimbenik za nastanak kognitivnog deficita i demencije: gotovo dvostruko povećava dugoročni rizik razvoja demencije, a jedan od deset slučajeva demencije u svijetu može se pripisati učincima DM2 (77). Ova recipročna veza u prevalenciji ovih kroničnih poremećaja posljedica je nekoliko važnih zajedničkih svojstava ovih bolesti koje dovode do neurodegeneracije, među kojima su najvažniji oštećena inzulinska signalizacija, akumulacija A $\beta$ , hiperfosforilacija proteina tau, oksidativni stres, vaskularno oštećenje i upala (78,79).

Djelovanje inzulina u mozgu stimulira modulaciju mnogobrojnih molekularnih kaskada, poput homeostaze glukoze, potrošnje energije, metabolizma kolesterola, sinaptogeneze, neurotrofije, kognicije, pamćenja, upale, apoptoze i dr. (80). Uz to, inzulin regulira i metabolizam A $\beta$  i hiperfosforiliranog proteina tau, a poremećaj funkcije inzulina u dijabetičkim uvjetima, poput hiperinzulinemije i hiperglikemije, dovodi do oštećenja inzulinske signalizacije uključene u klirens plakova A $\beta$  i patologiju neurofibrilarnih snopića (81). Naime, desenzitizacijom inzulinskog receptora (IR) i pojavom inzulinske rezistencije javljaju se učinci na metabolizam u mozgu koje prikazuje Slika 4. Fiziološki se tijekom neuronalne aktivnosti otpušta inzulin i veže na  $\alpha$ -podjedinicu receptora, što aktivira tirozin-kinazom posredovanu fosforilaciju  $\beta$ -podjedinice receptora. Time dolazi do aktivacije više puteva drugih glasnika s različitim krajnjim rezultatom. Kod IRBS-a, posljedice desenzitizacije IR-a višestruke su; (Slika 4, (1)) aktivnost inzulina kao čimbenika rasta u putu IR-Shc-MAPK na transkripciju gena i sintezu kontrolnih proteina (engl. *housekeeping proteins*) nužnih za rast stanice, sinaptogenezu, popravak stanice i zaštitu od oksidativnog stresa (82,83) poremećena je, čime je smanjen rast

stanice kao i mogućnost regeneracije. Također, smanjena je i sinteza enzima koji razgrađuje inzulin (IDE, engl. *insulin-degrading enzyme*), koji ujedno cijepa i protein A $\beta$  agregiran u  $\beta$ -ploču (84), čime je posljedično smanjen i klirens nakupljenog A $\beta$ , a metabolizam APP-a pomaknut s cijepanja  $\alpha$ -sekretazom na cijepanje  $\beta$ -sekretazom te je stoga pojačano stvaranje A $\beta$  (85). Nadalje, (Slika 4, (2)) oštećena je sinaptička transmisija i formiranje dugoročne potencijacije (LTP, engl. *long-term potentiation*), što utječe na stvaranje sjećanja i procesuiranje informacija u mozgu, budući da u fiziološkim uvjetima aktivacija IR-a ima izravan učinak na LTP preko vezanja supstrata inzulinskog receptora 1 i 2 (IRS1, IRS2, engl. *insulin receptor-substrate-1, -2*) na fosfatidilinozitol kinazu-3 (Pi3K, engl. *phosphatidylinositol 3-kinase*), čime se aktivira ciklička fosfodiesteraza 3- $\beta$  (cPD3B, engl. *cyclic phosphodiesterase 3-beta*) i dolazi do smanjenog stvaranja cikličkog adenzin monofosfata (cAMP, engl. *cyclic adenosin monophosphate*), čime se priprema sinapsa za povećano otpuštanje vezikula neurotransmitera i indukciju LTP-a (86). Ovim se putem fiziološki aktivira i sintaza dušikova oksida (NOS, engl. *nitric oxide synthase*) i inducira sinteza dušikovog oksida (NO) koji dalje služi kao retrogradni glasnik u modulaciji otpuštanja neurotransmitera i ima ulogu u stvaranju pamćenja (87).



**Slika 4** Posljedice inzulinske rezistencije u mozgu; prema Li i Hölscher, 2007. (88).

*Shc* – Src homologni i kolagen protein; *Grb2* – za receptor čimbenika rasta vezani protein 2; *SOS* – Son of sevenless protein; *Ras* – protein štakorskog sarkoma virusa; *Raf* – protein brzo progredirajućeg fibrosarkoma; *MAPK* – mitogenom-aktivirana protein kinaza; *IDE* – enzim koji razgrađuje inzulini; *A $\beta$*  – amiloid  $\beta$ ; *IRS* – supstrat inzulinskog receptora; *PI3K* – fosfatidilinozitol kinaza-3; *cPD3B* – ciklička fosfodiesteraza-3 beta; *LTP* – dugoročna potencijacija; *PDK* – fosfatidilinozitol-ovisna kinaza; *Akt/PKB* – kompleks protein kinaze B; *GSK3* – glikogen sintaza kinaza 3; *GLUT4* – nosač glukoze 4; *AGE* – krajnji produkti glikacije.

Vežanje IRS1 i IRS2 na Pi3K (Slika 4, (3)) te posljedična aktivacija Pi3K, fosfatidilinozitol-ovisne kinaze (PDK, engl. *phosphatidylinosite-dependent kinase*) i kompleksa protein kinaze B (Akt/PKB) dovode i do supresije indukcije apoptoze čime inzulini štiti neurone, što je u stanju inzulinske rezistencije smanjeno i dovodi do smanjenog preživljenja neurona (89). Uz to, dolazi do pojačane aktivnosti GSK3; aktivacija  $\beta$ -izoforme ovog enzima posljedično dovodi do hiperfosforilacije proteina tau (90,91), dok je  $\alpha$ -izoforna nužna za procesuiranje APP-a i nakupljanje A $\beta$  (92). Konačno, jedna od glavnih funkcija inzulina jest snižavanje razine glukoze u krvi poticanjem premještanja nosača glukoze iz citoplazme na membranu, što je u stanju inzulinske rezistencije oštećeno (Slika 4, (4)) te posljedična hiperglikemija dovodi do

povećanja oksidativnog stresa i stvaranja krajnjih produkata glikacije (AGE, engl. *advanced glycation end products*) koji imaju toksična svojstva te su uključeni u stvaranje patoloških obilježja AB. Nakupljanje A $\beta$  pojačano je zbog njegove glikacije, a formiranje neurofibrilarnih snopića fosforiliranog proteina tau ubrzano je njegovom glikacijom (93,94). Rezultantni oksidativni stres i lipidna peroksidacija zbog stvorenih reaktivnih kisikovih spojeva (ROS, engl. *reactive oxygen species*) pojavljuju se rano u razvoju AB-a, što pokazuju i povećane razine oksidiranih proteina u frontalnoj i parijetalnoj moždanoj kori te hipokampusu pacijenata s počecima kognitivnog deficita (95,96). Zajedno, ovi procesi dovode do razvoja upale i mikrovaskularnih oštećenja koji za posljedicu imaju mikroinfarkte i posljedičnu atrofiju mozga (97). Neuroinflamacija također doprinosi daljnjem razvoju patologije AB-a pospješujući nakupljanje A $\beta$  (98), hiperfosforilaciju proteina tau (99,100), oksidativna oštećenja (101,102) i oštećenja neuronalne plastičnosti (103).

Obzirom na nemogućnost ulaska glukoze u stanice, u bolesnika s AB-om nađeno je i značajno smanjenje metabolizma glukoze u mozgu, posebice u regijama mozga koje su povezane s procesuiranjem pamćenja i učenjem (104–106), a takav poremećaj regulacije dešava se u mozgu u ranim stadijima bolesti i prije kliničke manifestacije kognitivnog deficita (107,108). Abnormalnosti u metabolizmu glukoze u mozgu vidljive su na pozitronskoj emisijskoj tomografiji (PET) bolesnika s visokim rizikom razvoja AB-a, kod kojih se smanjenje metabolizma glukoze može vidjeti i do tri desetljeća prije pojave simptoma AB-a (109).

### **1.1.2. Kognitivne promjene i dijagnoza Alzheimerove bolesti**

Među kognitivnim promjenama, jedan od najranijih simptoma AB-a jest oštećenje recentnog pamćenja, prisutno kod otprilike 90% bolesnika, uz očuvanje radnog i dugoročnog pamćenja, koje u početku najprije zamjećuje obitelj bolesnika. AB je bolest s progresivnim tijekom te je s prolaskom vremena zahvaćeno sve više kognitivnih područja. Uz napredovanje oštećenja pamćenja, javlja se i dezorijentacija, najprije u vremenu, a kasnije i u prostoru. Potom, razvijaju se i poremećaji govora, poglavito nominalna afazija, te akalkulija i agnozija koje utječu na radnu sposobnost bolesnika (110). S razvojem apraksije i vidno-prostorne dezorijentacije bolesnik se može izgubiti u sebi poznatoj sredini (111). S progresijom bolesti dolazi do psihomotorne uznemirenosti te drugih psihijatrijskih simptoma povezanih s demencijom poput depresije, apatije i anhedonije, te agitacije, insomnije, dezinhibicije, repetitivnih radnji, pa sve do agresivnog ponašanja. U umjerenom i uznapredovalom stadiju bolesti mogu se javiti

psihotični simptomi poput vizualnih i auditornih halucinacija i deluzija (112). Svakodnevno funkcioniranje postaje otežano te bolesnici više nisu samostalni ni radno sposobni. Uz kognitivne smetnje, mogu se dijagnosticirati i fizičke smetnje; poremećaj hoda frontalnog tipa – kratki koraci s povlačenjem nogu, fleksijsko držanje tijela, teškoće u započinjanju hoda (apraksija hoda). U podmakloj fazi bolesti gube se svi socijalni kontakti i dominiraju psihički poremećaji. U neurološkom se statusu ističu rigidnost i bradikineza, uz moguću pojavu mioklonija i spastičnosti. Bolesnici postaju nepokretni i inkontinentni te smrt uobičajeno nastupa 5 do 10 godina od početka prvih simptoma (113).

Budući su simptomi i znakovi AB-a slični onima u ostalim vrstama demencija, postavljanje točne dijagnoze je teško. Tradicionalni kriteriji za dijagnozu AB-a uključuju deficite u više od 2 područja kognicije, postupno slabljenje pamćenja i ostalih kognitivnih funkcija, kasni nastup simptoma (najčešće nakon 65. godine) i izostanak sistemskih poremećaja i ostalih bolesti mozga koje bi objasnile deficit pamćenja i kognicije (114).

## **1.2. Životinjski modeli Alzheimerove bolesti**

Razvoj prikladnih životinjskih modela neurodegenerativnih bolesti nužan je radi razumijevanja njihove patofiziološke osnove kao i za razvoj mogućih terapijskih rješenja (115). Istraživanju animalnih modela demencije pridaje se visok prioritet radi velike prevalencije bolesti i loše prognoze; zbog nepoznavanja uzroka i kasne dijagnoze bolesti, davanje terapije je odgođeno te je ona isključivo simptomatska (116). Razvoj pravog životinjskog modela izazovan je radi mnogih nepoznanica u patofiziološkim mehanizmima razvoja bolesti te ne postoji nijedan model koji bi istovremeno oponašao sve kognitivne, biheviornalne, biokemijske i histopatološke abnormalnosti koje su prisutne u AB-u (117). Idealan životinjski model AB-a trebao bi čim vjernije oponašati bolest u ljudi i istovremeno reproducirati kompleksnosti ljudskog ponašanja u životinja. Od dostupnih životinjskih vrsta, daleko se najčešće upotrebljavaju glodavci, tj. miševi (*Mus musculus*) kao najčešće korištena vrsta za takve modele jer se lako i brzo uzgajaju i genetski manipuliraju, i štakori (*Rattus norvegicus*). Rjeđe se koriste paklara (*Pteromyzon marinus*) i zebrića (*Danio rerio*) te od beskralješnjaka vinska mušica (*Drosophila melanogaster*) i nematod (*Caenorhabditis elegans*) (118). Od većih životinja to su svinja i ovca; uspješan model napravljen je od transgenične svinje (119). Primati, poput rezus majmuna (*Macaca mulatta*), također se rjeđe koriste kao model AB-a, jer su njihov uzgoj i održavanje skupi te je njihova uporaba etički dvojbeni (120).

Razvijeni su brojni različiti animalni modeli demencija, a napose AB-a, koji bar djelomično oponašaju različite aspekte bolesti, a koji se mogu ugrubo podijeliti prema patofiziološkoj osnovi, kako prikazuje Tablica 1.

**Tablica 1** Životinjski modeli različitih vrsta demencija i kognitivnog deficita; prema Neha i sur., 2014. (121).

Model	Vrsta demencije	Način primjene	Referenca
<b>1. Spontani modeli</b>			
Demencija uzrokovana staranjem	Alzheimerova bolest		(122,123)
Mišji model ubrzanog starenja (SAM, engl. <i>senescence accelerated mouse</i> )	Familijarna Alzheimerova bolest		(124,125)
<b>2. Kemijski inducirani modeli</b>			
Model induciran skopolaminom	Alzheimerova bolest	ip; ih; sc; intra-BLA	(126–131)
Model induciran intracerebroventrikularnom primjenom streptozotocina	Sporadična Alzheimerova bolest	icv	(132–135)
Model induciran alkoholom	Retrogradna amnezija	ip; p.o.	(136,137)
Model induciran infuzijom A $\beta$	Alzheimerova bolest	icv; ih	(138–140)
Model induciran infuzijom oligomera proteina tau	Alzheimerova bolest	ih	(141)
Model induciran metioninom	Vaskularna demencija	p.o.	(142,143)
Model induciran kolhicinom	Sporadična Alzheimerova bolest	icv	(144,145)
Model induciran okadaičnom kiselinom	Alzheimerova bolest	ih; icv	(146–148)
Model induciran ekscitotoksinima, neurotoksinima i kolinotoksinima	Alzheimerova bolest	icv; ip; ih; intra-NBM	(149–152)

Model induciran benzodiazepinima	Retrogradna amnezija ili anterogradna amnezija	ip	(153,154)
Model induciran teškim metalima	Alzheimerova bolest	p.o.; in	(155–158)
Model induciran natrijevim azidom	Alzheimerova bolest	sc; ip	(159–162)
Model induciran antagonistima receptora za čimbenik aktivacije trombocita (PAF receptor, engl. <i>platelet-activating factor receptor</i> )	Amnezija	ip	(163)
Model uzrokovan inhibitorima sintaze dušikova oksida	Alzheimerova bolest	ip	(164,165)
Model induciran klonidinom	Amnezija	ip; ik	(166,167)
Model induciran klozapinom	Kognitivni deficit	ip	(168)
Kognitivni deficit induciran cikloheksamidom	Amnezija	sc	(169)
Kognitivni deficit induciran fenitoinom	Kognitivni deficit	p.o.; ip	(170,171)
<b>3. Transgenični animalni modeli demencije</b>			(172)
Modeli temeljeni na promjenama gena povezanih s A $\beta$	Alzheimerova bolest		(173,174)
Modeli povezani s neurofibrilarnim snopćima proteina tau	Alzheimerova bolest		(118,175)
Modeli povezani s apolipoproteinom E	Alzheimerova bolest		(176,177)
Transgenični modeli enzima sekretaza	Alzheimerova bolest		(178)
Modeli povezani s mutacijama u presenilinima	Alzheimerova bolest		(179,180)
Modeli aksonalnog transporta	Alzheimerova bolest		(181,182)
<i>Knock-out</i> animalni modeli	Alzheimerova bolest		(183)
Modeli mutiranog $\alpha$ -sinukleina	Alzheimerova bolest		(184)

Modeli prekomjerne ekspresije ljudskog enzima ciklooksigenaza-2 (COX-2, engl. <i>cyclooxygenase-2</i> )	Alzheimerova bolest		(185)
Modeli nedostatka čimbenika rasta živčanih stanica (NGF, engl. <i>nerve growth factor</i> )	Alzheimerova bolest		(186)
<b>4. Demencija uzrokovana dijetom s visokim udjelom masti</b>	Alzheimerova bolest		(187)
<b>5. Modeli izazvani hipoksijom</b>			
Hipoksija inducirana kemijskim sredstvima	Vaskularna demencija, amnezija		(188)
Kirurški inducirana hipoksija	Alzheimerova bolest		(189,190)
<b>6. Modeli glutamatergičke denervacije</b>	Alzheimerova bolest		(191,192)
<b>7. Animalni modeli ozljede mozga</b>			
Modeli ozljede mozga nalik potresu mozga	Alzheimerova bolest		(193,194)
Kognitivni deficit induciran elektrolitičkom lezijom	Alzheimerova bolest		(195)
<b>8. Kognitivni deficit izazvan elektrošokom</b>	Amnezija		(153,196)
<b>9. Modeli izazvani manjkom tijamina i piritijamina</b>	Alzheimerova bolest; Wernicke-Korsakoffvljev sindrom		(197–200)

*ip* – intraperitonealno; *ih* – intrahipokampalno; *sc* – supkutano; *BLA* – bazolateralna amigdala; *icv* – intracerebroventrikularno; *p.o.* – peroralno; *NBM* – Meynartova bazalna jezgra (lat. *nucleus basalis magnocellularis*); *in* – intranazalno; *ik* – intrakortikalno.

### 1.2.1. Transgenični modeli

Transgenični modeli AB-a najčešće su korišteni modeli te bolesti u istraživanjima, iako u suštini modeliraju bolest koja se pojavljuje u najmanjem broju slučajeva, tj. familijarnu AB (<5% svih slučajeva). Genetska manipulacija najčešće se odvija na miševima, kod kojih su metode genetičkog inženjeringa najrazvijenije i najviše istraživane, mada su razvijeni i modeli



transgeničnog štakora (201,202). Većina transgeničnih modela AB-a temelji se na mutacijama i prekomjernoj ekspresiji u tri genske mete; genu za APP, genima za PSEN1 i PSEN2, te genima za protein tau, kako prikazuje Tablica 2. Uz njih, razvijeni su i modeli koji uključuju mutacije enzima  $\beta$ -sekretaze, apolipoproteina  $\epsilon 4$ , proteina povezanog s receptorom za apolipoprotein (LRP, engl. *lipoprotein receptor-related protein*) te transformirajućeg čimbenika rasta  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ , engl. *transforming growth factor  $\beta 1$* ), kao i modeli koji kombiniraju različite vrste mutacija – dvije, tri ili pet vrsta mutacija (203,204). Ti modeli pokazuju neuropatološke i bihevioralne karakteristike slične onima u oboljelih od AB-a, uključujući amiloidne plakove, neurofibrilarne snopiće, astrogliozu, promjene u sinapsama, gubitak neurona i kognitivni deficit (204,205). Uz njih, razvijeni su i *knock-out* modeli gena za APP, PSEN i protein tau kako bi se pobliže istražila njihova uloga u patogenezi AB-a (206).

**Tablica 2 Značajne mutacije u istraživanju Alzheimerove bolesti; prema Myers i McGonigle, 2019. (207).**

Gen	Naziv mutacije	Zahvaćeni dio gena	Lokacija	Posljedice mutacije
APP	Arktička	E693G	Unutar A $\beta$ regije	Povećana sklonost nakupljanju A $\beta 40$
	Nizozemska	E693Q	Unutar A $\beta$ regije	Opsežna amiloidna angiopatija, ograničeno stvaranje plakova
	Iberijska	I716F	Mjesto cijepanja $\gamma$ -sekretazom	Povećani omjer A $\beta 42$ :A $\beta 40$
	Indiana	V717F	Mjesto cijepanja $\gamma$ -sekretazom	Povećani omjer A $\beta 42$ :A $\beta 40$
	Iowa	D694N	Unutar A $\beta$ regije	Opsežna amiloidna angiopatija, ograničeno stvaranje plakova
	Florida	I716V	Mjesto cijepanja $\gamma$ -sekretazom	Povećani omjer A $\beta 42$ :A $\beta 40$
	Londonska	V717I	Mjesto cijepanja $\gamma$ -sekretazom	Povećani omjer A $\beta 42$ :A $\beta 40$

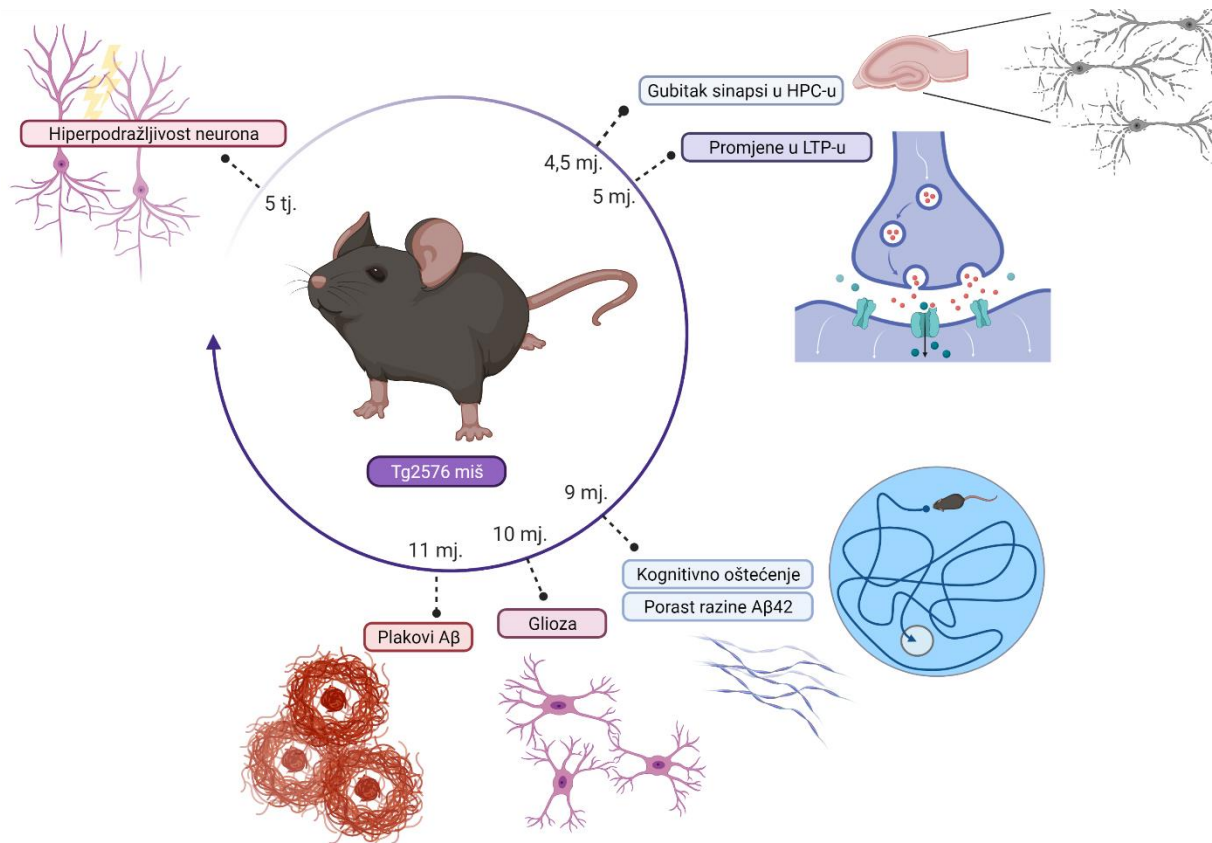
	Osaka	E693Δ	Unutar Aβ regije	Povećano stvaranje Aβ oligomera, bez stvaranja plakova
	Švedska	K670N/M671L	Mjesto cijepanja β-sekretazom	Povećano stvaranje Aβ
<b>PSEN1</b>	M146V	M146V	Ekson 5	Povećani omjer Aβ42:Aβ40
	ΔE9	ΔE9	Insercija u intronu 8	Povećani omjer Aβ42:Aβ40
	L166P	L166P	Ekson 6	Stvaranje plakova i snopića
	L286V	L286V	Ekson 8	Povećani omjer Aβ42:Aβ40
<b>MAPT</b>	P301L	P301L	Ekson 10	Povećano stvaranje sparenih uzvojitih filamenata
	P301S	P301S	Ekson 10	Smanjeno sklapanje mikrotubula

*APP – amiloidni prekursorski protein; Aβ – amiloid β; PSEN1 – presenilin 1; MAPT – s mikrotubulima povezan protein tau.*

### 1.2.1.1. Mišji model Tg2576

Jedan od najčešće korištenih transgeničnih mišjih modela fAβ-a, model Tg2576, razvili su Karen Hsiao Ashe i sur. 1996. godine (208). Model se temelji na prekomjernoj ekspresiji mutirane forme APP-a (izoforme 695) sa švedskom mutacijom (Swe) gdje je na 670. mjestu aminokiselina lizin zamijenjena asparaginom, a na 671. mjestu metionin leucinom (KM670/671NL). Posljedica ovakve mutacije jest 5x povećanje Aβ1-40 i 14x povećanje Aβ1-42/43 uz pojavu oštećenja u učenju i prostornom i radnom pamćenju u dobi od 9 do 12 mjeseci (208,209), iako su neke studije pokazale oštećenje u prostornom i radnom pamćenju već od 6 mjeseci starosti (210). U dobi od 11 do 13 mjeseci hemizigotni Tg2576 miševi razvijaju brojne parenhimalne plakove Aβ i vaskularne depozite Aβ. Pokazuju znakove oksidativnog oštećenja bez neurofibrilarnih snopića ili gubitka neurona (211). Gubitak dendrita uočen je u dobi od 4,5 mjeseca u CA1 regiji hipokampusa (212). Kod modela Tg2576 uočene su promjene u sinaptičkoj plastičnosti; s početkom u dobi od 5 mjeseci očituje se pad u LTP-u nakon

stimulacije u dentatnom girusu u odnosu na kontrole divljeg tipa (213), a oštećenje LTP-a neovisno o stimulaciji u CA1 regiji i u dentatnom girusu prisutno je u životinja starijih od 15 mjeseci (214). Među najranijim zabilježenim promjenama u modelu je hiperpodražljivost neurona, već u dobi od 5 tjedana (215). Povećanje gustoće i veličine mikroglija u područjima oko plakova u hipokampusu, frontalnoj moždanoj kori, entorinalnoj kori i okcipitalnoj kori hemizigota uočeno je u dobi od 10 do 16 mjeseci (216). Promjene koje se događaju u modelu Tg2576 kroz vrijeme prikazuje Slika 5.



**Slika 5 Fenotipska karakterizacija promjena u mišjem modelu Tg2576 u odnosu na starost životinje; prema bazi AlzForum.org (209).**

Malo je podataka o inzulinskoj rezistenciji u mozgu i perifernoj metaboličkoj homeostazi u modelu Tg2576 i transgeničnim modelima AB-a općenito. U modelu Tg2576 nađene su snižene bazalne vrijednosti inzulina i odgođeno inzulinom-posredovano sniženje razina glukoze u krvi u usporedbi s kontrolama divljeg tipa u ženki starih 8 mjeseci (217), dok je ekspresija glikolitičkog enzima fosfofruktokinaza snižena u miševa starih 24 mjeseca, a nepromijenjena u onih mlađih od 17 mjeseci (218). Miševi Tg2576 pokazuju oštećeni odgovor na stres induciran gladovanjem i perifernu inzulinsku rezistenciju povezanu s visokim razinama glukokortikoida zbog stresa (219). Ho i sur. (220) pokazali su da prehranom inducirana inzulinska rezistencija

u Tg2576 miševa pojačava stvaranje amiloidnog A $\beta$ 1-40 i 1-42 u mozgu, uz povećanu aktivnost  $\gamma$ -sekretaze i smanjenu aktivnost IDE. Povećana produkcija A $\beta$  posljedično je dovela do pojačanog stvaranja amiloidnih plakova i lošijih rezultata u kognitivnim testovima. Daljnjim ispitivanjem povezanosti inzulinske rezistencije i amiloidogeneze nađeno je funkcionalno smanjenje signalizacije putem IR-a, očitovano smanjenjem autofosforilacije  $\beta$ -podjedinice IR-a i sniženim aktivnostima Pi3k i Akt/PKB kinaza, te smanjenu fosforilaciju GSK3 $\alpha$  i  $\beta$  koja je bila u pozitivnoj korelaciji sa stvaranjem C-terminalnog odsječka APP-a (indeks aktivnosti  $\gamma$ -sekretaze).

### 1.2.1.2. Ostali transgenični modeli

Značajke nekih od najkorištenijih transgeničnih modela prikazuje Tablica 3. Usprkos mnogim mogućnostima koje pružaju transgenični modeli, oni imaju i mnoga ograničenja. U njima je nemoguće vidjeti sve aspekte patologije čovjeka te oni oponašaju samo patologiju vidljivu u bolesnika s fAB-om, dok nedostaju aspekti sAB-a; plakovi A $\beta$  i neurofibrilarni snopići proteina tau koje glodavci normalno ne razvijaju razlikuju se od ljudskih, nemoguće je kontrolirati raspon ekspresije umetnutog gena, nemoguće je predvidjeti sekundarne implikacije manipuliranja i umetanja ciljnih gena itd. (221,222).

**Tablica 3** Karakteristike najčešće korištenih mišjih transgeničnih modela familijarne Alzheimerove bolesti; prema Myers i McGonigle, 2019. (223) i Alzforum.org (224).

Naziv modela	Genetička pozadina	Neuropatološka obilježja	Bihevioralni deficiti	Referenca
<b>PDAPP</b>	Mutacija hAPP (Ind); promotor hPDGF- $\beta$ ; mišji soj C57BL/66 x DBA2	Plakovi A $\beta$ u dobi od 6-8 mjeseci, bez tau patologije, glijoza, CAA	Deficit u prostornom pamćenju u dobi od 3 mjeseca	(225,226)
<b>APP23</b>	Mutacija hAPP (Swe), izoforma 751; promotor Thy1 miša; mišji soj C57BL/6	Plakovi A $\beta$ u dobi od 6-8 mjeseci, hiperfosforilirani protein tau bez stvaranja snopića, glijoza,	Progresivni deficit u prepoznavanju i prostornom pamćenju u dobi od 3 mjeseca	(227)

		gubitak neurona, CAA		
<b>J20</b>	Mutacija hAPP (Swe, Ind); promotor hPDGF- $\beta$ ; mišji soj C57BL/6	Plakovi A $\beta$ u dobi od 6 do 8 mjeseci, bez tau patologije, glijoza, gubitak sinapsi i neurona, CAA	Deficit u prepoznavanju u dobi od 2 mjeseca i u prostornom pamćenju u dobi od 3 mjeseca	(228)
<b>TgCRND8</b>	Mutacija hAPP (Swe, Ind); promotor PrP hrčka; hibridni soj C3H/He-C57BL/6	Plakovi A $\beta$ u dobi od 3 do 5 mjeseci, bez tau patologije, glijoza, gubitak sinapsi i neurona, CAA	Progresivni deficit radnog i prostornog pamćenja u dobi od 6 mjeseci	(229)
<b>APP NL-G-F knock-in</b>	Mutacija hAPP (Swe, Ibe, Arc); endogeni APP promotor; mišji soj C57BL/6	Plakovi A $\beta$ u dobi od 2 mjeseca, bez tau patologije, glijoza i gubitak sinapsi	Deficit u prostornom pamćenju u dobi od 6 mjeseci	(230)
<b>TgSweDI</b>	Mutacija hAPP (Swe, Dutch, Iowa), promotor Thy1 miša; mišji soj C57BL/6	Plakovi A $\beta$ u dobi od 3 mjeseca, bez tau patologije, glijoza, CAA	Deficit u učenju u dobi od 6 mjeseci	(231)
<b>APP 693 <math>\Delta</math></b>	Mutacija hAPP (Osaka); promotor PrP miša; mišji soj B6C3F1 križan s C57BL/6	Oligomeri A $\beta$ u dobi od 8 mjeseci, bez plakova, hiperfosforilirani protein tau bez	Deficit u prostornom pamćenju u dobi od 8 mjeseci	(232)

		stvaranja snopića, gliozna i gubitak neurona		
<b>MAPT hTau</b>	hMAPT (svih 6 izoformi, nemutirane); tau promotor čovjeka; mišji soj C57BL/6	Bez plakova A $\beta$ , tau patologija u dobi od 9 mjeseci, gubitak neurona	Deficit u prepoznavanju i prostornom pamćenju u dobi od 12 mjeseci	(233)
<b>MAPT rTg4510</b>	hMAPT (h0N4R P301L); CaMKII $\alpha$ promotor čovjeka; miješani soj 129S6 x FVB	Bez plakova A $\beta$ , snopići u dobi od 8 mjeseci, gubitak sinapsi i neurona	Deficit u prostornom pamćenju u dobi od 3 do 5 mjeseci	(50,234)
<b>MAPT Tau P301S linija 19 ili PS19</b>	hMAPT (h1N4R P301S); PrP promotor miša; mišji soj (C57BL/6 x C3H)F1	Bez plakova A $\beta$ , snopići u dobi od 8 mjeseci, gliozna	Deficit u prostornom pamćenju i učenju u dobi od 7 mjeseci	(235)
<b>Multi- transgenični APPPS1-21 ili APPPS1</b>	Mutacija hAPP (Swe) i hPSEN1 (L166P); Thy1 promotor miša; mišji soj C57BL/6J	Plakovi A $\beta$ u dobi od 6 do 8 mjeseci, bez tau patologije, gliozna, gubitak sinapsi i neurona, CAA	Deficit u prostornom pamćenju i učenju u dobi od 7 mjeseci	(236)
<b>Multi- transgenični APP<sup>swe</sup>/ PSEN1<sup>dE9</sup> ili APP/PS1</b>	Mutacija m/hAPP (Swe) i hPSEN1 ( $\Delta$ E9); PrP promotor miša; mišji soj (C57BL/6 x C3H)F2	Plakovi A $\beta$ u dobi od 6 do 9 mjeseci, bez tau patologije, gliozna, gubitak sinapsi i neurona, CAA	Deficit prostornog i referentnog pamćenja u dobi od 6 mjeseci	(237)

<b>Multi-transgenični 5xFAD</b>	Mutacija hAPP (Swe, Fl, Lon) i hPSEN1 (M146L, L286V); Thy1 promotor miša; mišji soj C57BL/6 x SJL	Plakovi A $\beta$ u dobi od 2 mjeseca, bez tau patologije, glijoza, gubitak sinapsi i neurona, CAA	Progresivni deficit u prostornom pamćenju u dobi od 3 mjeseca i u učenju u dobi od 6 mjeseci	(238)
<b>Multi-transgenični 3xTg ili LaFerla miš</b>	Mutacija hAPP (Swe), hPSEN1 (M146V) i hMAPT (h0N4R P301L); Thy1.2 promotor (APP, MAPT) i endogeni PSEN1 promotor miša; mišji soj C7BL/6;129X1/SvJ;129S1/Sv	Plakovi A $\beta$ u dobi od 6 mjeseci, tau patologija u dobi od 12 mjeseci, glijoza	Progresivni deficit u učenju u dobi od 4 mjeseca i deficit u prostornom pamćenju u dobi od 6 mjeseci	(58)

*APP – amiloidni prekursorski protein; hAPP – amiloidni prekursorski protein čovjeka; mAPP – amiloidni prekursorski protein miša; hPDGF- $\beta$  –  $\beta$ -lanac trombocitnog čimbenika rasta čovjeka; A $\beta$  – amiloid  $\beta$ ; CAA – moždana amiloidna angiopatija; PrP – prionski protein; Thy1 – antigen timocitne diferencijacije 1; Ind – Indiana mutacija; Swe – Švedska mutacija; Ibe – Iberijska mutacija; Arc – Arktička mutacija; Dutch – Nizozemska mutacija; Iowa – Iowa mutacija; Osaka – Osaka mutacija; MAPT – s mikrotubulima povezan protein tau; hMAPT – s mikrotubulima povezan protein tau čovjeka; CaMKII $\alpha$  –  $\alpha$ -izoforna kalcij/kalmodulin-ovisne protein kinaze II; hPSEN1 –presenilin 1 čovjeka; Fl – Florida mutacija; Lon – London mutacija; PSEN1 – presenilin 1.*

### 1.2.2. Ne-transgenični modeli

Među ne-transgeničnim modelima AB-a dominiraju oni u kojima je kognitivni deficit induciran kemijskim agensima, amiloidom  $\beta$  ili metalima. Razvoj sveobuhvatnih ne-transgeničnih modela od iznimne je važnosti budući se gotovo svi potencijalni lijekovi za liječenje AB-a ispituju na transgeničnim modelima bolesti, što je neprikladno (i vjerojatno značajan čimbenik neuspjeha tih lijekova u kliničkim ispitivanjima) uzevši u obzir da transgenični modeli vjerno oponašaju samo familijarni oblik AB-a, a velika je većina oboljelih zahvaćena sporadičnim tipom. Stoga je model sAB-a koji bi oponašao čim više aspekata bolesti nužan kao adekvatna platforma za ispitivanje potencijalnih terapijskih rješenja u AB-u.

### **1.2.2.1. Model izazvan intracerebroventrikularnom primjenom streptozotocina**

Od kemijski induciranih, ne-transgeničnih modela AB-a, najviše je istražen model sAB-a dobiven intracerebroventrikularnom primjenom streptozotocina (STZ-icv) koji oponaša sAB na više razina (132,135).

#### **1.2.2.1.1. Streptozotocin**

Streptozotocin (STZ) (2-deoksi-2-(3-metil-3-nitrozoureido-)-D-glukopiranoza) je spoj iz skupine glukozamina-nitrozoureja koji alkilira DNK, a spada u skupinu antibiotika/antineoplastika porijeklom iz bakterije *Streptomyces achromogenes* (239). Prvotno je razvijen u farmaceutskoj tvrtki Pfizer pod zaštićenim imenom „Zanosar“, a i danas je registriran za liječenje metastatskog inzulinoma; tumora  $\beta$ -stanica gušterače koji luči prekomjerne količine inzulina (239). Zbog strukturne sličnosti 2-deoksi-D-glukozi, STZ uzrokuje selektivnu toksičnost  $\beta$ -stanica gušterače ulaskom u stanice putem nosača za glukozu 2 (GLUT, engl. *glucose transporter*), koji se predominantno eksprimira upravo u  $\beta$ -stanicama gušterače (240). Betacitotoksični učinak ostvaruje se alkilacijom DNK koja potiče aktivaciju poli-ADP-ribozilacije, što dovodi do značajnog sniženja staničnog  $\text{NAD}^+$  i ATP-a (240). Nakon periferne primjene, u visokoj jednokratnoj dozi STZ uzrokuje nekrozu  $\beta$ -stanica i koristi se za uzrokovanje eksperimentalnog dijabetesa tipa 1 (DM1) (239), dok u višekratnim nižim dozama uzrokuje inzulinsku rezistenciju smanjenom autofosforilacijom IR-a, povećanjem ukupnog broja IR-a i promjenama inzulinske signalizacije, zbog čega se koristi kao model DM2 (241). S druge strane, središnjom primjenom višestruko nižih doza streptozotocina u moždane lateralne komore ne dolazi do razvitka sistemskog dijabetesa (132,242,243). Nosač glukoze GLUT2 kojim streptozotocin ispoljava svoje djelovanje nađen je u mozgu sisavaca te je distribuiran regionalno specifično, posebice u limbičkim područjima i povezanim moždanim jezgrama te je najveća koncentracija u ventralnim i medijalnim regijama u blizini središnje linije, a posebice je izražen u blizini živčanih okončina (244). U dosadašnjim su istraživanjima STZ-icv modela korišteni različiti protokoli; doza u pravilu varira u rasponu od 1 do 3 mg/kg tjelesne težine uz varijacije u davanju odjednom ili podijeljeno u više doza te uni- i bi-lateralno u lateralne moždane komore (135,245). Točan mehanizam središnjeg djelovanja STZ-a još uvijek nije u potpunosti razjašnjen, no uzevši u obzir prisutnost stanica koje ekspimiraju IR i GLUT2 u mozgu, pretpostavlja se sličnost s perifernim djelovanjem STZ-a.

#### **1.2.2.1.2. Promjene uzrokovane središnjom primjenom streptozotocina**

Nakon središnje primjene u niskim dozama (1-3 mg/kg icv) STZ ne uzrokuje sistemski DM2, ali dolazi do nastanka IRBS-a i pojave progresivnih kognitivnih deficita (246), kolinergičnih



deficita (247), oksidativnog stresa i abnormalnosti mitohondrija (248), morfološke astroglioze, gubitka neurona (249), amiloidne angiopatije i hiperfosforilacije proteina tau (134,250,251) te ostalih promjena u mozgu povezanih s AB-om.

Prve promjene u kognitivnoj funkciji zabilježene su već 3h nakon primjene STZ-icv kao poremećaj u radnom pamćenju, nakon kojeg su zabilježeni degenerativni procesi u hipokampusu 1 i 15 dana nakon primjene STZ-icv (252). Dugotrajne deficite u učenju i pamćenju STZ-icv štakori razvijaju već od dva tjedna nakon tretmana (253) te oni perzistiraju i do devet mjeseci nakon primjene STZ-a (134). Osim kognitivnih promjena, životinje razvijaju i povećane razine anksioznosti (254). Tri tjedna nakon bilateralne primjene STZ-a u miševa nađena je smanjena lokomotorna aktivnost i tendencija za istraživanjem u testu otvorenog polja te deficit u učenju i pamćenju mjeren *Morris water maze* testom plivanja u labirintu i testom prepoznavanja novog objekta (255).

Metabolizam glukoze u mozgu promijenjen je u štakora podvrgnutih STZ-icv tretmanu; snižene su razine glukoze i ATP-a u moždanoj kori (242), smanjena je utilizacija glukoze za 30-44% uz povećanje razine glikogena, laktata i ADP-a (243,256) te je snižena aktivnost ključnih glikolitičkih enzima heksokinaze i fosfofruktokinaze (257). FDG-PET studije u štakora pokazale su hipometabolizam glukoze u mozgu počevši od 3 tjedna nakon primjene STZ-icv (258–260), što je nađeno i u majmuna 6 i 12 tjedana nakon primjene STZ-icv (261). Nađena je i snižena ekspresija nosača za glukozu GLUT1 i 3 u mozgu tri tjedna nakon primjene STZ-icv (262) te GLUT3 jedan mjesec nakon STZ-icv tretmana (263) što dovodi do smanjenih koncentracija ATP-a i kreatin fosfata (132,242,264). Središnja primjena STZ-a ima značajan učinak na inzulinsku signalizaciju u mozgu; smanjena je ekspresija IR-a i gena za IR te gena za inzulin u hipokampusu i moždanoj kori (265–267), smanjena je fosforilacija IRS-1 i ekspresija Akt/PKB u IR-Pi3K putu (250,265,268) te je uočena bifazična promjena u aktivnosti GSK3 – povećana aktivnost GSK3 $\beta$  u razdoblju do jedan mjesec nakon primjene STZ-a te ponovno šest mjeseci nakon primjene (268–270). U homogenatima čitavog mozga ili malog mozga nisu nađene promjene u ekspresiji IR-a tri tjedna nakon primjene STZ-icv, što upućuje na regionalno specifične promjene (268). Slično je nađen i bifazičan učinak na smanjenje ekspresije enzima IDE (269). Selektivnost STZ-a prema stanicama koje luče inzulin temelji se na prisutnosti GLUT2 na membrani, za koji je STZ selektivni supstrat (271). GLUT2 je u mozgu eksprimiran u neuronima i astrocitima regionalno specifično te se smatra da je uključen u osjećanje glukoze i regulaciju otpuštanja neurotransmitera i sinaptičke aktivnosti (244), a u štakora je njegova ekspresija povišena već sat vremena nakon primjene STZ-icv (272).

STZ djeluje kao alkilirajući agens koji oštećuje DNK i dovodi do disfunkcije mitohondrija (273). Već 24 h nakon STZ-icv primjene nađena je snažna produkcija ROS-a i NO-a te snižene razine ATP-a i glutationa u hipokampusu miševa, što posljedično dovodi do začetka upalnih procesa u hipokampusu (274). Pet tjedana nakon bilateralne primjene 3 mg/kg STZ-a u štakora nađeno je sniženje transmembranskog potencijala mitohondrija, razine repolarizacije, razine ATP-a, respiratornog lanca 3, omjera respiratorne kontrole i ADP/O indeksa te produljenje faze repolarizacije, praćeno sniženim razinama piruvata te sniženom aktivnošću  $\alpha$ -ketoglutarat dehidrogenaze i citokrom c oksidaze, uz povećanje osjetljivosti na kalcijem inducirane promjene mitohondrijske permeabilnosti (275). *In vitro* ispitivanja pokazala su slične snižene vrijednosti ATP-a i membranskog potencijala mitohondrija u astrocitima tretiranim STZ-om (276).

Biokemijski se, osim navedenog kolinergičnog deficita, u modelu očituje i učinak na monoaminergički sustav gdje je nađeno povećanje razina dopamina, noradrenalina i serotonina jedan tjedan nakon STZ-icv primjene (277) uz regionalno specifične promjene ekspresije nosača za ove neurotransmitere (278), dok su promjene u neurotransmisiji glutamata slične onima nađenim u bolesnika s AB-om, a deficiti sinaptičke transmisije u hipokampusu i promjene LTP-a u korelaciji su sa smanjenjem ekspresije *N*-metil-D-aspartat (NMDA) receptora (279).

Nakon primjene STZ-a dolazi i do histopatoloških strukturnih promjena poput oštećenja aksona i mijelina u regijama mozga koje su odgovorne za učenje i pamćenje, poput hipokampusa (280). Ovakve patološke promjene nađene su i u mozgu oboljelih od AB-a (281). U hipokampusu je nađeno nakupljanje i aktivacija mikroglia, povećana ekspresija A $\beta$ 1-42, ukupnog proteina tau te fosforiliranog proteina tau (255).

### **1.3. Liječenje Alzheimerove bolesti**

Usprkos desetljećima istraživanja AB-a i značajnom naporu farmaceutskih tvrtki da razviju potencijalna terapijska rješenja, i dalje ne postoji efikasna terapija koja bi izliječila AB ili značajno inhibirala njezin razvoj. Jedna od značajnih prepreka u razvoju lijekova za AB jest nedostatak validiranih, objektivnih dijagnostičkih kriterija i pouzdanih bioloških biljega bolesti koji bi poslužili kao pokazatelj kliničke krajnje točke i efikasnosti terapije. Iz tog je razloga, uz jako dugu, asimptomatsku prodromalnu fazu koja karakterizira AB, uključivanje bolesnika u

klinička ispitivanja zakašnjelo i ograničeno na bolesnike s poodmaklim patofiziološkim znakovima bolesti. Stoga, vremenski odmak u započinjanju potencijalnih terapija nužno je uzeti u obzir kod procjene (ne)uspjeha potencijalnih terapija (282).

Trenutno je u svijetu odobreno samo četiri lijeka za liječenje AB-a; antikolinergici galantamin, donepezil i rivastigmin te nekompetitivni antagonist NMDA-receptora memantin, od kojih su samo dva registrirana u Hrvatskoj (rivastigmin i memantin), a samo se jedan nalazi na dopunskoj listi Hrvatskog zavoda za zdravstveno osiguranje (memantin) (283,284). Donepezil, galantamin i rivastigmin su inhibitori enzima acetilkolinesteraze, a galantamin, kao prirodni alkaloid djeluje i kao alosterički modulator nikotinskih acetilkolininskih receptora (285). Najnoviji antidementiv, memantin, usmjeren na NMDA-receptor, modulira glutamatergičku transmisiju, obzirom da višak glutamata u ekscitatornim sinapsama i s tim povezana ekscitotoksičnost zbog smanjene pohrane glutamata u mikroglijama uzrokuje apoptotičku staničnu smrt, što predstavlja jedan od potencijalnih patofizioloških mehanizama u AB-u (282,286). Ne postoje dokazi da ijedan od ova četiri lijeka modificira primarne patološke procese koji su uzrokom AB-a, već oni pružaju isključivo simptomatsko olakšanje te su općenito primjenjivi kao palijativna terapija s ciljem usporavanja opadanja kvalitete života u oboljelih od AB-a.

Istraživanje potencijalnih lijekova nakon otkrića amiloidne hipoteze AB-a bilo je, te djelomično još uvijek jest, mahom usmjereno prema razvoju lijekova koji moduliraju stvaranje A $\beta$ , poput inhibitora  $\beta$ - i  $\gamma$ -sekretaze, i klirens A $\beta$ , poput aktivatora enzima neprilisina, te monoklonskih protutijela usmjerenih na A $\beta$ , poput solanezumaba, bapineuzumaba, ponezumaba i drugih (3,287,288). Osim A $\beta$ , farmakološki ciljevi terapijskih istraživanja uključuju protein tau, odnosno inhibitore agregacije tau i anti-tau monoklonska protutijela, antineuroinflamacijsku terapiju, odnosno antagoniste receptora za AGE ili agoniste receptora aktiviranog peroksizomskim proliferatorom  $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ , engl. *peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$* ), neuroprotektivne tvari, poput glutamatnih modulatora ili biljnih ekstrakata te lijekove koji utječu na bihevioralno-psihološke simptome AB-a, poput antidepresiva, antipsihotika i drugih (289). Nažalost, ishod kliničkih ispitivanja svih ovih lijekova nije pokazao obećavajuću terapiju za AB, a u posljednjih je nekoliko godina zamjetan trend smanjenja broja ispitivanja fokusiranih na A $\beta$  i povećanja broja ispitivanja usmjerenih k ostalim ciljevima u podlozi AB-a (289). U vrijeme pisanja ovog rada, prema podacima američke baze ClinicalTrials.gov, otvoreno je 612 intervencijskih kliničkih ispitivanja za liječenje AB-a, od čega je 53 ispitivanja u fazi III (290).

### 1.3.1. Lijekovi za liječenje dijabetesa u liječenju Alzheimerove bolesti

S povećanjem dokaza o metaboličkoj podlozi u patofiziologiji AB-a, započeto je i istraživanje lijekova usmjerenih na metaboličke poremećaje u liječenju AB-a, a ponajviše antidijabetika. Epidemiološki podaci bolesnika s DM2 pokazali su da uporaba antidijabetika poput metformina, sulfonilureja, tiazolidindiona, inhibitora enzima dipeptidil peptidaze-IV (DPP-IV), analoga glukagonu sličnog peptida 1 (GLP-1) i inhibitora natrij-glukoza kotransportera 2 (SGLT, engl. *sodium/glucose cotransporter*) smanjuje rizik nastanka demencije (291,292). Međutim, podaci nisu sasvim uniformni u pokazivanju protektivnog učinka; velika *case-control* studija s preko 14 tisuća sudionika iznad 65 godina pokazala je povećani rizik razvoja AB-a povezan s uporabom metformina (293), dok je u Rotterdamskoj studiji rizik razvoja demencije bio najviši među pacijentima na terapiji inzulinom (294), što je potvrdila i jedna populacijska studija u Tajvanu (295).

Usprkos različitim podacima opservacijskih studija, velika količina literaturnih podataka i dalje govori u prilog potencijalnoj koristi antidijabetika u terapiji demencije. Stotine je objavljenih eksperimentalnih studija u animalnim modelima koje upućuju na povoljan učinak antidijabetika na biljege AB-a; zabilježen je pozitivan učinak na amiloidnu patologiju (296,297), tau patologiju (298,299), stvaranje sinapsi i sprječavanje smanjenja broja sinapsi (300,301), oksidativni stres (302), neurogenezu (303), neuroinflamaciju (304) i kognitivnu funkciju (305–307). U manjim kliničkim opservacijskim studijama u ljudi dobiveni su obećavajući podaci o blagotvornom učinku metformina i tiazolidindiona na pamćenje i izvršne funkcije (308–311). Kratki pregled eksperimentalnih i kliničkih podataka upotrebe pojedinih antidijabetika u AB-u prikazuje Tablica 4.

**Tablica 4 Terapijski učinci različitih antidijabetika na obilježja Alzheimerove bolesti u eksperimentalnim životinjskim studijama i kliničkim ispitivanjima (258,291,311–338).**

<b>Antidijabetik</b>	<b>Eksperimentalni podaci</b> Učinak na kognitivni deficit	Učinak na metaboličke parametre	Učinak na neuropatološka obilježja AB-a	<b>Klinički i epidemiološki podaci</b>
<b>Intranazalni inzulin</b>	↑ učenje, ↑ pamćenje	↑ metabolizam glukoze u mozgu, ↑ razine inzulina u mozgu	↓ hipokampalni A $\beta$ , ↓ apoptoza neurona, ↓ astroglioza, ↑ hipokampalna sinaptička plastičnost, ↓ neuroinflamacija, ↓ hiperfosforilacija tau, ↑ hipokampalna neurogeneza	↑ pozornost, ↑ pamćenje, ↑ metabolizam glukoze u mozgu
<b>Sulfonilureje</b>	glibenklamid: ↑ kognitivna funkcija	glibenklamid: ↑ razine inzulina u mozgu, ↓ razine glukoze u mozgu	glibenklamid: ↓ hipokampalni A $\beta$ , ↓ apoptoza neurona, ↑ hipokampalna sinaptička plastičnost, ↓ neuroinflamacije	glipizid: ↑ verbalno učenje

<b>Metformin</b>	↑ kognitivna funkcija, ↑ prostorno pamćenje, ↑ učenje, ↑ LTP + prevencija STZ-icv induciranih kognitivnih deficita	normalizacija ekspresije GLUT1, GLUT3 i GSK3 u mozgu, ↓ razina glukoze u CSF-u	↓ ukupni tau, ↓ hiperfosforilacija tau, ↓ hipokampalni Aβ, ↓ mikroglia, ↓ astroglioza, ↑ sinaptička plastičnost, ↓ aktivnost AChE, ↓ upala	↑ radno pamćenje, ↓ rizik razvoja demencije, ↑ CBF
<b>Tiazolidindioni</b>	pioglitazon: ↑ učenje, ↑ pamćenje roziglitazon: ↑ kognitivna funkcija	roziglitazon: poboljšanje poremećaja periferne gluko-regulacije i inzulinske rezistencije, ↓ kortikosterona u serumu, poboljšanje aktivnosti i ekspresije IDE u mozgu	pioglitazon i roziglitazon: ↓ hipokampalni Aβ, ↓ apoptoza neurona, ↑ hipokampalna sinaptička plastičnost, ↓ hiperfosforilacija tau, ↓ mikroglia	pioglitazon: ↓ rizik razvoja demencije, ↑ pamćenje, ↑ CBF čeonog režnja roziglitazon: ↑ pamćenje, ↑ selektivna pažnja, ↓ Aβ1-42 u plazmi, ↓ progresija hipometabolizma glukoze u mozgu
<b>Inhibitori DPP-IV</b>	sitagliptin: ↑ radno i referentno pamćenje, ↑ učenje linagliptin: ↑ prostorno pamćenje, ↑ učenje saksagliptin: ↑ retencija pamćenja vidagliptin: ↑ učenje	sitagliptin: ↑ razina GLP-1 u mozgu i plazmi, ↑ razina GLP-1R u mozgu ↓ razina glukoze i inzulina u plazmi, ↑ periferna osjetljivost na inzulin	sitagliptin: ↓ nitrozativnog stresa, ↓ oksidativnog stresa u mozgu, ↓ upala, ↓ depozita Aβ linagliptin: ↓ Aβ, ↓ hiperfosforilacija tau, ↓ neuroinflamacija, ↑ CBF	vidagliptin, sitagliptin, saksagliptin: zaštitni učinak na pogoršanje MCI u bolesnika s dijabetesom sitagliptin: ↑ MMSE rezultata

		<p>linagliptin: ↑ razina GLP-1 i GIP u mozgu, ↓ razina glukoze u plazmi</p> <p>vidagliptin: ↓ razine glukoze, Aβ, AChE u plazmi, ↓ MDA u mozgu, ↓ razina inzulina u plazmi, ↑ periferna osjetljivost na inzulin, ↑ GLP-1 u plazmi</p> <p>saksagliptin: ↑ GLP-1 i GLP1R u mozgu</p>	<p>vidagliptin: ↓ ekspresija APP, ↓ hiperfosforilacija tau, ↓ oksidativnog stresa u mozgu</p> <p>saksagliptin: ↓ Aβ, ↓ hiperfosforilacija tau, ↓ neuroinflamacija</p>	<p>linagliptin: ↑ ekspresije SIRT1 u leukocitima bolesnika s dijabetesom i AB</p>
<b>Analozi GLP-1</b>	<p>liraglutid: ↑ kognitivna funkcija, radno i referentno pamćenje</p> <p>eksenatid: ↑ pamćenje</p>	<p>liraglutid: ↓ TNFα, IL-6, INF-γ, MDA u serumu, = razina glukoze u mozgu, = tjelesna težina</p>	<p>liksisenatid i liraglutid: ↑ neurogeneza, neuroprotektivni učinci</p> <p>liraglutid: ↓ plakovi Aβ u moždanoj kori, ↓ upala, ↓ hiperfosforilacija tau, ↓ gubitak sinapsi</p> <p>eksenatid: ↑ hipokampalna neurogeneza, ↓ neuroinflamacija</p>	<p>liraglutid: poboljšanja u metabolizmu glukoze u mozgu i kognitivnom deficitu</p>

<b>Analozi amilina</b>	pramlintid: ↑ pamćenje, ↑ učenje	pramlintid: ↓ razina glukoze u CSF-u	pramlintid: ↓ oksidativni stres, ↓ neuroinflamacija, ↓ hiperfosforilacija tau, ↓ hipokampalni Aβ	nema kliničkih podataka
<b>Inhibitori SGLT2</b>	empagliflozin: ↑ kognitivni deficit dapagliflozin: ↑ sprječavanje kognitivnog deficita	dapagliflozin: ↑ osjetljivost mozga na inzulin dapagliflozin (kombinacija s liraglutidom): blagotvorni učinci na metabolizam	dapagliflozin: ↑ hipokampalna sinaptička plastičnost, ↑ funkcija mitohondrija dapagliflozin (kombinacija s liraglutidom): neuroprotektivni učinci	↓ rizik razvoja demencije

*Aβ – amiloid β; LTP – dugotrajna potencijacija; STZ-icv – intracerebroventrikularna primjena streptozotocina; GLUT – prijenosnik za glukozu; GSK3 – glikogen sintaza kinaza 3; CSF – likvor; AChE – acetilkolinesteraza; CBF – moždani krvni protok; IDE – enzim koji razgrađuje inzulin; DPP-IV – dipeptidil peptidaza-IV; GLP-1 – glukagonu sličan peptid 1; GLP-1R – receptor za glukagonu sličan peptid 1; GIP – želučani inhibitorni polipeptid; MDA – malondialdehid; MCI – blagi kognitivni deficit; MMSE – test minimalne mentalne procjene; SIRT1 – sirtuin 1; TNFα – čimbenik nekroze tumora α; IL-6 – interleukin 6; INF-γ – interferon γ; SGLT2 – natrij-glukoza kotransporter 2.*



Usprkos ohrabrujućim podacima, potrebne su veće kliničke studije na bolesnicima s AB-om kako bi se bolje karakterizirao učinak antidijabetika na razvoj bolesti; obzirom da se u pojedinim kliničkim studijama nije pokazao koristan učinak antidijabetika u AB-u (339–343), ili su čak uzrokovali pogoršanje simptoma (344).

### **1.3.2. Terapijski potencijal nutrijenata u Alzheimerovoj bolesti**

Sve je više dokaza koji govore u prilog važnosti prehrane i određenih nutrijenata, poput antioksidansa, masnih kiselina ili vitamina, i njihovoj protektivnoj ulozi u razvoju demencije i AB-a (345). Dugolančane omega-3 masne kiseline esencijalne su komponente prehrane od najranije dobi i nužne su za rani embrionalni razvoj mozga (346). Nekolicina je studija istraživala utjecaj omega-3 masnih kiselina na rizik razvoja AB-a; povećana konzumacija omega-3 masnih kiselina smanjuje rizik razvoja demencije (347,348) i smanjuje kognitivni deficit u starijih (349,350). Kliničke studije utjecaja konzumacije ribljeg ulja na kognitivne performanse u starijih bolesnika nisu pokazale poboljšanja u kognitivnim funkcijama, ali je primijećeno poboljšanje u pozornosti (351). Obzirom na utjecaj oksidativnog stresa u patologiji AB-a i demencije, mnoga su istraživanja proučavala utjecaj antioksidansa poput vitamina E i C. Epidemiološke studije su pokazale da je rizik razvoja AB-a niži u populaciji s višim unosom vitamina E i C u prehrani (352,353) ili u obliku dodataka prehrani (354). Međutim, antioksidansi u obliku dodataka prehrani nisu pokazali utjecaj na biomarkere povezane s amiloidnom i tau patologijom u likvoru bolesnika s AB-om (355). Utjecaj prehrane na tijek AB-a istraživani je i u mnogim studijama koje su pokazale blagotvoran učinak kalorijske restrikcije u starenju moduliran preko aktivacije sirtuina (356). Sirtuini su važni proteini u centralnom metaboličkom putu, a u AB-u je SIRT1 uključen u patologiju amiloida i proteina tau te je stoga aktivator sirtuina, polifenol iz grožđa resveratrol također ispitan u životinjskim i humanim studijama AB-a (357) te je pokazao protektivne učinke (358). I drugi polifenoli, poput kurkumina, pokazali su učinak u AB-u na više razina, uključujući aktivnost na plakove amiloida, protuupalni i antioksidativni učinak te aktivaciju makrofaga u klirensu amiloida (359). Utjecaj unosa mliječnih proizvoda također je dobio na značaju te je u epidemiološkim studijama nađena korelacija između konzumacije mliječnih proizvoda i smanjenog rizika razvoja kognitivnog deficita te prevencije kognitivnog deficita i povećanog unosa napose fermentiranih mliječnih proizvoda (360). Među trenutno aktivnim intervencijskim kliničkim

ispitivanjima u polju AB-a i demencije mnogo je onih koji ispituju učinak nutrijenata i prehrane na kogniciju i biomarkere u AB-u.

### **1.3.2.1. Galaktoza**

Galaktoza je jednostavni monosaharid koji se strukturno razlikuje od glukoze, najvažnijeg monosaharida, samo u konformaciji hidroksilne skupine na C4 ugljikovu atomu (361). Upravo se ta mala konformacijska promjena smatra razlogom važnosti galaktoze u evolucijskom tijeku mnogih organizama. Važnost galaktoze očigledna je sagledamo li činjenicu da je ona dio mliječnog šećera laktoze, koja je esencijalni nutrijent u razvoju svih sisavaca. Uloga galaktoze u razvijajućem mozgu je omogućavanje glikozilacije, koja predstavlja kritičan korak u neuralnom razvoju, diferencijaciji, usmjeravanju aksona i stvaranju sinapsi, zbog čega je pravilna glikozilacija ključna za stvaranje funkcionalnog živčanog sustava (362,363). Glikozilacija galaktozom može se odvijati putem više biokemijskih puteva, te za razliku od glukoze ili manoze, galaktozilacija ostaje očuvana i u stanju gladovanja (364). Galaktoza se u ljudi iz probavnog trakta apsorbira u proksimalnom jejunumu i bubrežnom epitelu putem nosača SGLT1 i 2, a osim iz hrane, drugi izvori galaktoze uključuju endogenu proizvodnju i fiziološki obrtaj iz glikolipida i glikoproteina (365). Unutar stanice  $\beta$ -izomer D-galaktoze pretvara se enzimom mutarotaza u  $\alpha$ -izomer koji se dalje metabolizira Leloirovim putem (Slika 6) enzimima galaktokinaza (GALK) i galaktoza-1-fosfat uridiltransferaza (GALT) do glukoza-1-fosfata, koji može ući u reakcije glikolize i glikogeneze (366,367). Treći važan enzim u Leloirovom putu je uridildifosfat-galaktoza epimeraza (GALE) koji pretvara nusprodukt stvaranja glukoza-1-fosfata, uridildifosfat-galaktozu (UDP-galaktoza), u epimer UDP-glukozu, koja dalje ulazi u sintezu glikogena (368), a oboje su ključni u post-translacijskoj kontroli glikozilacije i galaktozilacije proteina i sintezi mukopolisaharida (366).

### **1.3.2.2. Primjena galaktoze u ljudi**

Najviše istraživanja o galaktozi provedeno je u svrhu razjašnjavanja skupine poremećaja galaktozemija, nasljednih poremećaja manjka određenih enzima uključenih u metabolizam galaktoze. Iako se teške posljedice galaktozemije često uzimaju kao dokaz o njenom štetnom učinku u organizmu, sve je više podataka koji pokazuju da patofiziološke posljedice galaktozemije nastaju zbog promjena u biokemijskim putevima uzrokovanim enzimatskim deficitom, a ne zbog akumulacije same galaktoze, koja se nakuplja neovisno o tipu

galaktozemije, dok se klinička slika u pojedinom tipu poremećaja umnogome razlikuje (365). Primjerice, u galaktozemiji tipa 2 koja je uzrokovana manjkom enzima GALK, klinička slika je blaga i manifestira se kataraktama, dok u tipu 3, koji je posljedica manjka enzima GALE, klinička slika varira od blage do teške te uključuje katarakte, zaostajanje u rastu i razvoju, mentalnu zaostalost i poremećaje u jetri i bubrezima (369). S druge strane, galaktozemija tipa 1, zvana i klasična galaktozemija, koja nastaje kao posljedica manjka enzima GALT, može imati fatalne posljedice ukoliko se ne dijagnosticira odmah po rođenju djeteta; zahvaćena djeca razvijaju letargiju, žuticu, oštećenje jetre i krvarenja uz moguć nastup sepse i šoka (369). Točan patofiziološki mehanizam koji je zaslužan za ove razlike u simptomatologiji bolesti još uvijek nije razjašnjen, no dosadašnji podaci upućuju na to da je disfunkcija samog metaboličkog puta važniji faktor naspram samom nakupljanju galaktoze. Primjerice, intermedijeri galaktitol i galaktonat nakupljaju se uz galaktozu i u tipu 1 i u tipu 2 bolesti, dok se samo u tipu 1 nakuplja i galaktoza-1-fosfat, što za posljedicu može imati poremećeni kompenzatorni mehanizam čija je uloga očuvanje regulatornih glikozilacija lipida i proteina (370). Klinički podaci o dobiti suplementacije galaktozom u niskim dozama u djece s galaktozemijom tipa 1 dodatno potvrđuju kompleksnost patofiziologije te bolesti, budući da je nađeno paradoksalno poboljšanje u glikozilaciji ciljnih proteina, poput imunoglobulina G (IgG) (371).

U kliničkim se ispitivanjima nadalje galaktoza ispituje kao dodatak prehrani u pacijenata s DM2 (372), kongenitalnim poremećajima glikozilacije (373), s tipom 14 bolesti pohrane glikogena (374) i drugim patološkim stanjima. Zanimljiv je prikaz slučaja u kojem je terapija oralnom galaktozom u pacijentice s kongenitalnom prosopagnozijom i poremećajem pozornosti s hiperaktivnošću rezultirala značajnim poboljšanjem cjeloživotnog poremećaja percepcije lica uz poboljšan osjećaj orijentacije i razvoj živopisnih mentalnih slika, a koji su nestali po prestanku uzimanja galaktoze (375). U prikazu slučaja pacijentice s upalnim lezijama demijelinizacije u mozgu, galaktoza je nakon dva mjeseca oralne terapije dovela do smanjenja simptoma utrnulosti i poboljšanja u općoj slabosti i centralnim simptomima, što je još uvijek bilo prisutno čak šest mjeseci nakon prestanka terapije (376).

### **1.3.2.3. Primjena galaktoze u animalnim modelima**

Drugi veliki izvor podataka o utjecaju galaktoze na organizme jesu istraživanja razvoja animalnih modela starenja. Samo je manji broj studija bio fokusiran na galaktozu kao terapijsku mogućnost, napose u kognitivnim poremećajima, zbog čega je važno raščlaniti studije o

galaktozi na one koje su izučavale njezin utjecaj nakon parenteralne primjene, u odnosu na učinke nakon peroralne primjene.

### **Parenteralna primjena galaktoze**

Galaktoza se isprva počela primjenjivati u modelima starenja kada su kineski istraživači otkrili da se parenteralnom primjenom galaktoze smanjuje životni vijek u glodavaca (377,378), *Drosophila* (379), kulturi fetalnih neurona štakora i plućnih fibroblasta čovjeka (380). Životinje su, osim skraćivanja životnog vijeka, pokazivale i znakove kognitivne disfunkcije i neurodegeneracije (381–384), smanjenog imunskog odgovora (385,386) i povećanog oksidativnog stresa (387). Korištene doze za modeliranje starenja varirale su od 50 mg/kg do čak 1250 mg/kg, dok je duljina kronične primjene bila između 6 i 12 tjedana (388).

Iako su mnoga istraživanja lijekova protiv starenja koristila upravo ovaj animalni model, relativno je malo istraživanja koja su se posvetila razjašnjavanju patofizioloških mehanizama galaktozom induciranog starenja. Kao glavni mehanizam nastanka oštećenja u glodavaca nameće se galaktozom-inducirani oksidativni stres (389), no točan mehanizam nije do kraja poznat. U nedavnim preglednim radovima o galaktozom-induciranom starenju (390) i neurodegeneraciji (391) predložena su tri mehanizma kojima galaktoza uzrokuje patološke promjene; (1) oksidativni stres zbog nakupljanja alkohola galaktitola u metaboličkom putu galaktoze te posljedična deplecija reduciranog oblika nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH) i osmotski stres zbog nemogućnosti daljnjeg metabolizma galaktitola; (2) reakcija galaktoze sa slobodnim aminokiselinskim ostacima proteina, lipida i nukleinskih kiselina uz posljedično stvaranje AGE; (3) stvaranje vodikova peroksida oksidacijom galaktoze enzimom galaktoza oksidaza i posljedičnim stvaranjem ROS-a – mehanizam diskutabilne vjerodostojnosti budući je enzim galaktoza oksidaza nađen isključivo u nekim vrstama bakterija i gljiva, dok u glodavaca dosad nije identificiran.

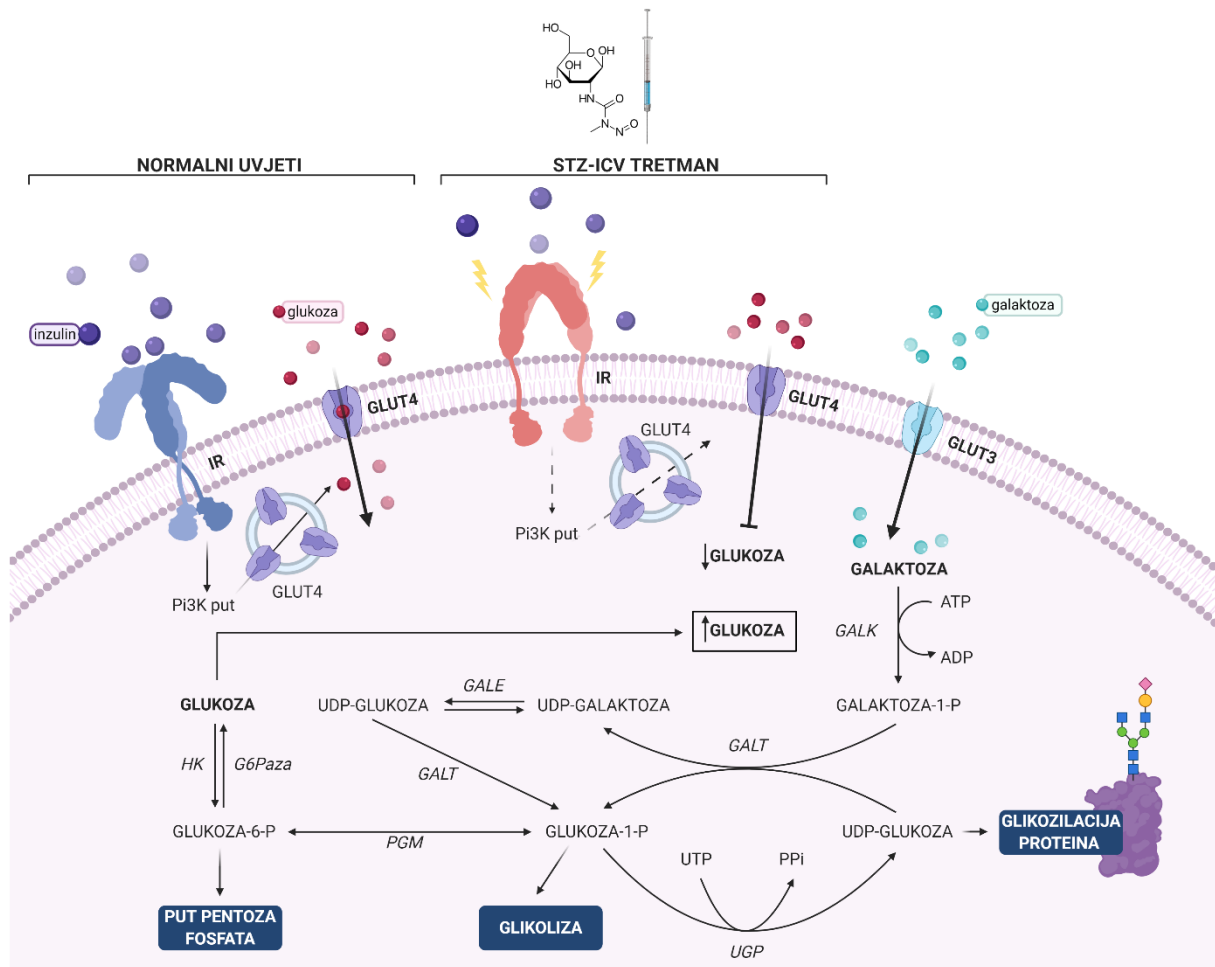
Međutim, neki su autori prilikom ispitivanja karakteristika modela galaktozom-induciranog starenja došli do obratnih zaključaka, pa tako u istraživanju modela induciranog svakodnevnim intraperitonealnim davanjem galaktoze u dozi od 300 mg/kg tijekom 8 tjedana, u štakorima soja Wistar starih mjesec dana, Cardoso i suradnici (392) nisu uočili značajne razlike u odnosu na kontrolne štakore u razini anksioznosti, prostornom učenju i pamćenju te neurogenezi u hipokampusu.

## Peroralna primjena galaktoze

U odnosu na broj istraživanja s parenteralno primijenjenom galaktozom, samo je manji broj istraživanja posvećen učincima peroralno primijenjene galaktoze.

Budni i suradnici (393,394) primjenjivali su jednokratne bolus doze galaktoze u štakora svakodnevnim oralnim sondiranjem, u dozi od 100 mg/kg, pri čemu su životinje nakon 6-8 tjedana razvijale kognitivni deficit. Na molekularnoj razini, nađena je povećana aktivnost kompleksa I, II, III i IV dišnog lanca u mitohondrijima u prefrontalnoj kori i hipokampusu. Budući su upravo mitohondriji zaduženi za stvaranje ROS-a, autori su predložili da je disfunkcija mitohondrija uzrokom razvoja kognitivnog deficita. Međutim, ovi se rezultati kose s nalazima da je supkutana primjena galaktoze u miševa dovela do kognitivnih deficita uz značajno smanjenje aktivnosti mitohondrijskih kompleksa (391,395,396). Krzysztoforska i suradnici (397) također su uočili kognitivni deficit u štakora tretiranih svakodnevnim peroralnim bolus dozama galaktoze (100 mg/kg), uz promjene razina serotonina i dopamina u moždanoj kori i hipokampusu. S druge strane, Chogtu i suradnici (398) pokazali su značajno poboljšanje u pamćenju i učenju nakon peroralne i supkutane primjene galaktoze u dozi od 200 mg/kg/dan; međutim, taj je učinak bio ovisan o trajanju terapije.

Hipoteza da je pružanjem alternativnog izvora energije u obliku galaktoze moguće intervenirati u nastajanju kognitivnih deficita uzrokovanih primjenom STZ-icv (399) (Slika 6) nastala je temeljem istraživanja Reuttera i suradnika (400). Oni su pokazali da se galaktoza apsorbira u stanicama mozga u sličnom opsegu kao u stanicama jetre, te da za razliku od glukoze, galaktoza ulazi u stanice putem inzulinske nezavisne nosača GLUT3 (401,402). Također, istaknuli su da svojim prolaskom kroz gastrointestinalni trakt nakon peroralne primjene, galaktoza u crijevima uzrokuje otpuštanje želučanog inhibitorynog polipeptida (GIP, engl. *gastrointestinal inhibitory polypeptide*) i GLP-1, koji osim sekretogenog učinka za inzulin djeluju i neuroprotektivno i poboljšavaju učenje i pamćenje u STZ-icv modelu sAB-a (403) i transgeničnom mišjem modelu APP/PS1 fAB-a (404). Stoga je u preliminarnom istraživanju naše istraživačke skupine ispitan učinak svakodnevne primjene oralne galaktoze, dane u obliku napitka koje životinje piju *ad libitum* u tri različite doze (100/200/300 mg/kg/dan), u prevenciji nastanka kognitivnih deficita u modelu sAB-a izazvanom STZ-icv. Terapija oralnom galaktozom započeta je odmah nakon primjene STZ-icv (1 mg/kg) u štakora soja Wistar starih tri mjeseca i u skupini životinja starih 7-8 mjeseci te je trajala mjesec dana. Jednomjesečna terapija peroralnom galaktozom uspješno je spriječila pojavu kognitivnih deficita induciranih STZ-icv te je taj učinak bio neovisan o dozi galaktoze kao i o dobi životinja u trenutku primjene STZ-icv (263).



**Slika 6** Pretpostavljeni mehanizam blagotvornog učinka galaktoze na snižene unutarstanične razine glukoze u modelu sporadične Alzheimerove bolesti izazvanom intracerebroventrikularnom primjenom streptozotocina i metabolizam galaktoze u Leloirovom putu; prema Šalković-Petrišić i sur., 2014. (263).

Puna linija = stimulirani proces; isprekidana linija = inhibirani proces; STZ-icv – intracerebroventrikularna primjena streptozotocina; IR – inzulinski receptor; GLUT4 – nosač glukoze 4; GLUT3 – nosač glukoze 3; Pi3K – fosfatidilinozitol kinaza-3; ATP – adenzin trifosfat; ADP – adenzin difosfat; GALK – galaktokinaza; galaktoza-1-P – galaktoza-1-fosfat; glukoza-1-P – glukoza-1-fosfat; glukoza-6-P – glukoza-6-fosfat; GALT – galaktoza-1-fosfat uridiltransferaza; UTP – uridin trifosfat; UDP – uridin difosfat; PPi – pirofosfat; UGP – uridildifosfat-glukoza fosforilaza; GALE - uridildifosfat-galaktoza epimeraza; PGM – fosfoglukomutaza; HK – heksokinaza; G6Paza – glukoza-6-fosfataza.

## **2. HIPOTEZA**

Dugotrajna primjena oralne galaktoze ima povoljan učinak na kognitivna oštećenja u eksperimentalnim modelima sporadične i familijarne Alzheimerove bolesti posredovan poboljšanjem metabolizma glukoze u mozgu i stimulacijom aktivnosti glukagonu sličnog peptida 1.

### 3. CILJEVI RADA

#### OPĆI CILJ

Ispitati terapijski potencijal i moguće mehanizme povoljnog učinka dugotrajne primjene oralne galaktoze u eksperimentalnim modelima Alzheimerove bolesti.

#### SPECIFIČNI CILJEVI

1. Ispitati učinak na kognitivni deficit u štakorskom STZ-icv modelu sAB-a i mišjem Tg2576 modelu fAB-a ovisno o patološkom stadiju bolesti (rani i uznapredovali stadij).
2. Ispitati metaboličke učinke u oba modela na razini *in vivo* učinka na metabolizam glukoze u mozgu (FDG-PET sken) i *in vitro* mjerenja ekspresija GLUT3 i GLUT4 u hipokampusu, te razine glukoze, galaktoze i inzulina u krvi/likvoru.
3. Ispitati učinak na GLP-1 sustav u oba modela mjerenjem razine ukupnog/aktivnog GLP-1 u plazmi i likvoru, te ekspresije GLP-1 receptora u hipokampusu/in situ u mozgu.
4. Odrediti učinak na pojedina obilježja AB-a u mozgu (nakupljanje proteina tau i A $\beta$ , ekspresija IDE, astroglioza) u oba modela.



## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Životinje

Istraživanje je provedeno u dvije vrste malih glodavaca. U dva su pokusa korišteni mužjaci štakora soja Wistar, uzgojeni na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i držani u istoj licenciranoj nastambi za laboratorijske životinje (HR-POK-007; Šalata 11, Zagreb). U druga dva pokusa korišteni su mužjaci transgeničnih heterozigotnih miševa B6;SJL-Tg(APPSWE)2576Kha i pripadajući divlji homozigotni miševi uzgojeni i kupljeni od tvrtke Taconic Biosciences Inc. (Hudson, SAD) koji su u dobi od 3 mjeseca na dalje držani u licenciranoj nastambi za laboratorijske životinje pri Hrvatskom institutu za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (HR-POK-006; Šalata 12, Zagreb).

Postupci provedeni na životinjama i njihovo držanje provedeno je u skladu s nacionalnim i međunarodnim zakonima i propisima: Direktiva 2010/63/EU Europskog Parlamenta i Vijeća o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe; hrvatski Zakon o zaštiti životinja (NN 102/17, 32/19), hrvatski Zakon o provedbi uredbi Europske unije o zaštiti životinja (NN 125/13, 14/14, 92/14, 32/19), Uredba Vijeća (EZ) br. 1099/2009 o zaštiti životinja u trenutku usmrćivanja. Svi su provedeni postupci odobreni od strane Ministarstva poljoprivrede (klasa: UP/I-322-02/15-01/156, ur. broj: 525-10/0255-15-5 od 21. kolovoza 2015. godine i ur. broj: 525-10/0255-17-8 od 16. ožujka 2017. godine) te Etičkog povjerenstva za dobrobit životinja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u sklopu projekta „Terapijski potencijal oralne galaktoze u eksperimentalnoj Alzheimerovoj bolesti“ financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ IP-2014-09-4639). Autorica posjeduje dozvolu za provođenje *in vivo* postupaka na životinjama (kategorija 3; br. TŽP 11/17 HR191/01/P), dok je tehničko osoblje uključeno u istraživanje također certificirano za rad s laboratorijskim životinjama licencama kategorije 2.

Štakori su držani u kavezima sa steljom za laboratorijske glodavce (2 ili 3 životinje po kavezu) s neograničenim pristupom vodi i hrani, izuzev perioda primjene galaktoze, kada su ispitivane životinje držane zasebno u kavezima te je pristup vodi ispitivanim životinjama bio ograničen. Miševi su držani zasebno u kavezima sa steljom za laboratorijske glodavce s neograničenim pristupom vodi i hrani, izuzev perioda primjene galaktoze, kada su ispitivane životinje imale ograničen pristup vodi. Životinje su držane u prostorijama s 12-satnim ciklusom izmjene svjetla i mraka, sobnom temperaturom između 22 i 25°C i vlagom između 40 i 60%. Mišji su

kavezi dodatno držani u ventiliranim ormarima namijenjenim držanju laboratorijskih miševa, koji osiguravaju uvjete konstantne temperature i vlage.

## 4.2. Plan istraživanja

Istraživanje obuhvaća četiri pokusa na laboratorijskim životinjama te naknadnu analizu dobivenih bihevioralnih podataka i prikupljenih animalnih uzoraka. Dva su pokusa provedena na štakorima (N=80; Pokus 1 i 2) i dva na miševima (N=80; Pokus 3 i 4) s četiri skupine (CTR, STZ, CTR+GAL, STZ+GAL u Pokusima 1 i 2; odnosno, WT, TG, WT+GAL, TG+GAL u Pokusima 3 i 4) i deset životinja po skupini u svakom pokusu. U svakom je pokusu ispitan učinak svakodnevne dvomjesečne primjene oralne galaktoze (200 mg/kg/dan), započete u različitim stadijima patologije AB-a.

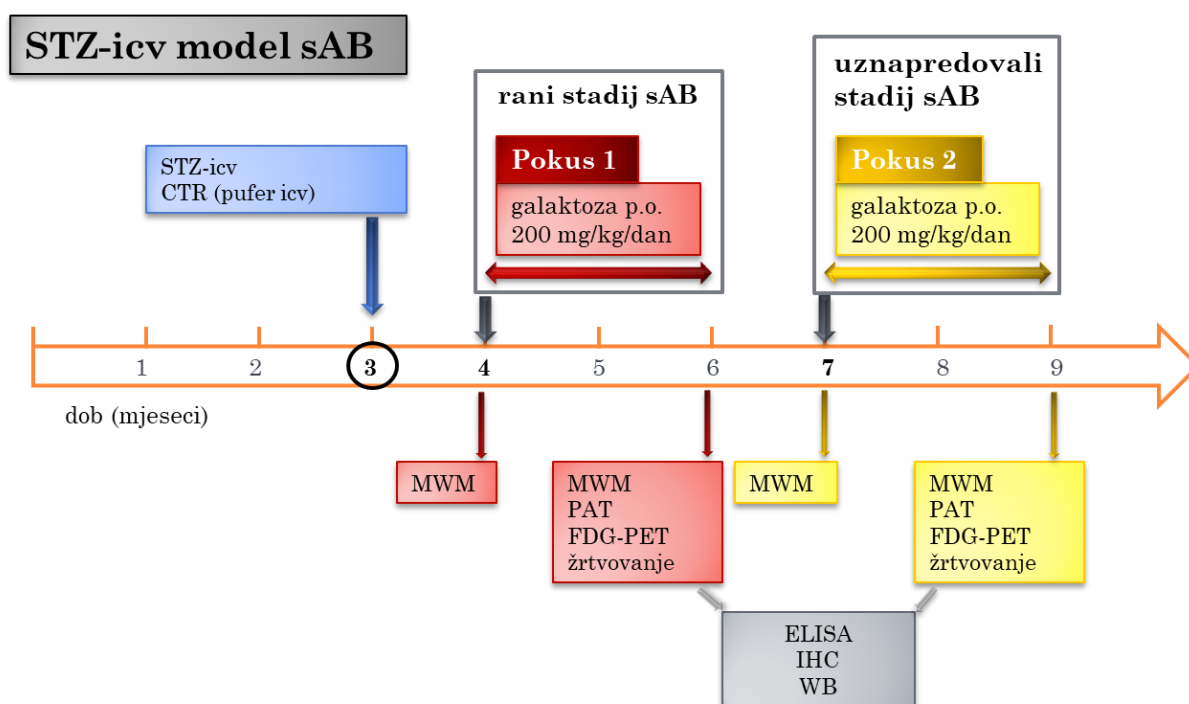
U Pokusu 1 ispitan je mogući terapijski učinak oralne galaktoze na ranu, reverzibilnu ili djelomično reverzibilnu patologiju u štakorskom modelu sAB-a dobivenom primjenom STZ-icv, započinjanjem terapije galaktozom 1 mjesec nakon STZ-icv tretmana, dok je u Pokusu 2 ispitan mogući učinak na uznapredovale, progresivne i načelno ireverzibilne patološke promjene, započinjanjem terapije galaktozom 4 mjeseca nakon STZ-icv tretmana (Slika 7). Procjena stupnjevanja patoloških promjena temeljena je na prethodnim istraživanjima i praćenju promjena do 9 mjeseci nakon STZ-icv primjene u štakora (134). U oba pokusa tretman STZ-icv proveden je u štakora starosti 3 mjeseca.

U Pokusima 3 i 4 kao modeli fAB-a korišteni su transgenični miševi Tg2576 koji prema deklaraciji proizvođača (Taconic, SAD) razvijaju kognitivni deficit u dobi od 6 mjeseci i plakove u dobi od 11-12 mjeseci. U Pokusu 3 tretman galaktozom započet je u 5. mjesecu života miševa radi ispitivanja učinaka u ranom, preasimptomatskom stadiju fAB-a, a u Pokusu 4 u 10. mjesecu života radi ispitivanja učinaka galaktoze u blagom stadiju bolesti (Slika 8).

U sva 4 pokusa dvomjesečnoj terapiji oralnom galaktozom prethodilo je ispitivanje kognitivnih funkcija *Morris Water Maze* testom plivanja u labirintu (MWM) radi utvrđivanja kognitivnih deficita. Po završetku dvomjesečne terapije oralnom galaktozom kognitivne funkcije životinja u sva četiri pokusa ispitane su MWM-om i *passive avoidance* testom pasivnog izbjegavanja (PAT). U Pokusima 3 i 4 dodatno su provedena bihevioralna testiranja *open field* (OF) test otvorenog polja, *elevated plus maze* (EPM) test uzdignutog križnog labirinta (samo Pokus 4) te *nesting* test poremećaja svijanja gnijezda u glodavaca. Nakon kognitivnih i bihevioralnih

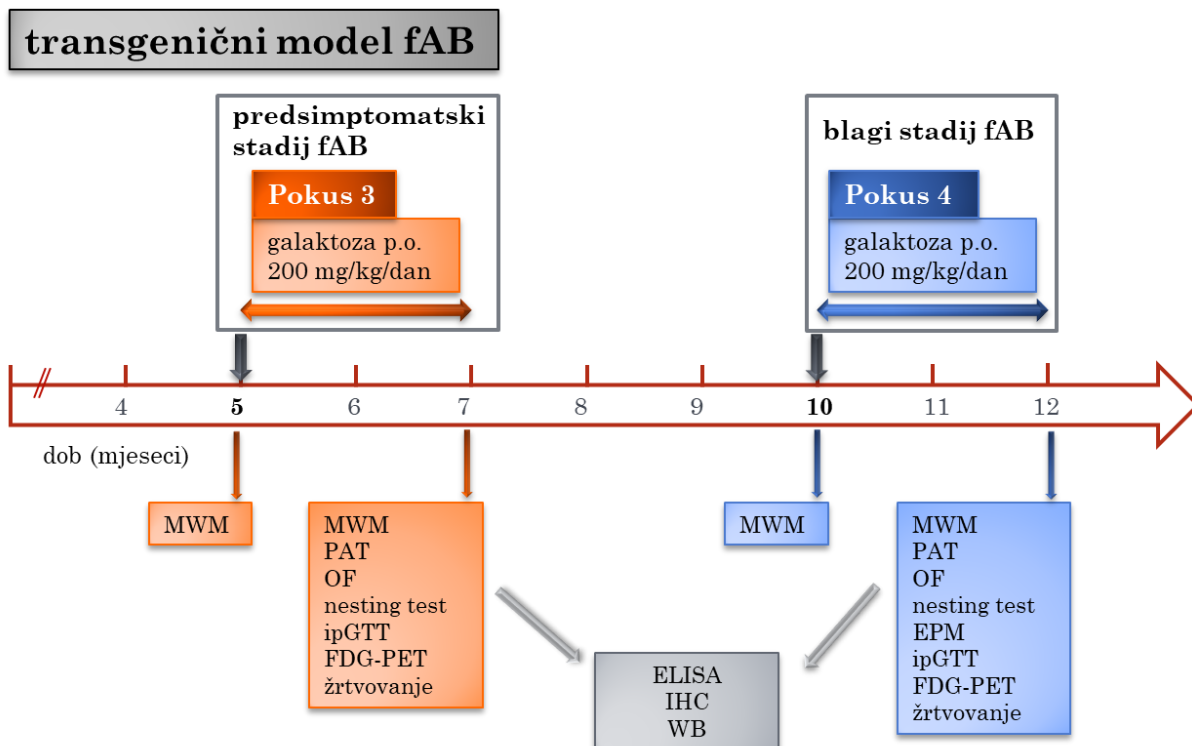
ispitivanja, životinje iz Pokusa 3 i 4 podvrgnute su intraperitonealnom testu tolerancije glukoze, nakon čega su iz sva 4 pokusa dvije (odnosno, četiri u slučaju Pokusa 4) životinje iz svake skupine podvrgnute *in vivo* metaboličkom mjerenju ulaska glukoze u stanice mozga pozitronskom emisijskom tomografijom nakon primjene <sup>18</sup>Ffluorodeoksiglukoze (FDG-PET) pri Institutu Ruđer Bošković. Nakon kognitivnog ispitivanja i FDG-PET mjerenja, životinje u sva 4 pokusa su žrtvovane u dubokoj anesteziji te su uzeti uzorci krvi, likvora (samo u štakora) i mozga za kasniju analizu Western blot, imunohistokemijskim i spektrofotometrijskim tehnikama.

Istraživanje je provedeno u sklopu projekta „Terapijski potencijal oralne galaktoze u eksperimentalnoj Alzheimerovoj bolesti“ financiranog od Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ IP-2014-09-4639).



**Slika 7 Tijek provođenja Pokusa 1 i 2 na štakorima.**

*sAB* – sporadična Alzheimerova bolest; *STZ-icv* – intracerebroventrikularna primjena streptozotocina; *CTR* – kontrolna skupina životinja; *p.o.* – peroralna primjena; *MWM* – Morris Water Maze test plivanja u labirintu; *PAT* – passive avoidance test pasivnog izbjegavanja; *FDG-PET* – pozitronska emisijska tomografija <sup>18</sup>[F]fluorodeoksiglukozom; *ELISA* – imunoenzimski test; *IHC* – imunohistokemija; *WB* – Western blot.



**Slika 8 Tijek provođenja Pokusa 3 i 4 na miševima.**

fAB – familijarna Alzheimerova bolest; p.o. – peroralna primjena; MWM – Morris Water Maze test plivanja u labirintu; PAT – passive avoidance test pasivnog izbjegavanja; OF – open field test otvorenog polja; ipGTT – intraperitonealni test tolerancije glukoze; EPM – elevated plus maze test uzdignutog križnog labirinta; FDG-PET – pozitronska emisijska tomografija  $^{18}\text{F}$ fluorodeoksiglukozom; ELISA – imunoenzimski test; IHC – imunohistokemija; WB – Western blot.

### 4.3. Farmakološki tretmani

U Pokusima 1 i 2 štakori su podvrgnuti primjeni STZ-icv u dobi od 3 mjeseca. U sva četiri pokusa životinje su dva mjeseca primale oralnu otopinu galaktoze u vodi za piće. Terapija galaktozom započeta je jedan mjesec nakon primjene STZ-icv u Pokusu 1, četiri mjeseca nakon primjene STZ-icv u Pokusu 2, u dobi od 5 mjeseci u Pokusu 3 te u dobi od 7 mjeseci u Pokusu 4.

#### 4.3.1. Streptozotocin

Životinje su prije primjene STZ-icv izvagane i anestetizirane kombinacijom ketamina (50 mg/kg ip; Ketamidol, Richter Pharma, Austrija) i ksilazina (5 mg/kg ip; Xylazine 20 mg/ml, Alfasan International, Nizozemska). U općoj anesteziji životinjama je škaricama zarezana koža glave u medijalnoj liniji (1 cm) te je na parijetalnoj kosti bilateralno (1,2 mm kaudalno od bregme i 1,5

mm lateralno od medijalne linije) električnom bušilicom (Ultimate XL, NSK Europe GmbH, Njemačka) napravljen mali otvor (polumjera 1 mm); prema postupku prethodno opisanom u literaturi (405) i korištenom u prethodnim istraživanjima mentora (260,263). Neposredno prije primjene, STZ (Sigma Aldrich, SAD) je zbog fotosenzitivne naravi u uvjetima s minimalnim osvjetljenjem otopljen u citratnom puferu (pH 4,5). 2  $\mu$ L otopine STZ-a (životinje iz grupe STZ) ili samog citratnog pufera (životinje iz grupe CTR) primijenjeno je sporim injiciranjem mikrolitarskom injekcijskom iglom (Hamilton Company, SAD) u obje lateralne moždane komore, 4 mm u dubinu od površine parijetalne kosti. Isti je postupak ponovljen 48 sati poslije, čime je ukupna doza primijenjenog STZ-a iznosila 3 mg/kg. Po izvršenom injiciranju rubovi kože spojeni su kirurškim šavom (2 do 4 šava) uz uobičajenu postoperativnu skrb životinja.

- *Citratni pufer:*

0,05 M limunska kiselina (Kemika, Hrvatska)

0,05 M natrij citrat (Merck-Alkaloid, Makedonija)

dH<sub>2</sub>O

pH 4,5

#### **4.3.2. Galaktoza**

Za potrebe dvomjesečne terapije oralnom galaktozom, ispitivane skupine životinja (CTR+GAL i STZ+GAL u Pokusima 1 i 2; odnosno, WT+GAL i TG+GAL u Pokusima 3 i 4) primale su D-galaktozu (D-Galactose, Sigma Aldrich, SAD) otopljenu u vodi za piće, dok su kontrolne životinje u istom periodu primale običnu vodu za piće. Doza od 200 mg/kg po danu određena je prema preliminarnom istraživanju s tri doze galaktoze, 100, 200 i 300 mg/kg po danu, gdje je doza od 200 mg/kg po danu uspješno spriječila nastanak kognitivnih deficita u STZ-icv modelu sAB-a (263). U Pokusima 1 i 2, štakori su dobivali 20 ml galaktozne otopine dnevno (ekvivalentno 0,3%), dok su u Pokusima 3 i 4 miševi dobivali 10 ml galaktozne otopine (ekvivalentno 0,06%). Za potrebe individualnog doziranja galaktoze, životinje su u sva četiri pokusa odvajane u zasebne kaveze.

## 4.4. Kognitivno i bihevioralno testiranje

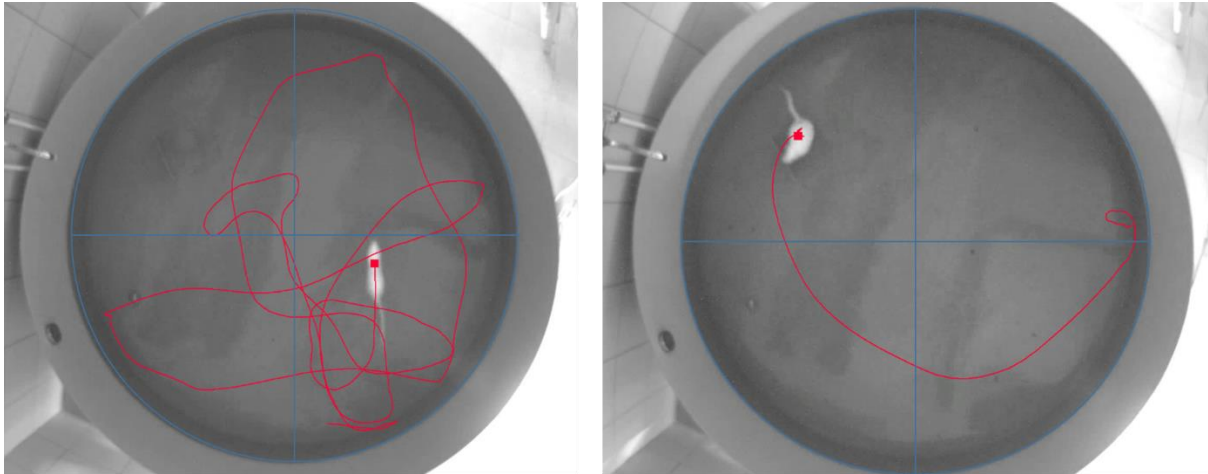
Kognitivne funkcije životinja u sva četiri pokusa ispitane su pomoću dva testa; MWM testom plivanja u labirintu za procjenu prostornog učenja te PAT testom pasivnog izbjegavanja za procjenu kratkotrajnog pamćenja. Dodatno, u cilju bolje karakterizacije transgeničnog mišjeg modela Tg2576, za procjenu ponašanja životinja u otvorenom prostoru, odnosno procjenu mobilnosti i anksioznog ponašanja, u Pokusima 3 i 4 korišten je OF test otvorenog polja. Usto, za dodatnu karakterizaciju anksioznosti miševa, u Pokusu 4 korišten je EPM test uzdignutog križnog labirinta. Za procjenu očuvanosti uobičajenog ponašanja svijanja gnijezda u miševa, u Pokusima 3 i 4 proveden je *nesting* test.

### 4.4.1. *Morris Water Maze* test plivanja u labirintu

*Morris Water Maze* (MWM) test plivanja u labirintu razvio je Richard Morris 1984. godine kao metodu procjene prostornog učenja u glodavaca (406,407). Test se provodi u okruglom bazenu promjera 180 cm za štakore, odnosno 120 cm za miševe, i dubine 50 cm, napunjenom vodovodnom vodom temperature  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Praćenje plivanja životinja u bazenu provodi se kamerom Basler acA1300 (Basler AG, Njemačka) i softverskom platformom Noldus EthoVision XT (Noldus Information Technology, Nizozemska). Bazen je virtualno podijeljen na četiri kvadranta (sjeverozapad / NW, od engl. *north-west*; sjeveroistok / NE, od engl. *north-east*; jugozapad / SW, od engl. *south-west*; jugoistok / SE, od engl. *south-east*) te je u jednom od njih (NW) smješteno prozirno postolje 2 cm ispod razine vode. Tijekom pet dana treninga, životinje uče pronaći postolje u četiri jednogminutna treninga, s različitim početnom točkom pri svakom treningu. Treninzi su u istom danu odvojeni minimalno 30 minuta jedan od drugog. Po nalasku postolja, životinjama je dopušten boravak na postolju u trajanju od 15 sekundi, a ukoliko životinja sama ne uspije pronaći postolje, po isteku 60 sekundi ispitivač odvede životinju do postolja kako bi naučila njegovu lokaciju, nakon čega se životinja vraća u kavez. U svakom se treningu bilježi vrijeme potrebno da životinja dođe do postolja i na njemu provede više od 5 sekundi (vrijeme latencije), te broj ulazaka u pogrešne kvadrante, odnosno kvadrante u kojima se postolje ne nalazi (broj grešaka). Šesti se dan provodi ispitivanje prostornog učenja (engl. *probe trial*) tako da se postolje makne iz bazena, a mjeri se vrijeme koje životinja provede tražeći postolje u kvadrantu NW te broj ulazaka u pogrešne kvadrante.

Dodatno se toplinskim kartama načinjenim od preklopljenih putanja svih životinja iz pojedine grupe te podacima o brzini kretanja i ukupno prijeđenoj udaljenosti u bazenu analizirala aktivnost životinja u bazenu.

Test je proveden u sva četiri pokusa, prije i poslije 2-mjesečne terapije oralnom galaktozom. Izvođenje testa u Pokusu 1 prikazuje Slika 9.



**Slika 9 Prikaz provođenja Morris Water Maze testa plivanja u labirintu u Pokusu 1 iz programa EthoVisionXT.**

Na lijevom prikazu nalazi se prijeđeni put štakora u bazenu koji za vrijeme treninga nije našao skrivenu platformu. Na desnom prikazu štakor je uspješno pronašao platformu i trening se prekida. Crvena linija predstavlja putanju plivanja životinje praćenu programom Noldus EthoVision XT.

#### **4.4.2. Passive avoidance test pasivnog izbjegavanja**

Test pasivnog izbjegavanja, *passive avoidance test* (PAT), strahom je motivirani test izbjegavanja koji iskorištava prirodenu sklonost glodavaca mračnim okruženjima (408,409). Test se provodi u uređaju (Ugo Basile, Italija) podijeljenom na dvije komore, od kojih je jedna jarko osvijetljena, bijela komora, a druga tamna, neosvijetljena komora. Između komora nalaze se vratašca kojima životinja može prijeći iz prvotne, bijele komore, u tamnu komoru. Dno uređaja čini metalna rešetka, čiji je tamni dio elektrificiran. PAT se provodi 3 dana, gdje se prvog dana životinje prilagođavaju na uređaj, drugi dan odnosi se na isporučivanje averzivnog događaja životinji, odnosno električnog šoka, a trećeg se dana mjeri retencija pamćenja. Prvog se dana životinja stavlja u osvijetljenu komoru sa slobodnim pristupom tamnoj komori, kako bi se upoznala s okolišem. Životinji je omogućeno istraživanje okoliša 5 minuta, odnosno, habituacija se prekida nakon što životinja uđe u tamnu komoru i u njoj provede 15 sekundi. Drugog se dana po ulasku u tamnu komoru životinji isporučuje elektrošok jačine 0,2-0,5 mA (ovisno o vrsti i težini životinje) u trajanju od 2 sekunde putem metalne rešetke koja čini dno

tamne komore i po kojoj životinja hoda. Trećeg se dana bilježi vrijeme latencije, odnosno vrijeme potrebno da životinja uđe iz svijetle u tamnu komoru. Maksimalno vrijeme koje životinja može provesti u uređaju je 5 minuta (engl. *cut-off time*).

Temeljna je pretpostavka testa da se životinje s kognitivnim oštećenjem kraće zadržavaju u svijetloj komori od onih s intaktnim pamćenjem i sjećanjem na prethodni averzivni događaj. Test je proveden u sva četiri pokusa, nakon 2-mjesečne terapije oralnom galaktozom. Uređaj za izvođenje PAT-a te testiranje štakora u tijeku prikazuje Slika 10.



**Slika 10** Uređaj za izvođenje testa pasivnog izbjegavanja i provođenje testa u Pokusu 1.

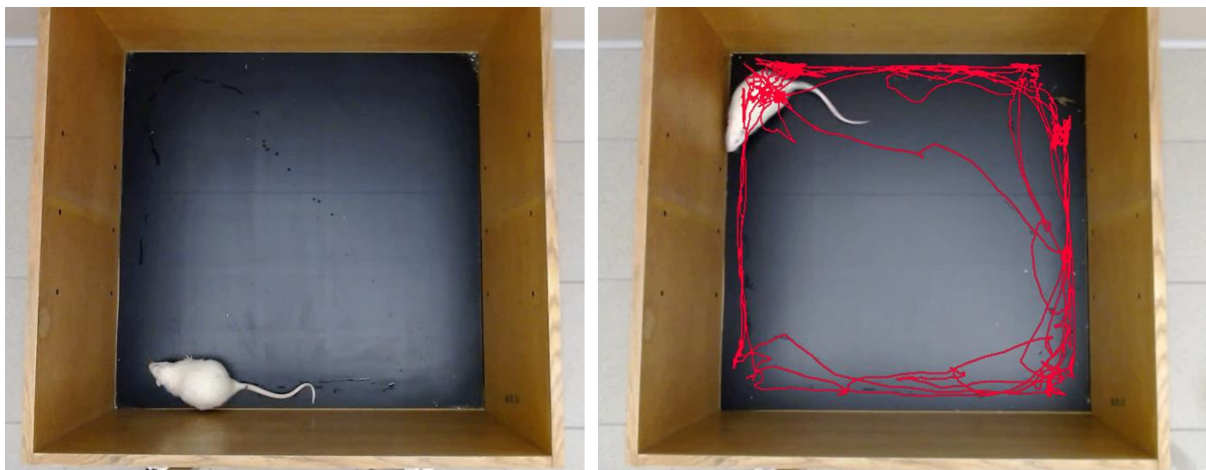
#### **4.4.3. Open field test otvorenog polja**

Procjena mobilnosti i anksioznog ponašanja životinja ispitana je *open field* (OF) testom otvorenog polja (Slika 11). Ispitivanje je provedeno u tamnoj četvrtastoj kutiji dimenzija 50 cm x 50 cm x 40 cm za miševe, odnosno, 100 cm x 100 cm x 40 cm za štakore. Mjereni su parametri bili vrijeme provedeno na periferiji (rubnim dijelovima kutije), vrijeme provedeno u središnjem kvadrantu, brzina kretanja i ukupno prijeđena udaljenost u aparatu te frekvencija timarenja, što je praćeno kamerom (Basler AG acA1300) i softverski analizirano (Noldus EthoVision XT). Opažanje ponašanja trajalo je 5 minuta za svaku životinju, a test je započet stavljanjem životinje uvijek u isti kut prethodno očišćene kutije.

Tendencija životinje da ostaje u području blizu zidova komore (tigmotaksija, od grčkog *thigmotaxis*; pojava izbjegavanja otvorenih površina i kretanja uz periferne rubove labirinta ili kutije) korištena je kao mjera anksioznosti, budući da povećanje tigmotaksije upućuje na povećanje anksioznosti (410). Frekvencija čišćenja i timarenja (engl. *grooming*) također je jedan od pokazatelja anksioznosti u životinja, obzirom da životinje koje su u stresu i anksiozne



životinje reagiraju pojačanim *grooming* ponašanjem (411). Brzina i ukupno prijeđena udaljenost u aparatu ukazuju na promjene u lokomotornom statusu životinja. OF je proveden u Pokusima 3 i 4 nakon 2-mjesečne terapije oralnom galaktozom radi dodatne karakterizacije transgeničnog modela Tg2576.



**Slika 11** Prikaz provođenja testa otvorenog polja iz programa *EthoVisionXT*.

Crvena linija predstavlja obrazac kretanja životinje u uređaju praćen programom *Noldus EthoVision XT*.

#### **4.4.4. *Elevated plus maze test* uzdignutog križnog labirinta**

Test uzdignutog križnog labirinta *elevated plus maze* (EPM) koristi se za procjenu anksioznosti životinja (412,413). Ovaj se test temelji na prirodnoj averziji glodavaca prema otvorenim prostorima. Averzija prema otvorenim prostorima povezana je s tigmotaksijom. Test se provodi u instrumentu izrađenom od pleksiglasa, čija su dva jednaka kraka ukrižena pod kutom od 90° i uzdignuta na visini od 50 cm. Dva su suprotstavljena kraka dužine 30 cm i širine 5 cm otvorena, s 4 mm visokim rubom, dok su druga dva kraka zatvorena crnim zidovima od pleksiglasa visine 20 cm. Prilikom izvođenja testa, miš se postavlja na spoj otvorenih i zatvorenih krakova labirinta, okrenut prema jednom otvorenom kraku. Miševi se u labirintu slobodno kreću 5 min te se njihovo kretanje, vrijeme provedeno u određenom kraku, broj ulazaka u krakove i provirivanje glavom u određeni krak bilježi kamerom (Basler AG acA1300) te prati i analizira softverom (*Noldus EthoVision XT*).

Smanjenje anksioznosti u EPM-u očituje se povećanjem broja ulazaka u otvoreni dio testa i duljim boravkom u otvorenim dijelovima instrumenta. EPM je proveden nakon 2-mjesečne terapije oralnom galaktozom u Pokusu 4. Uređaj za izvođenje EPM-a i testiranje miša u tijeku prikazuje Slika 12.



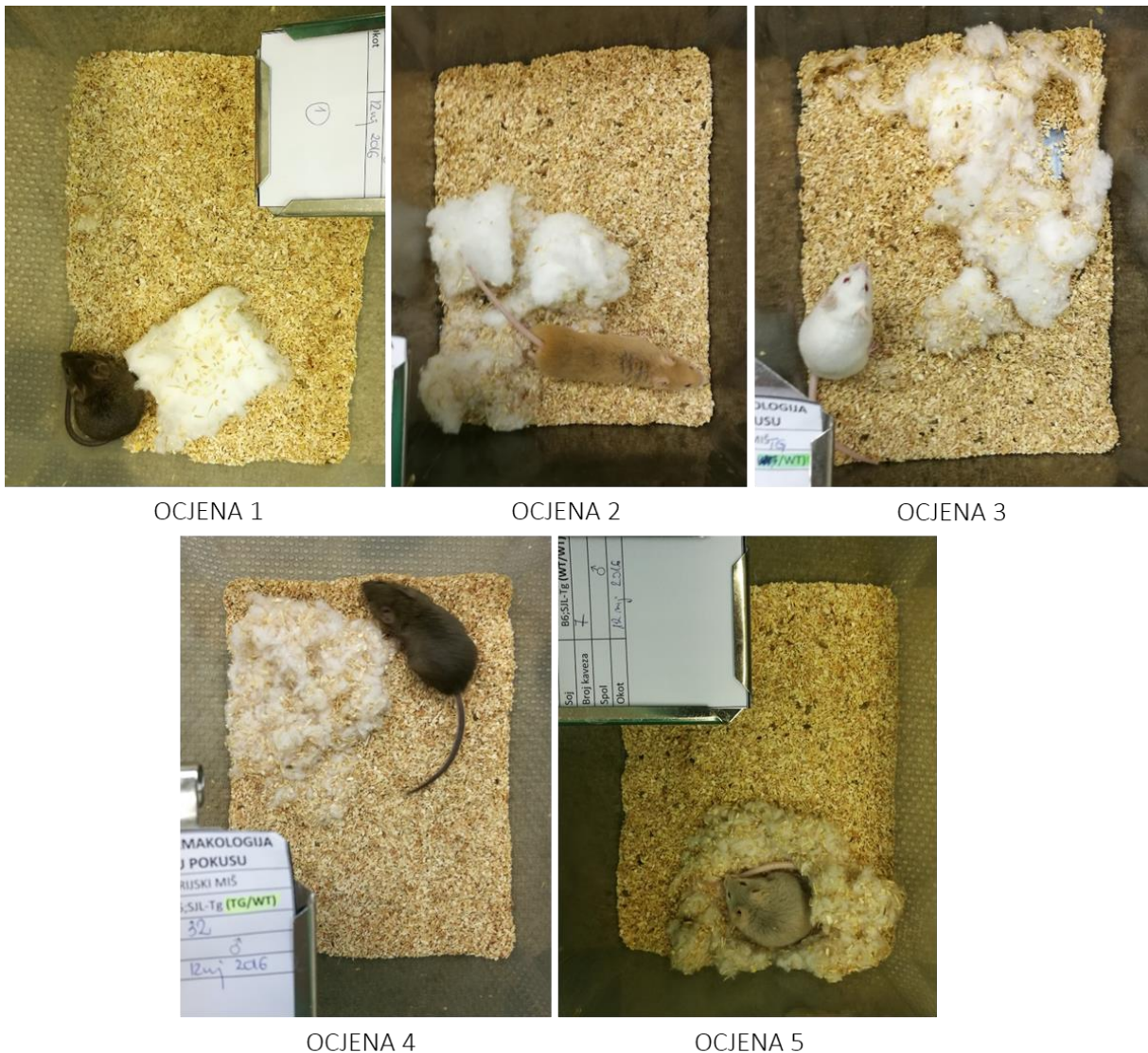
*Slika 12 Instrument za izvođenje testa uzdignutog križnog labirinta i izvođenje testa u Pokusu 4.*

#### **4.4.5. Nesting test**

U malih je glodavaca svijanje gnijezda od izrazite važnosti, budući da gnijezdo služi kao zaklon, omogućuje reprodukciju te je nužno u očuvanju tjelesne temperature. Zbog male veličine, miševi su posebno osjetljivi na gubitak tjelesne temperature pa i mužjaci i ženke miševa svijaju slična gnijezda. Poremećaj svijanja gnijezda pokazatelj je pogoršanja mogućnosti obavljanja svakodnevnih aktivnosti što je karakterističan simptom AB-a u ljudi, a u glodavaca se mjeri tzv. *nesting* testom (414,415). Test se provodi dva dana; prvi dan uvečer, sat vremena prije gašenja svjetala u životinjskoj nastambi, svakom se mišu u kavez stavi četvrtasti komad komprimirane vate dimenzija 5 cm x 5 cm. Iduće jutro provodi se procjena svakog izrađenog gnijezda ocjenjivačkom skalom od 1 do 5, gdje je:

- 1 – vata gotovo da nije taknuta, više od 90% materijala intaktno;
- 2 – vata je djelomično pokidana, 50-90% materijala intaktno;
- 3 – većina vate je pokidana, ali ne nazire se formirano gnijezdo, manje od 50% materijala je intaktno, ali je pokidani materijal razasut po kavezu;
- 4 – nazire se formirano gnijezdo, ali ono nije uzdignuto, više od 90% materijala je pokidano i nakupljeno unutar jedne četvrtine kaveza;
- 5 – (gotovo) savršeno gnijezdo, više od 90% materijala je pokidano i čini gnijezdo u obliku kratera ili krafne, s uzdignutim rubovima koji su viši od same životinje.

Primjeri gnijezda kojima je dana pojedina ocjena prikazuje Slika 13.



**Slika 13** Ocjenjivačka skala nesting testa i primjeri pojedinih ocjena iz provođenja testa u Pokusu 3.

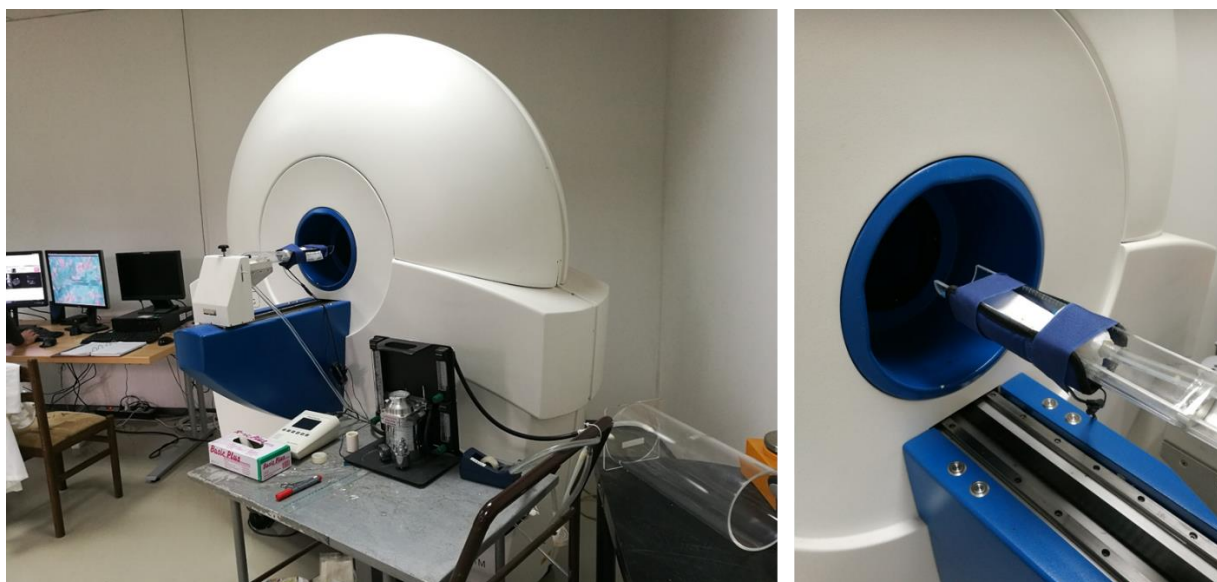
#### 4.5. *In vivo* metaboličko mjerenje

Mjerenje metabolizma glukoze u stanicama mozga *in vivo* provedeno je pretkliničkom Raytest ClearPET™ PET kamerom za male životinje Instituta Ruđer Bošković (Zagreb, Hrvatska) (Slika 14). Svojstva ClearPET™ kamere po pitanju prostorne rezolucije, osjetljivosti i kvalitete prikaza opisali su Roldan i sur. (416). Ulazak glukoze u stanice mozga ispitan je pomoću radioaktivno obilježenog analoga glukoze, <sup>18</sup>F-fluorodeoksiglukoze (<sup>18</sup>FDG), proizvedene *in situ* (Ruđer Medikol Ciklotron d.o.o., Zagreb, Hrvatska).



Mjerenje je u sva četiri pokusa provedeno nakon kognitivnog testiranja, a neposredno prije žrtvovanja. Prije skeniranja, kao dio standardnog protokola PET-skena, životinje su anestetizirane u indukcijskoj komori s 4% izoflurana (Forane, Abbott laboratories, Velika Britanija) te im je intravenski primijenjeno 30 MBq  $^{18}\text{F}$ FDG. Nakon 30 minuta, životinje su ponovo anestetizirane kako je prethodno opisano i smještene u PET skener. Tijekom 30-minutnog skeniranja (15 dvominutnih snimaka), životinjama je anestezija održavana 2%-tnim izofluranom putem maske za nos.

Dobivene PET slike analizirane su PMOD™ softverom (PMOD Technologies LLC, Švicarska) za biomedicinsku analizu. Za analizu mozga korišten je predložak atlasa mozga životinja dostupan u PMOD™ softveru. Deset regija odabrano je kod štakora kao regije od interesa te su detaljnije analizirane: 1) frontalna moždana kora (orbito-frontalna, frontalna i medijalno-prefrontalna), 2) parijetalna moždana kora (parijetalna, cingularna, motorička, retrosplenijalna, somatosenzorna i vizualna), 3) temporalna moždana kora (slušna, entorinalna i otočna), 4) hipokampus, 5) amigdala, 6) hipotalamus, 7) talamus, 8) moždano deblo, 9) mali mozak i 10) olfaktorni bulbus. U miševa su odabrane regije 1) moždana kora, 2) hipokampus, 3) amigdala, 4) hipotalamus, 5) talamus, 6) moždano deblo, 7) mali mozak, i 8) olfaktorni bulbus. Rezultati su izraženi kao aktivnost  $^{18}\text{F}$ FDG po volumenu tkiva [kBq/cc].



***Slika 14 Raytest ClearPET™ skener za male životinje Instituta Ruđer Bošković na kojem je provedeno in vivo mjerenje unosa  $^{18}\text{F}$ fluorodeoksiglukoze u stanice mozga.***

## **4.6. Intraperitonealni test tolerancije glukoze**

Za procjenu funkcije metabolizma glukoze u miševa proveden je intraperitonealni test tolerancije glukoze (ipGTT) nakon tretmana s galaktozom u oba pokusa na miševima. Postupak (417,418) je proveden na miševima koji su postili preko noći. Krv za mjerenje razine glukoze dobivena je zarezivanjem vrha repa sterilnim škarama. Intraperitonealnom injekcijom miševima je primijenjeno 2 g glukoze po kilogramu tjelesne mase (20%-tna otopina glukoze u fiziološkoj otopini). Razine glukoze u krvi izmjerene su pomoću glukometra Accu-Chek Performa i jednokratnih test traka (Roche, Švicarska) prije opterećenja i 15, 30, 45, 60 i 120 minuta nakon opterećenja glukozom.

## **4.7. Uzimanje i priprema uzoraka za analizu**

### **4.7.1. Uzimanje krvi i likvora**

Prilikom žrtvovanja, u sva su četiri pokusa životinje anestetizirane kombinacijom ketamina (50 mg/kg) i ksilazina (5 mg/kg; ip). Zatim je životinjama u dubokoj anesteziji iz retro-orbitalnog sinusa izvađena krv (otprilike 2 ml po štakoru i 500 µl po mišu). Izvađenim uzorcima krvi dodan je heparin (100-150 µl po uzorku; Belupo, Hrvatska) te inhibitor dipeptidil peptidaze-IV (DPP-IV; Sigma Aldrich, SAD) u omjeru 1:100. Uzorci pune krvi zatim su centrifugirani na 3600 okretaja u minuti (rpm) u trajanju 10 minuta te je izuzet supernatant, odnosno krvna plazma, koja je neposredno nakon centrifugiranja smrznuta na -20°C, odnosno -80°C za dugoročno čuvanje.

Uzorci likvora uzeti su samo štakorima, zbog poteškoća i nepouzdanosti uzimanja, te nedostatnih količina likvora u miševa. Štakori u dubokoj anesteziji pozicionirani su u odgovarajući položaj (Slika 15) te im je tankom iglom (BD Micro-Fine Plus 0,5 ml – 0,3 mm/30G x 8 mm ili 1,0 ml – 0,33 mm/29G x 12,7 mm; Becton, Dickinson and Company, SAD) iz prostora *cisterne magne* uzeto oko 100 µl likvora, koji je odmah pohranjen na -20°C, odnosno -80°C za dugoročno čuvanje.



*Slika 15 Postupak uzimanja likvora iz cisterne magne štakora u Pokusu 2.*

#### **4.7.2. Žrtvovanje**

Prije žrtvovanja, životinje su prema rezultatima kognitivnih testiranja unutar iste skupine ravnomjerno podijeljene u dvije skupine za žrtvovanje; četiri životinje po skupini predodređene su za postupak perfuzije fiksativom, a ostalih šest životinja namijenjeno je uzimanju svježih uzoraka mozga. Nakon uzimanja uzoraka krvi i likvora (samo u štakora), četiri životinje po skupini podvrgnute su je transkardijalnoj perfuziji u dubokoj anesteziji; nakon ispiranja organizma fiziološkom otopinom, tkivo se perfundira puferiranom otopinom 4%-tnog paraformaldehida (pH = 7,4). Po završetku perfuzije, životinjama je pažljivo odstranjen cijeli mozak. U svrhu krioprotekcije, mozgovi su dehidrirani serijskim otopinama saharoze; 15%-tna otopina saharoze u puferiranoj otopini 4%-tnog paraformaldehida i 30%-tna otopina saharoze u PBS puferu do potonuća mozga na dno posude. Nakon potonuća u 30%-tnoj otopini saharoze, mozgovi su spremljeni na  $-80^{\circ}\text{C}$  do daljnje histološke analize. Preostalih šest životinja po skupini nakon uzimanja uzoraka krvi i likvora (samo u štakora) žrtvovano je cervikalnom dislokacijom te im je odmah, na hladnoj podlozi izvađen mozak, koji je brzom disekcijom podijeljen na dvije hemisfere te su izdvojeni lijevi i desni hipokampusi. Uzorci hipokampusu odmah su smrznuti u tekućem dušiku i pohranjeni na  $-80^{\circ}\text{C}$ .

- *4%-tna otopina formaldehida:*

400 ml 10% paraformaldehyd (Sigma Aldrich, SAD) u  $\text{H}_2\text{O}$

600 ml 1M PBS pufer

pH 7,4

- *1M PBS pufer:*

9 g NaCl (T.T.T., Hrvatska)

0,2 g KCl (Kemika, Hrvatska)

1,13 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Kemika, Hrvatska)

H<sub>2</sub>O *ad* 1 L

pH 7,4

#### **4.7.3. Homogeniziranje tkiva**

Smrznuti uzorci hipokampusa lijeve hemisfere homogenizirani su u puferu za lizu stanica (engl. *lysis buffer*) s dodatkom koktela inhibitora proteaza (1:100; Sigma Aldrich, SAD) i fosfataza (1 tableta u 10 ml pufera; PhosStop, Roche, Švicarska). Homogeniziranje je provedeno trostrukim ultrazvučnim soniciranjem na ledu na uređaju Microson Ultrasonic Cell Disruptor (Misonix Inc., SAD). Nakon soniciranja, homogenati su centrifugirani 10 min na 12000 rpm te je supernatant izdvojen i spremljen u triplikatu na -80°C.

- *Pufer za lizu stanica:*

50 mM Trizma<sup>®</sup> baza, pH 8 (Sigma Aldrich, SAD)

150 mM NaCl (T.T.T., Hrvatska)

0,5 mM EDTA (Kemika, Hrvatska)

1 mM DTT (Fluka, SAD)

0,01 M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (Sigma Aldrich, SAD)

0,5% natrij deoksikolat (AppliChem, Njemačka)

1% NP-40 (Sigma Aldrich, SAD)

0,1% SDS (Sigma Aldrich, SAD)

#### 4.7.4. Mjerenje koncentracije proteina

Koncentracija proteina izmjerena je korištenjem metode po Lowry-u (419). Za mjerenje proteina koristi se 10  $\mu\text{L}$  uzorka za ispitivanje. Priređuju se standardi goveđeg serumskog albumina u klorovodičnoj kiselini (T.T.T., Hrvatska) (2, 1, 0,5 mg/ml BSA / 0,1 M HCl) te slijepa proba (0,1 M HCl). Priređuju se otopine A, B i C, gdje je C = 49 A : 1 B. Svakom se uzorku dodaje 2 mL otopine C. Deset minuta nakon dodavanja otopine C, uzorcima se dodaje otopina folin reagensa (200  $\mu\text{L}$ ). Nakon 30 minuta očitava se apsorbancija na 750 nm na spektrofotometru (Camspec, Velika Britanija; Iskra, Slovenija).

- *Otopina A:*

2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Kemika, Hrvatska)

0,1 M NaOH (Kemika, Hrvatska)

- *Otopina B:*

1%  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$  (Kemika, Hrvatska)

2%  $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \times 4 \text{H}_2\text{O}$  (Kemika, Hrvatska)

- *Folin reagens:*

1 mL Folin-Ciocalteu reagensa (Fluka, SAD)

2 mL  $\text{H}_2\text{O}$

#### 4.8. Biokemijske analize

Provedene biokemijske analize temelje se na različitim metodama pobliže opisanim u daljnjem tekstu, prema pojedinom ispitivanom analitu.

##### 4.8.1. Mjerenje koncentracije glukoze u plazmi i likvoru

Koncentracija glukoze u uzorcima mjerena je komercijalnim kolorimetrijskim kitom Glucose - GOD PAP (Greiner Diagnostic GmbH, Njemačka). Metoda se temelji na enzimskoj reakciji prethodno opisanoj u literaturi (420). Enzim glukoza oksidaza katalizira reakciju glukoze u glukonsku kiselinu uz otpuštanje vodikovog peroksida koji s fenolom i 4-aminoanitipirinom u



prisustvu peroksidaze daje crveno obojani produkt kinonimin čija se apsorbancija mjeri spektrofotometrom pri 500 nm. Koncentracija glukoze mjerena je u uzorcima plazme iz sva četiri pokusa, te uzorcima likvora iz Pokusa 1 i 2. Rezultati su izraženi u mmol/L glukoze.

#### **4.8.2. Mjerenje koncentracije galaktoze u plazmi i likvoru**

Koncentracija galaktoze u uzorcima mjerena je komercijalnim kitom Amplex<sup>®</sup> Red Galactose/Galactose Oxidase Kit (A22179; Invitrogen, SAD) (421). U tom kitu galaktoza oksidaza katalizira reakciju oksidacije galaktoze na C<sub>6</sub> ugljikovu atomu i pritom se stvara vodikov peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Nastali peroksid u prisustvu peroksidaze iz hrena (HRP) reagira u omjeru 1:1 s Amplex Red reagensom te stvara fluorescentno crveni oksidacijski produkt rezorufin, čiji je apsorbancijski maksimum na 560 nm. Očitanje fluorescencije provedeno je Infinite F200 PRO multimodal microplate reader čitačem mikropločica (Tecan, Švicarska). Deklarirana osjetljivost kita je 4 μM galaktoze. Postupak mjerenja rađen je prema protokolu proizvođača. Koncentracija galaktoze mjerena je u uzorcima plazme iz sva četiri pokusa, te uzorcima likvora iz Pokusa 1 i 2. Rezultati su izraženi kao μM galaktoze.

#### **4.8.3. Mjerenje koncentracije inzulina u plazmi i likvoru**

Koncentracija inzulina u uzorcima mjerena je komercijalnim kitom Rat / Mouse Insulin ELISA Kit (EZRFMI-13K; EMD Millipore Corporation, SAD) (422). U kitu je korištena metoda sendvič ELISA-e gdje se mjerenje temelji na vezanju molekula inzulina iz uzoraka na stijenke mikrotitarske pločice koja je prethodno prevučena monoklonskim protutijelom na inzulin te posljedičnim vezanjem biotiniziranih poliklonskih protutijela na vezane molekule inzulina. U sljedećim se koracima na imobilizirana biotinizirana protutijela vezuje HRP te se spektrofotometrijski mjeri aktivnost HRP-a u prisustvu 3, 3' 5, 5'-tetrametilbenzidina nakon zaustavljanja reakcije zakiseljavanjem klorovodičnom kiselinom, pri 450 nm na čitaču mikropločica. Izmjerena apsorbancija direktno je proporcionalna količini vezanog inzulina iz uzorka te se ekstrapolacijom iz dobivene standardne krivulje izračunavaju rezultati izraženi u ng/mL inzulina. Deklarirana osjetljivost kita je 0,1 ng/mL inzulina. Koncentracija inzulina mjerena je u uzorcima plazme iz sva četiri pokusa, te uzorcima likvora iz Pokusa 1 i 2.

#### **4.8.4. Mjerenje koncentracije ukupnog GLP-1 u plazmi i likvoru**

Koncentracija ukupnog GLP-1 u uzorcima mjerena je komercijalnim kitom GLP-1 Total ELISA Kit (EZGLP1T-36K; EMD Millipore Corporation, SAD) (423). U kitu je korištena metoda sendvič ELISA-e gdje se mjerenje temelji na vezanju molekula GLP-1 (7-36 i 9-36) iz uzoraka na stijenke mikrotitarske pločice koja je prethodno prevučena monoklonskim protutijelom na GLP-1 te posljedičnim vezanjem biotiniziranih poliklonskih protutijela na vezane molekule GLP-1. U sljedećim se koracima na imobilizirana biotinizirana protutijela vezuje HRP te se spektrofotometrijski mjeri aktivnost HRP-a u prisustvu 3, 3' 5, 5'-tetrametilbenzidina pri valnoj duljini od 450 nm, nakon zaustavljanja reakcije zakiseljavanjem klorovodičnom kiselinom. Izmjerena apsorbancija direktno je proporcionalna količini vezanog ukupnog GLP-1 iz uzorka te se ekstrapolacijom iz dobivene standardne krivulje izračunavaju rezultati izraženi u pM ukupnog GLP-1. Deklarirana osjetljivost kita je 1,5 pM ukupnog GLP-1. Koncentracija ukupnog GLP-1 mjerena je u uzorcima plazme iz sva četiri pokusa, te uzorcima likvora iz Pokusa 1 i 2.

#### **4.8.5. Mjerenje koncentracije aktivnog GLP-1 u plazmi**

Koncentracija aktivnog GLP-1 u uzorcima mjerena je komercijalnim kitom Glucagon-Like Peptide-1 (Active) ELISA Kit (EGLP-35K; EMD Millipore Corporation, SAD) (424). U kitu je korištena metoda koja se temelji na vezivanju aktivnih oblika GLP-1 [GLP-1 (7-36 amid) i GLP-1 (7-37)] N-terminalnom regijom na monoklonska protutijela vezana na mikrotitarsku pločicu. U sljedećim se koracima na imobilizirani aktivni oblik GLP-1 veže anti-GLP-1 konjugat za detekciju koji se kvantificira dodavanjem metil umbeliferil fosfatom, koji u prisustvu enzima alkalne fosfataze daje fluorescentni produkt umbeliferon. Izmjerena fluorescencija pri valnoj duljini ekscitacije/emisije 355/460 nm direktno je proporcionalna koncentraciji aktivnih oblika GLP-1 iz uzorka te se ekstrapolacijom iz dobivene standardne krivulje izračunavaju rezultati izraženi u pM aktivnog GLP-1. Deklarirana osjetljivost kita je 2 pM aktivnog GLP-1. Koncentracija aktivnog GLP-1 mjerena je samo u uzorcima plazme iz sva četiri pokusa, u koje je prilikom žrtvovanja dodan inhibitor DPP-IV. Razine aktivnog GLP-1 u likvoru bile su ispod granice osjetljivosti testa.

#### 4.8.6. Mjerenje koncentracije topivog amiloida $\beta$ u hipokampusu

Koncentracija topivog  $\beta$ -amiloida (1-42) ( $A\beta$ 1-42) u homogenatima hipokampusu mjerena je komercijalnim kitom Beta-Amyloid Peptide 1-42 (Ab1-42) ELISA Kit (abx258778; Abbexa Ltd, Velika Britanija) (425). U kitu je korištena metoda ELISA-e gdje se mjerenje temelji na kompetitivnom vezanju molekula  $A\beta$  na mikrotitarsku pločicu prevučenu protutijelom anti- $A\beta$ 1-42. Pokreće se reakcija kompetitivne inhibicije između biotinom obilježenog  $A\beta$ 1-42 i neobilježenog  $A\beta$ 1-42 iz uzorka za vezanje na protutijelo. Nakon ispiranja nevezanih konjugata, dodaje se avidinom konjugirani HRP te se spektrofotometrijski mjeri aktivnost HRP-a u prisustvu 3, 3' 5, 5'-tetrametilbenzidina pri valnoj duljini od 450 nm, nakon zaustavljanja reakcije zakiseljavanjem. Intenzitet nastalog žutog obojenja, odnosno izmjerene apsorbancije direktno je proporcionalan količini vezanog  $A\beta$ 1-42 iz uzorka te se ekstrapolacijom iz dobivene standardne krivulje izračunavaju rezultati izraženi u pg/mL. Deklarirana osjetljivost kita je 6,2 pg/mL. Koncentracija topivog  $A\beta$ 1-42 mjerena je u uzorcima hipokampusu šest životinja po grupi iz sva četiri pokusa.

#### 4.9. Western blot

Homogenizirani, centrifugirani uzorci hipokampusu kojima je prethodno izmjerena koncentracija proteina metodom po Lowry-u korišteni su za daljnju analizu Western blotom. Volumen uzorka ekvivalentan 35 (štakorski hipokampus), odnosno 25  $\mu$ g (mišji hipokampus) ukupnih proteina pomiješan je u omjeru 1:1 s puferom za uzorke (engl. *sample buffer*) kojem je dodan  $\beta$ -merkaptotanol. Nakon 10-minutnog kuhanja pripremljenih uzoraka pri 95°C, odnosno 70°C u slučaju detekcije transmembranskog proteina, isti se nanose u jažice na prethodno pripremljenom gelu za koncentriranje (engl. *stacking gel*; 3,9% poliakrilamidni gel), ispod kojeg se nalazi gel za razdvajanje (engl. *separating gel*; 9% poliakrilamidni gel) u puferu za razdvajanje (engl. *running buffer*). Uz uzorke se na gel nanosi i referentni standard (Precision Plus Protein™ Standard; Bio-Rad Laboratories, Inc., SAD) za lakšu identifikaciju proteina prema molekularnoj masi. Odvajanje proteina vrši se elektroforezom s fiksnim naponom pri 150 V, u trajanju od 60 do 90 min, ovisno o traženom proteinu, na aparaturi za Western blot Mini-PROTEAN Tetra cell (Bio-Rad Laboratories, Inc., SAD). Nakon razdvajanja, proteini se prenose na nitroceluloznu membranu (Amersham Protran 0.45; GE Healthcare Life Sciences, SAD) u puferu za prijenos (engl. *transfer buffer*) pri fiksnom naponu od 100 V, u trajanju od 60 minuta. Po završenom prijenosu, nitrocelulozna membrana kratko se vizualizira Ponceau

crvenilom radi potvrde ispravno provedene elektroforeze, odnosno prijenosa proteina, te fiksiranja proteina za membranu. Membrana se zatim ispiru puferom za ispiranje (engl. *low-salt washing buffer*; LSBW) i blokira radi sprječavanja nespecifičnog vezanja protutijela inkubacijom u trajanju 1 h pri sobnoj temperaturi u otopini za blokiranje. Blokirane membrane potom se inkubiraju preko noći pri 4°C u otopini za blokiranje u kojoj je otopljeno odgovarajuće protutijelo, u razrjeđenju kako slijedi:

- anti-GLP-1R zečje protutijelo (Bioss Inc., SAD), 1:1000
- anti-GLUT3 mišje protutijelo (Santa Cruz Biotechnology, Inc., SAD), 1:1000
- anti-GLUT4 zečje protutijelo (Sigma Aldrich, SAD), 1:200
- anti-IR mišje protutijelo (Sigma Aldrich, SAD), 1:1000
- anti-IDE zečje protutijelo (Sigma Aldrich, SAD), 1:1000
- anti-AT8 mišje protutijelo (Invitrogen, SAD), 1:500
- anti-total Tau mišje protutijelo (Cell Signaling Technology, Inc., SAD), 1:1000
- anti-phospho GSK3 $\beta$  zečje protutijelo (Cell Signaling Technology, Inc., SAD), 1:1000
- anti-GSK3 $\beta$  zečje protutijelo (Cell Signaling Technology, Inc., SAD), 1:1000

Nakon inkubacije s primarnim protutijelom, membrane se ispiru LSBW-om te se dalje inkubiraju odgovarajućim sekundarnim protutijelom [anti-mouse IgG za mišja, odnosno anti-rabbit IgG za zečja protutijela (Cell Signaling Technology, Inc., SAD), razrijeđeno 1:2000 u otopini za blokiranje] 1h pri sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije sa sekundarnim protutijelom, membrane se ispiru LSBW-om i inkubiraju u kemiluminiscentnom detekcijskom kitu (SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate; Thermo Fisher Scientific Inc., SAD) za vizualizaciju na MicroChemi kemiluminiscentnoj kameri (DNR Bio-Imaging Systems Ltd., Izrael). Membrane se zatim ponovno ispiru LSBW-om te se na prethodno opisani način preko noći na 4°C inkubiraju s primarnim protutijelom koje služi kako kontrola nanošenja uzoraka (anti- $\beta$  aktin mišje protutijelo 1:5000, Sigma Aldrich, SAD; ili anti- $\beta$  tubulin zečje protutijelo 1:1000, Cell Signaling Technology, Inc., SAD). Idući se dan ponavlja postupak inkubacije sa sekundarnim protutijelom i vizualizacije kemiluminiscentnom kamerom.

- *Pufer za uzorke (sample buffer):*

2 mL glicerol (Fluka, SAD)

0,6 g natrij dodecil sulfat (SDS; Sigma Aldrich, SAD)

2,5 mL 0,1 M Trizma® baza, pH 6,7

3 mg bromfenol modriilo (Sigma Aldrich, SAD)

6 mL ddH<sub>2</sub>O

- *Gel za koncentriranje 3,9% poliakrilamida (stacking gel), za 4 gela:*

2,5 mL 0,4% SDS u 0,5 M Trizma<sup>®</sup> HCl, pH 6,8 (Sigma Aldrich, SAD)

1,3 mL 30% akrilamid / 0,8% bisakrilamid (Sigma Aldrich, SAD)

140 µL 10% amonij persulfat (Sigma Aldrich, SAD)

10 µL N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (TEMED; Sigma Aldrich, SAD)

6,1 mL ddH<sub>2</sub>O

- *Gel za razdvajanje 9% poliakrilamida (separating gel), za 4 gela:*

5 mL 0,4% SDS u 1,5 M Trizma<sup>®</sup> HCl, pH 8,8

6 mL 30% akrilamid / 0,8% bisakrilamid

240 µL 10% amonij persulfat

13,2 µL TEMED

8,6 mL ddH<sub>2</sub>O

- *Pufer za razdvajanje (running buffer):*

10 mL 10% SDS

3 g Trizma<sup>™</sup> baza

11,52 g glicin (Sigma Aldrich, SAD)

dH<sub>2</sub>O *ad* 1 L

- *10x pufer za prijenos (transfer buffer):*

105 g glicin

22,32 g Trizma<sup>™</sup> baza

dH<sub>2</sub>O *ad* 1 L

- *1x pufer za prijenos:*

100 mL 10x pufera za prijenos  
200 mL metanol (T.T.T., Hrvatska)

dH<sub>2</sub>O *ad* 1 L

- *Pufer za ispiranje (LSWB):*

8,766 g NaCl

1,211 g Trizma™ baza

dH<sub>2</sub>O *ad* 1 L

pH 7,5

- *Otopina za blokiranje:*

1 g nemasno mlijeko u prahu (Dukat d.d., Hrvatska)

20 mL LSBW

100 µL Tween® 20 (Sigma Aldrich, SAD)

- *Ponceau crvenilo:*

0,1 g Ponceau S (Sigma Aldrich, SAD)

100 mL 5% octena kiselina (T.T.T., Hrvatska)

#### **4.10. Imunohistokemija**

Zaleđeni perfundirani mozgovi iz sva četiri pokusa upotrijebljeni su za imunofluorescencijsku analizu. Središnji dio mozga uklopljen u Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound (Sakura Finetek Europe B.V., Nizozemska) korišten je za rezanje prereza debljine 16 µm kriostatom Leica CM1850 (Leica Biosystems Nussloch GmbH, SAD). Dobiveni prerezi isprani su 3x5 min u otopini PBS pufera s dodatkom deterdženta 0,25% Triton™ X-100 (Sigma Aldrich, SAD). Uzorci su zatim blokirani u otopini 10% normalnog kozjeg seruma (NGS; Vector Laboratories Inc., SAD) u PBS-T-u, 1 h pri sobnoj temperaturi. Nakon blokiranja nespecifičnih veznih mjesta, na prereze je nanijeto primarno protutijelo razrijeđeno u 1% NGS u PBS-T-u, u razrjeđenju 1:500. Korištena su primarna protutijela za detekciju fosforiliranog proteina tau

(anti-AT8), GLP-1 receptora (anti-GLP-1R), astrocita prema ekspresiji kiselog vlaknastog proteina glije (anti-GFAP; Sigma Aldrich, SAD) te neurona prema ekspresiji NeuN proteina (anti-NeuN; Sigma Aldrich, SAD). Inkubacija u primarnom protutijelu odvijala se preko noći na 4°C. Nakon ponovnog ispiranja 3x5 min u puferu, na prezeze je nanijeto sekundarno fluorescirajuće protutijelo ovisno o životinji domaćinu primarnog protutijela (anti-rat IgG (H+L), Alexa Fluor® 555 Conjugate, anti-mouse IgG (H+L), Alexa Fluor® 555 Conjugate, anti-rat IgG (H+L), Alexa Fluor® 488 Conjugate, anti-mouse IgG (H+L), Alexa Fluor® 488 Conjugate; Cell Signaling Technology, Inc., SAD) i inkubirano 2h pri sobnoj temperaturi. Prezezi su zatim ponovno isprani u puferu 3x5min te su nakon sušenja pokriveni pokrovnim stakalcem uz Fluoromount-G™ Mounting Medium, with DAPI (Invitrogen, SAD). Vizualizacija i analiza prezeza provedena je na fluorescentnom mikroskopu Olympus BX51 uz pripadajući računalni softver CellSense Dimension (Olympus Corporation, Japan).

#### **4.11. Statistička analiza i obrada podataka**

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD). Denzitometrijska analiza vizualiziranih Western blot membrana provedena je softverom ImageJ (National Institutes of Health, SAD). Rezultati kognitivnih i bihevioralnih testova, izmjerenih biokemijskih parametara i ekspresije proteina izmjerene Western blotom obrađeni su primjerenim neparametrijskim testovima Kruskal-Wallis ANOVA median testom za istovremenu usporedbu više od dviju grupe te Mann-Whitney U-testom ili Wilcoxon signed rank testom za međusobnu usporedbu dviju grupa, uz odabranu razinu značajnosti \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Longitudinalni podaci intraperitonealnog testa tolerancije glukoze i MWM testa plivanja analizirani su two-way ANOVA testom za ponovljena mjerenja ili modelom miješanih učinaka (*mixed-effect analysis*) s Tukey post-hoc testom, uz jednake razine značajnosti. Za analizu i prikaz rezultata korišteni su program GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, SAD) i programski jezik i programsko okruženje R (The R Foundation for Statistical Computing, Austrija).

## 5. REZULTATI

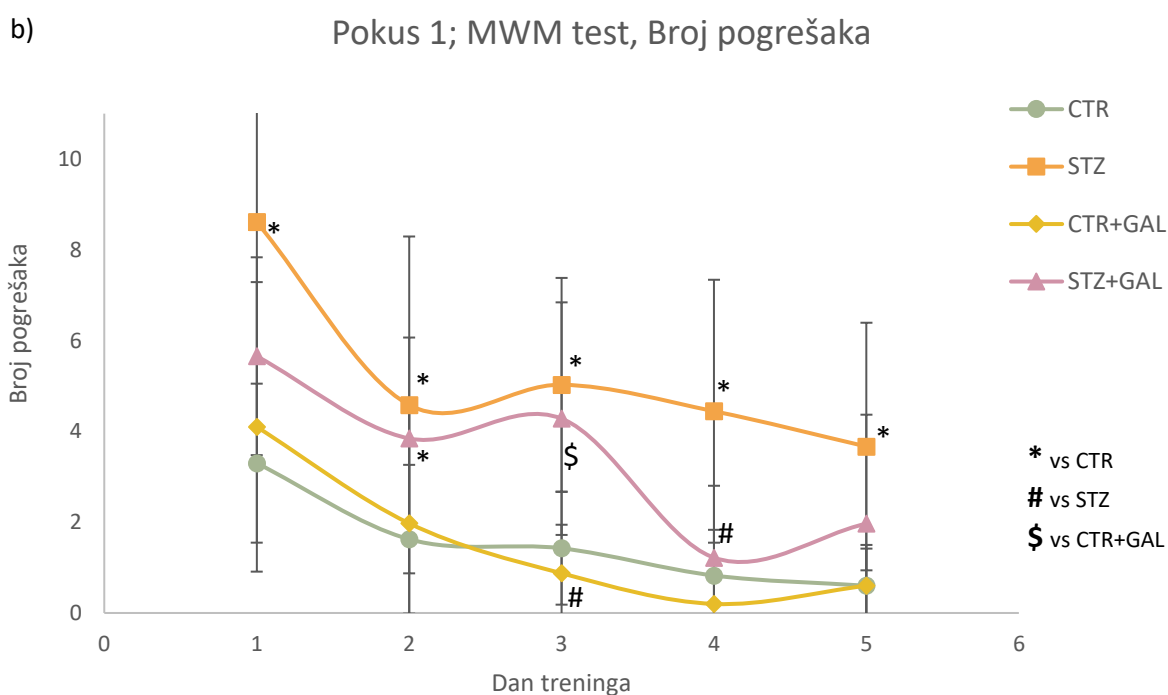
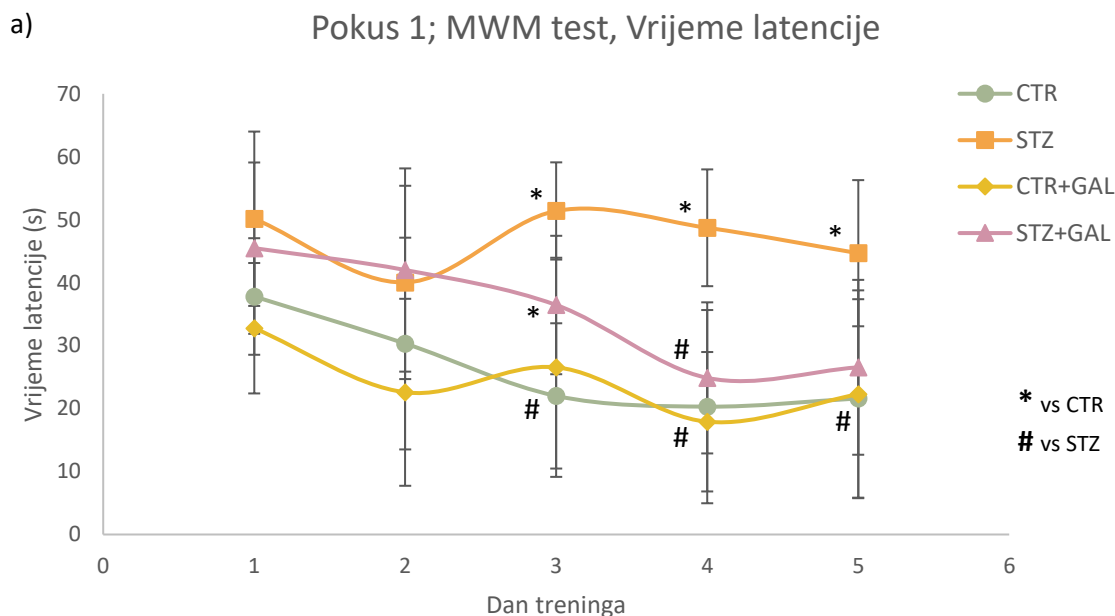
### 5.1. Rezultati Pokusa 1 i 2; učinak peroralno primijenjene galaktoze u štakorskom modelu sporadičnog oblika bolesti

#### 5.1.1. Kognitivni i bihevioralni učinci

U Pokusu 1, tri mjeseca nakon primjene STZ-icv, tretirane životinje (STZ) su razvile kognitivni deficit mjeran u *Morris Water Maze* testu plivanja u labirintu (MWM). Tijekom pet dana treninga, STZ životinjama trebalo je više vremena za pronalazak skrivenog postolja u usporedbi s kontrolnim životinjama (CTR) tretiranim citratnim puferom, što je pokazano značajno duljim vremenom latencije ( $p < 0,05$  od 3. do 5. dana; +134%-140%-107%; Slika 16a) i većim brojem pogrešnih ulazaka u kvadrante ( $p < 0,05$  od 1. do 5. dana; 161%-182%-253%-439%-511%; Slika 16b), ukazujući na oštećeno prostorno pamćenje i sposobnost učenja. Deficit u retenciji prostornog pamćenja manifestiran je kao smanjeno vrijeme zadržavanja u ciljnom kvadrantu šesti dan ispitivanja (*probe trial*) (-47% STZ vs. CTR,  $p=0,008$ ; Slika 17). STZ životinje pokazale su i oštećenje strahom uvjetovane retencije pamćenja u testu pasivnog izbjegavanja (PAT) u odnosu na kontrolne životinje, očitovano kraćom post-šok latencijom (-86%,  $p < 0.001$ ; Slika 18).

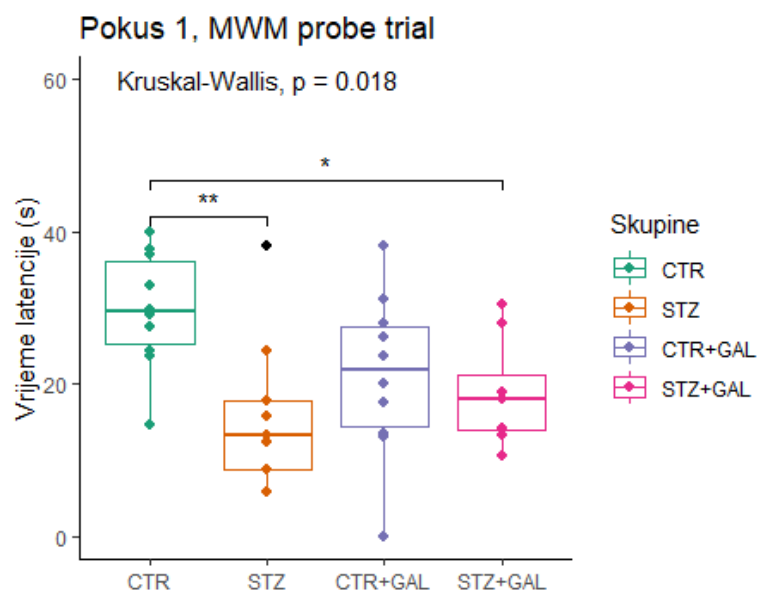
Tretman oralnom galaktozom u trajanju od dva mjeseca pokazao je trend skraćivanja vremena za pronalazak platforme (statistički značajna razlika 4. dan,  $p=0,017$ ; Slika 16a) i ulazaka u pogrešne kvadrante (statistički značajna razlika 4. dan,  $p=0,017$ ; Slika 16b) u STZ+GAL životinja u odnosu na STZ tijekom pet dana treninga, dok je šesti dan ispitivanja vrijeme zadržavanja STZ+GAL životinja u ciljnom kvadrantu bilo 20% dulje, iako nije doseglo statističku značajnost (Slika 17). Blagotvorni učinak oralne galaktoze pokazan je u strahom uvjetovanom pamćenju u PAT-u, gdje su STZ+GAL životinje imale značajno dulju post-šok latenciju (+341%,  $p=0,004$ ; Slika 18).





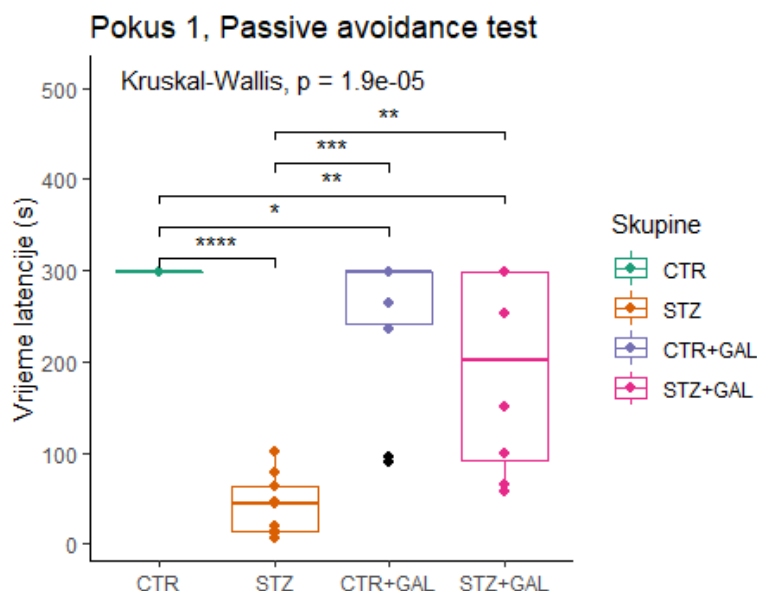
**Slika 16 Učenje u Morris Water Maze testu plivanja u labirintu u štakora u Pokusu 1.**

Svaka točka u grafu predstavlja vrijednost pojedine grupe ((a) vrijeme do pronalaska platforme te (b) broj prelazaka u pogrešne kvadrante) izraženu kao srednja vrijednost  $\pm$  SD tijekom pet dana učenja u MWM testu. CTR = kontrolne životinje; STZ = STZ-icv tretirane životinje; CTR+GAL = kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; STZ+GAL = STZ-icv tretirane životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom. Statistička značajnost za pojedinu skupinu u određenoj vremenskoj točki označena je različitim simbolima ovisno o grupi s kojom se data skupina uspoređuje: \*  $p < 0,05$  u usporedbi s CTR; #  $p < 0,05$  u usporedbi sa STZ; \$  $p < 0,05$  u usporedbi s CTR+GAL.  $N=10$  (CTR), 9 (STZ), 10 (CTR+GAL), 8 (STZ+GAL). Podaci su transformirani po prirodnom logaritmu kako bi zadovoljili uvjete normalnosti te analizirani two-way ANOVA testom za ponovljena mjerenja uz Tukey post-hoc test za međusobnu analizu skupina u datom danu treninga.



**Slika 17 Probe trial Morris Water Maze testa plivanja u labirintu u štakora u Pokusu 1.**

Svaki box-plot dijagram prikazuje odnos minimuma, maksimuma, donjega i gornjega kvartila te medijana vremena provedenog u traženom kvadrantu šesti dan MWM ispitivanja, dok točke na dijagramu predstavljaju pojedine vrijednosti životinje, a crno obojene točke predstavljaju vrijednosti s najvećim odstupanjem pojedine grupe (outlieri). CTR = kontrolne životinje; STZ = STZ-icv tretirane životinje; CTR+GAL = kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; STZ+GAL = STZ-icv tretirane životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom.  $N=10$  (CTR), 9 (STZ), 10 (CTR+GAL), 8 (STZ+GAL). Podaci su obrađeni Kruskal-Wallis neparametrijskim one-way ANOVA testom s Wilcoxon signed rank post-hoc testom za međusobnu analizu skupina. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

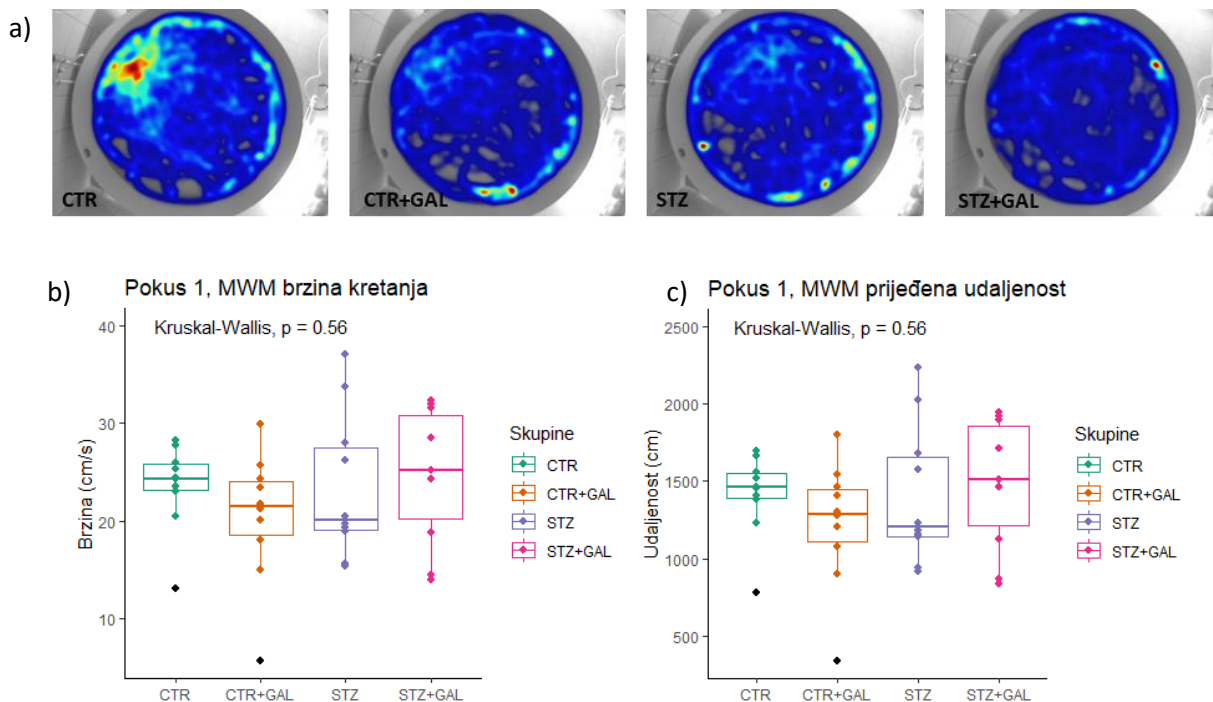


**Slika 18 Passive avoidance test strahom uvjetovanog učenja u štakora u Pokusu 1.**

Svaki box-plot dijagram prikazuje odnos minimuma, maksimuma, donjega i gornjega kvartila te medijana vremena latencije, dok točke na dijagramu predstavljaju pojedine vrijednosti životinje, a crno obojene točke predstavljaju vrijednosti s najvećim odstupanjem pojedine grupe (outlieri). CTR =

kontrolne životinje; STZ = STZ-icv tretirane životinje; CTR+GAL = kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; STZ+GAL = STZ-icv tretirane životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom. N=10 (CTR), 9 (STZ), 10 (CTR+GAL), 8 (STZ+GAL). Podaci su obrađeni Kruskal-Wallis neparametrijskim one-way ANOVA testom s Wilcoxon signed rank post-hoc testom za međusobnu analizu skupina. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

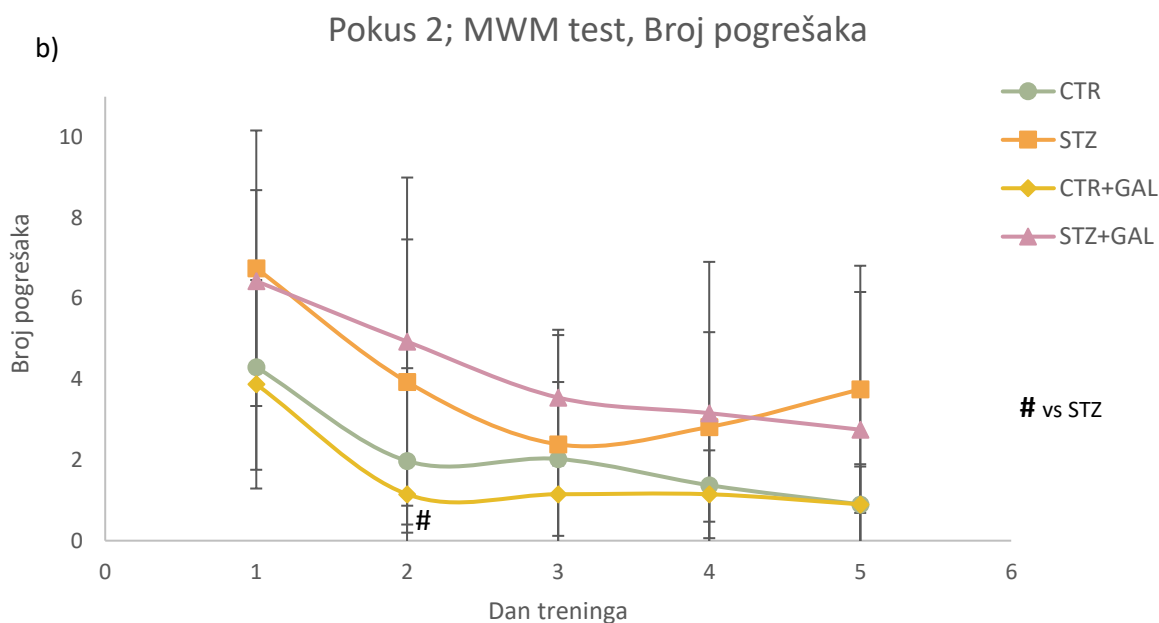
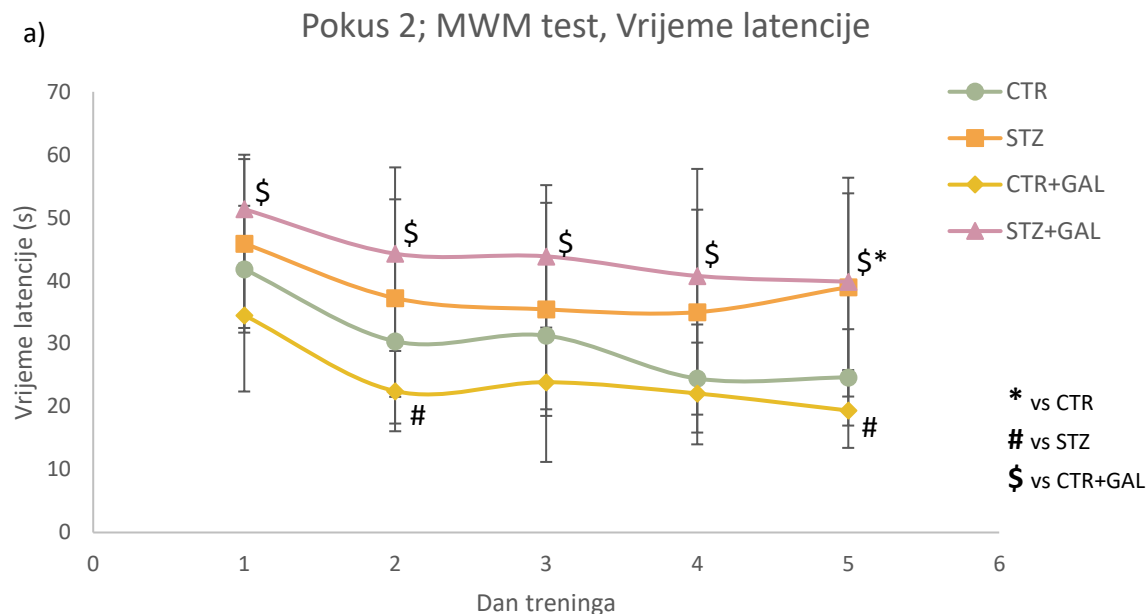
Aktivnost štakora u Pokusu 1 nije se značajnije razlikovala među ispitivanim skupinama, što je razvidno iz toplinskih karti (Slika 19a), kao i iz analize brzine kretanja (Slika 19b) i ukupno prijeđene udaljenosti (Slika 19c) u bazenu 6. dan ispitivanja MWM testa.



**Slika 19 Aktivnost štakora u Morris Water Maze bazenu u Pokusu 1.**

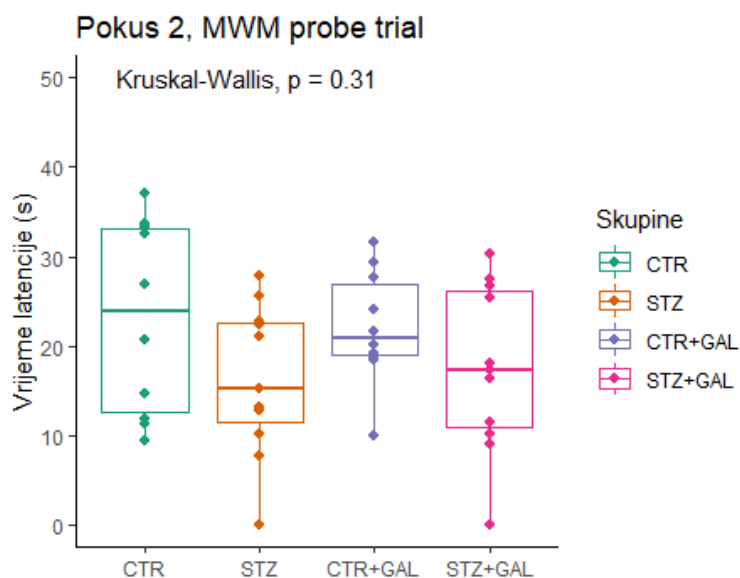
(a) Toplinske karte izrađene su preklapanjem putanja kretanja svake životinje u pojedinoj skupini tijekom 6. dana ispitivanja u MWM-u pomoću softverske platforme Noldus EthoVision XT. Svaki box-plot dijagram prikazuje odnos minimuma, maksimuma, donjega i gornjega kvartila te medijana (b) brzine kretanja u MWM-u 6. dana ispitivanja, odnosno (c) ukupno prijeđene udaljenosti u MWM-u 6. dana ispitivanja, dok točke na dijagramu predstavljaju pojedine vrijednosti životinje, a crno obojene točke predstavljaju vrijednosti s najvećim odstupanjem pojedine grupe (outlieri). CTR = kontrolne životinje; STZ = STZ-icv tretirane životinje; CTR+GAL = kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; STZ+GAL = STZ-icv tretirane životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom. N=10 (CTR), 9 (STZ), 10 (CTR+GAL), 8 (STZ+GAL). Podaci su obrađeni Kruskal-Wallis neparametrijskim one-way ANOVA testom s Wilcoxon signed rank post-hoc testom za međusobnu analizu skupina.

U Pokusu 2 dvomjesečni tretman oralnom galaktozom nije rezultirao poboljšanjem prostornog pamćenja mjenog MWM testom (Slika 20, Slika 21) kao ni strahom uvjetovanog pamćenja mjenog PAT-om (Slika 22).



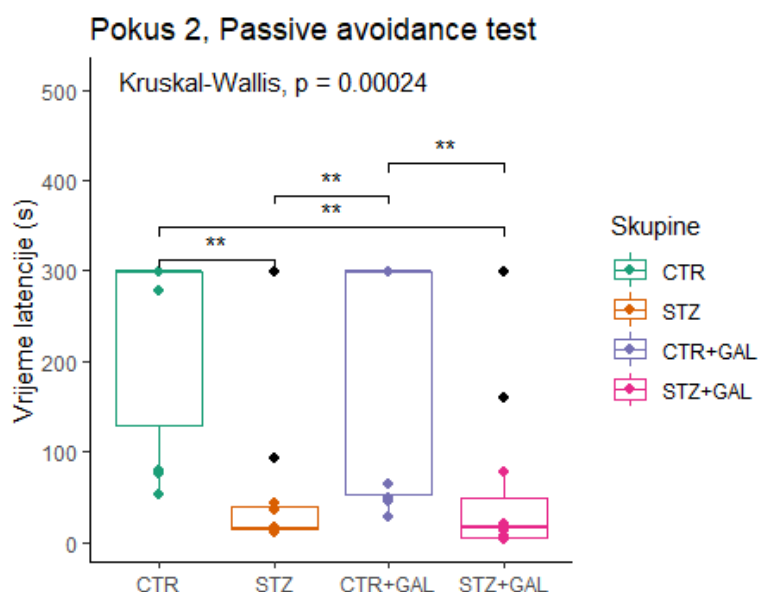
**Slika 20 Učenje u Morris Water Maze testu plivanja u labirintu u štakora u Pokusu 2.**

Svaka točka u grafu predstavlja vrijednost pojedine grupe ((a) vrijeme do pronalaska platforme te (b) broj prelazaka u pogrešne kvadrante) izraženu kao srednja vrijednost  $\pm$  SD tijekom pet dana učenja u MWM testu. CTR = kontrolne životinje; STZ = STZ-icv tretirane životinje; CTR+GAL = kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; STZ+GAL = STZ-icv tretirane životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom. Statistička značajnost za pojedinu skupinu u određenoj vremenskoj točki označena je različitim simbolima ovisno o grupi s kojom se data skupina uspoređuje: \*  $p < 0,05$  u usporedbi s CTR; #  $p < 0,05$  u usporedbi sa STZ; \$  $p < 0,05$  u usporedbi s CTR+GAL.  $N=10$  (CTR, CTR+GAL),  $11$  (STZ, STZ+GAL). Podaci su transformirani po prirodnom logaritmu kako bi zadovoljili uvjete normalnosti te analizirani (a) two-way ANOVA testom za ponovljena mjerenja, odnosno (b) modelom miješanih učinaka (mixed-effect analysis) uz Tukey post-hoc test za međusobnu analizu skupina u datom danu treninga.



**Slika 21 Probe trial Morris Water Maze testa plivanja u labirintu u štakora u Pokusu 2.**

Svaki box-plot dijagram prikazuje odnos minimuma, maksimuma, donjega i gornjega kvartila te medijana vremena provedenog u traženom kvadrantu šesti dan MWM ispitivanja, dok točke na dijagramu predstavljaju pojedine vrijednosti životinje. CTR = kontrolne životinje; STZ = STZ-icv tretirane životinje; CTR+GAL = kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; STZ+GAL = STZ-icv tretirane životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom.  $N=10$  (CTR, CTR+GAL),  $11$  (STZ, STZ+GAL). Podaci su obrađeni Kruskal-Wallis neparametrijskim one-way ANOVA testom s Wilcoxon signed rank post-hoc testom za međusobnu analizu skupina.

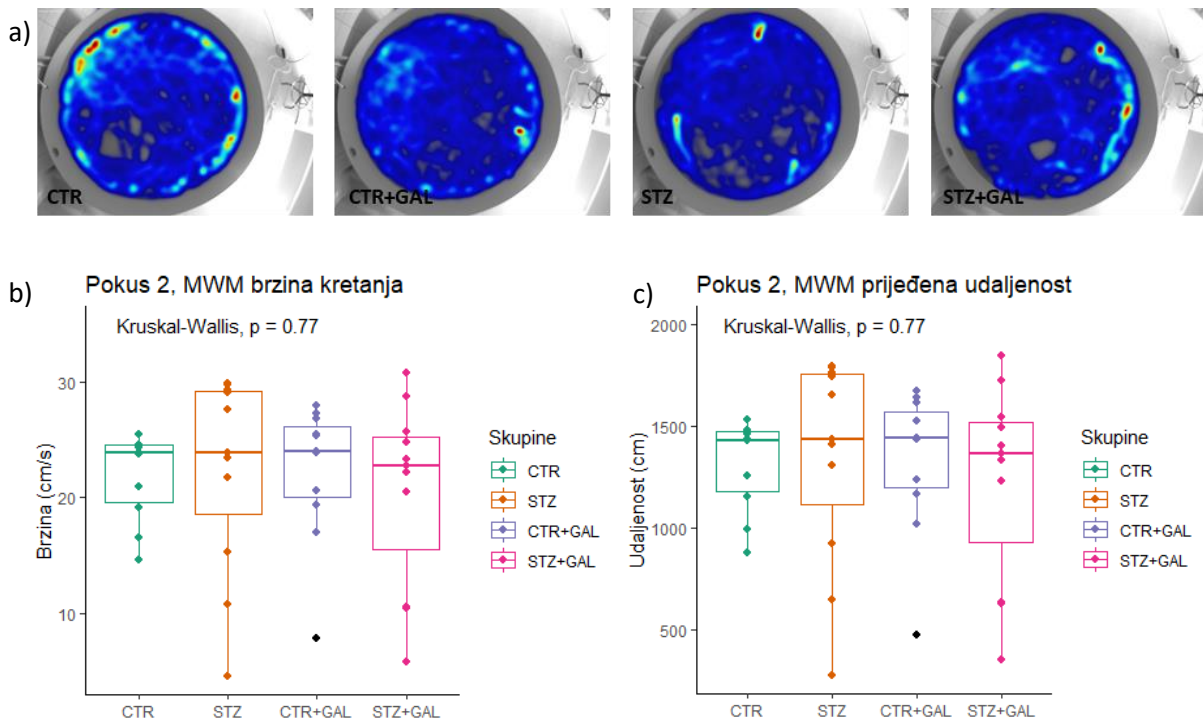


**Slika 22 Passive avoidance test strahom uvjetovanog učenja u štakora u Pokusu 2.**

Svaki box-plot dijagram prikazuje odnos minimuma, maksimuma, donjega i gornjega kvartila te medijana vremena latencije, dok točke na dijagramu predstavljaju pojedine vrijednosti životinje, a crno obojene točke predstavljaju vrijednosti s najvećim odstupanjem pojedine grupe (outlieri). CTR = kontrolne životinje; STZ = STZ-icv tretirane životinje; CTR+GAL = kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; STZ+GAL = STZ-icv tretirane životinje koje su primile

dvomjesečni tretman oralnom galaktozom.  $N=10$  (CTR, CTR+GAL), 11 (STZ, STZ+GAL). Podaci su obrađeni Kruskal-Wallis neparametrijskim one-way ANOVA testom s Wilcoxon signed rank post-hoc testom za međusobnu analizu skupina. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

Ispitivane skupine nisu se značajnije razlikovale u aktivnosti u bazenu MWM-a, kako u brzini kretanja u bazenu (Slika 23b), tako i u ukupno prijeđenoj udaljenosti (Slika 23c), što je također vidljivo iz toplinskih karti kretanja u bazenu (Slika 23a).



### Slika 23 Aktivnost štakora u Morris Water Maze bazenu u Pokusu 2.

(a) Toplinske karte izrađene su preklapanjem putanja kretanja svake životinje u pojedinoj skupini tijekom 6. dana ispitivanja u MWM-u pomoću softverske platforme Noldus EthoVision XT.

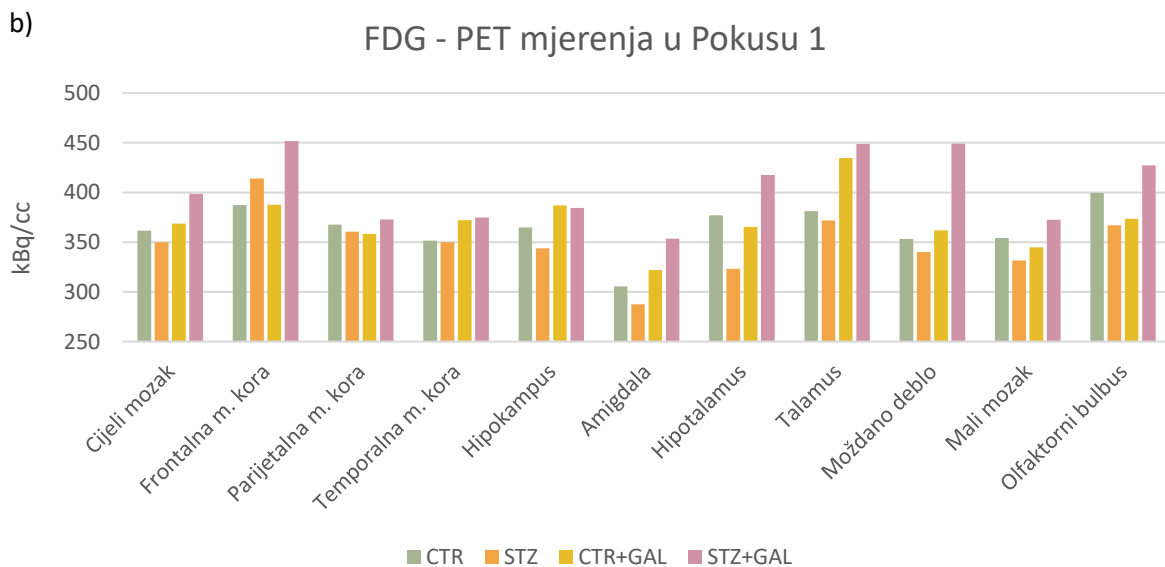
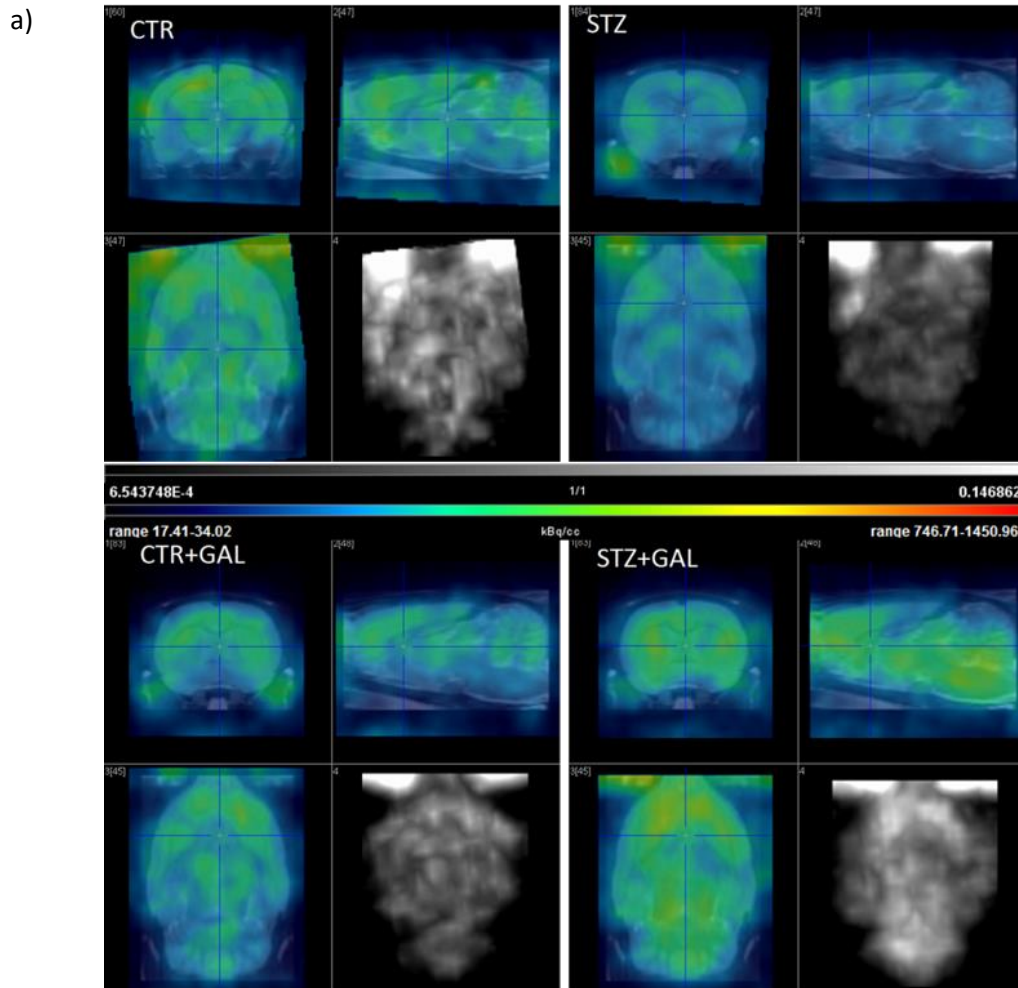
Svaki box-plot dijagram prikazuje odnos minimuma, maksimuma, donjega i gornjega kvartila te medijana (b) brzine kretanja u MWM-u 6. dana ispitivanja, odnosno (c) ukupno prijeđene udaljenosti u MWM-u 6. dana ispitivanja, dok točke na dijagramu predstavljaju pojedine vrijednosti životinje, a crno obojene točke predstavljaju vrijednosti s najvećim odstupanjem pojedine grupe (outlieri). CTR = kontrolne životinje; STZ = STZ-icv tretirane životinje; CTR+GAL = kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; STZ+GAL = STZ-icv tretirane životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom.  $N=10$  (CTR, CTR+GAL), 11 (STZ, STZ+GAL). Podaci su obrađeni Kruskal-Wallis neparametrijskim one-way ANOVA testom s Wilcoxon signed rank post-hoc testom za međusobnu analizu skupina.

### 5.1.2. FDG-PET mjerenja

Unos glukoze u stanice mozga mjeren je FDG-PET skeniranjem u 2 životinje po skupini, koje su odabrane kao reprezentativne temeljem rezultata kognitivnih ispitivanja, odnosno, odabrane su životinje koje najbolje predstavljaju prosječnu vrijednost ispitivane skupine.

U Pokusu 1, STZ životinje pokazale su općenito manji intenzitet unosa FDG-a u stanice mozga u usporedbi s kontrolnim životinjama, što je vidljivo iz reprezentativnih FDG-PET slika (Slika 24a). Kvantifikacija unosa FDG-a u stanice mozga slijedila je obrazac prikazan na slikama te je pokazala povećanje (+14%) metabolizma glukoze u cijelom mozgu nakon dvomjesečnog tretmana oralnom galaktozom u STZ+GAL životinja u odnosu na STZ. U odabranim regijama mozga taj je učinak bio najistaknutiji u moždanom deblu (+32%) i hipotalamusu (+29%) te u amigdali (+23%) i talamusu (+21%), a u manjoj mjeri i u frontalnoj moždanoj kori, hipokampusu i malom mozgu (Slika 24b). Smanjenje metabolizma glukoze u STZ skupini u odnosu na CTR na razini cijelog mozga bilo je blago (-3%) zbog razlika u metabolizmu u pojedinim regijama: smanjenje metabolizma u hipotalamusu (-14%), olfaktornom bulbusu (-8%), malom mozgu (-6%), hipokampusu (-6%) i moždanom deblu (-4%), ali povećanje metabolizma u frontalnoj moždanoj kori (+7%) i gotovo jednakim vrijednostima u parijetalnoj i temporalnoj kori (Slika 24b). U kontrolnih štakora terapija oralnom galaktozom nije dovela do razlike u metabolizmu glukoze na razini čitavog mozga, ali je bilo pojedinih regionalnih razlika poput povećanja metabolizma u talamusu (+14%), hipokampusu i temporalnoj moždanoj kori (+6%) te amigdali (+5%), i smanjenja u olfaktornom bulbusu (-7%) (Slika 24b).





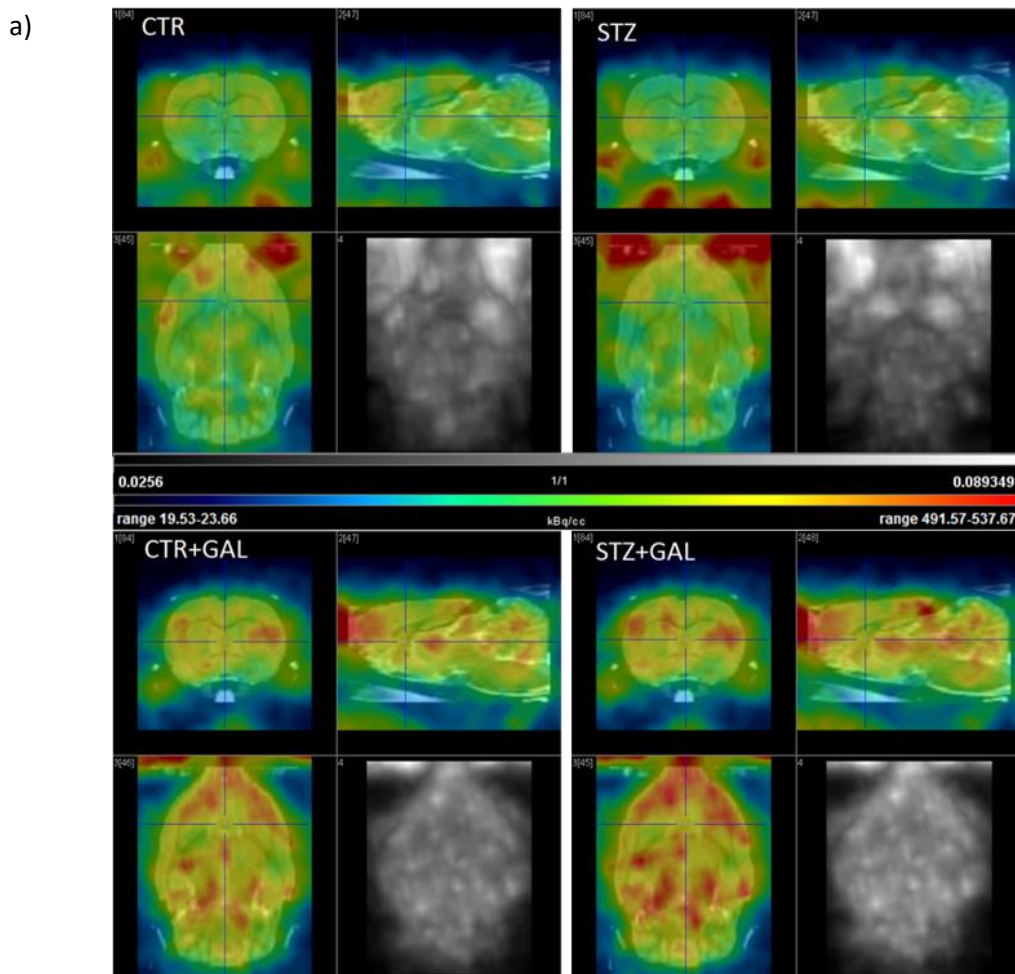
**Slika 24** Pozitronska emisijska tomografija (PET) unosa radioaktivno obilježenog analoga glukoze fluorodeoksiglukoze (FDG) u mozgu štakora u Pokusu 1.

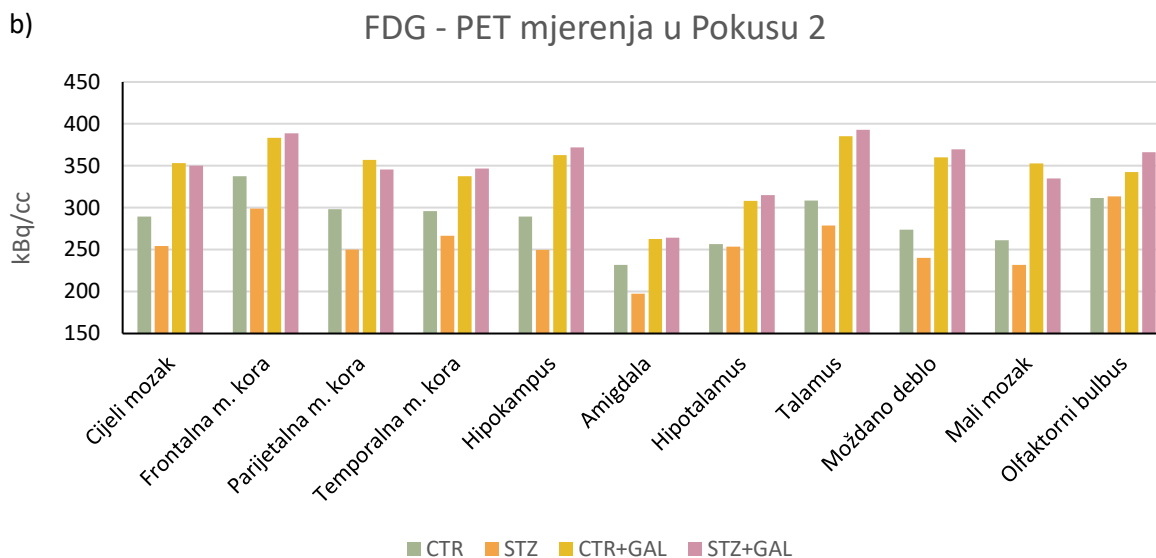
(a) Reprezentativne slike PET skeniranja; (b) odabrane regije od interesa analizirane su PMOD™ softverom za analizu unosa glukoze/stope metabolizma. Svaki stupac predstavlja srednju vrijednost izračunate količine kilobekerela po kubičnom centimetru (kBq/cc) cijelog mozga ili pojedine regije. CTR



= kontrolne životinje; STZ = STZ-icv tretirane životinje; CTR+GAL = kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; STZ+GAL = STZ-icv tretirane životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom. N=2.

U Pokusu 2 promjene metabolizma glukoze u mozgu bile su izraženije nego u Pokusu 1 (Slika 25a). Metabolizam glukoze u STZ skupini na razini cijelog mozga bio je 12% manji u odnosu na CTR, s najizraženijim razlikama u frontalnoj moždanoj kori (-16%), amigdali (-15%) i hipokampusu (-14%) (Slika 25b). Dvomjesečna terapija oralnom galaktozom popravila je hipometabolizam STZ životinja na vrijednosti više od kontrolnih, pa je na razini cijelog mozga unos glukoze bio 38% viši (STZ+GAL vs. STZ), s najizraženijim razlikama u moždanom deblu (54%), hipokampusu (+50%), malom mozgu (+44%) i talamusu (+41%) (Slika 25b). Kontrolne životinje koje su primile galaktozu također su pokazale povišeni unos glukoze, i to 22% na razini cijelog mozga, s najvećim promjenama u malom mozgu (+35%), moždanom deblu (+32%), hipokampusu i talamusu (+25%) (Slika 25b).





**Slika 25 Pozitronska emisijska tomografija (PET) unosa radioaktivno obilježenog analoga glukoze fluorodeoksiglukoze (FDG) u mozgu štakora u Pokusu 2.**

(a) Reprezentativne slike PET skeniranja; (b) odabrane regije od interesa analizirane su PMOD™ softverom za analizu unosa glukoze/stope metabolizma. Svaki stupac predstavlja srednju vrijednost izračunate količine kilobekera po kubičnom centimetru (kBq/cc) cijelog mozga ili pojedine regije. CTR = kontrolne životinje; STZ = STZ-icv tretirane životinje; CTR+GAL = kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; STZ+GAL = STZ-icv tretirane životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom. N=2.

### 5.1.3. Biokemijski parametri

Biokemijske parametre izmjerene u Pokusu 1 prikazuje Tablica 5. Statistički značajne razlike izmjerene su u razini glukoze u plazmi, gdje je dvomjesečna terapija oralnom galaktozom snizila razine glukoze u kontrolnih životinja (-26% CTR+GAL vs. CTR,  $p=0,001$ ) kao i u životinja tretiranih STZ-icv (-26% STZ+GAL vs. STZ,  $p=0,036$ ). S druge strane, razine glukoze u likvoru bile su značajno povišene u STZ-icv tretiranih životinja na terapiji oralnom galaktozom (+15% STZ+GAL vs. STZ,  $p=0,019$ ). Tretman oralnom galaktozom utjecao je na smanjenje razina ukupnog GLP-1 u likvoru u kontrolnih životinja (-30% CTR+GAL vs. CTR,  $p=0,009$ ) kao i aktivnog oblika GLP-1 u plazmi (-80% CTR+GAL vs. CTR,  $p < 0,001$ ). Aktivni oblik GLP-1 bio je snižen i u STZ-icv životinja u odnosu na kontrolne (-51% STZ vs. CTR,  $p=0,003$ ), dok je tretman oralnom galaktozom rezultirao povišenjem aktivnog GLP-1 (+70% STZ+GAL vs. STZ,  $p=0,028$ ).

**Tablica 5** Izmjereni biokemijski parametri iz uzoraka krvne plazme, likvora i hipokampusa štakora u Pokusu 1.

	CTR	STZ	CTR+GAL	STZ+GAL
glukoza (plazma)	7,17 ± 1,16 N=9	6,85 ± 1,75 N=10	5,29 ± 0,90 * N=10	5,10 ± 1,39 ** N=10
glukoza (likvor)	4,89 ± 0,47 N=10	5,06 ± 0,41 N=10	5,26 ± 0,58 N=10	5,82 ± 0,69 ** N=8
galaktoza (plazma)	26,12 ± 11,99 N=10	25,45 ± 8,66 N=10	22,07 ± 4,68 N=10	19,26 ± 3,26 * N=10
galaktoza (likvor)	49,59 ± 27,90 N=9	44,57 ± 25,52 N=10	37,62 ± 18,45 N=8	35,98 ± 22,17 N=6
inzulin (plazma)	8,75 ± 2,00 N=10	8,50 ± 1,11 N=10	8,84 ± 1,15 N=10	8,36 ± 1,98 N=10
inzulin (likvor)	0,77 ± 1,54 N=10	0,34 ± 0,29 N=10	0,22 ± 0,13 N=10	0,29 ± 0,10 N=8
GLP-1 (plazma)	7,87 ± 3,72 N=9	8,02 ± 3,14 N=10	6,21 ± 2,58 N=10	9,84 ± 5,13 N=10
aGLP-1 (plazma)	1,66 ± 0,45 N=8	0,81 ± 0,70 * N=10	0,34 ± 0,10 ** N=8	1,38 ± 0,50 **\$ N=9
GLP-1 (likvor)	2,20 ± 0,66 N=10	1,93 ± 0,89 N=10	1,53 ± 0,41 * N=10	1,93 ± 0,95 N=8
Aβ (hipokampus)	3,51 ± 0,62 N=5	4,02 ± 0,72 N=6	3,69 ± 0,32 N=5	4,50 ± 0,90 \$ N=6

Podaci su izraženi kao srednja vrijednost ± SD. CTR – kontrolne životinje; STZ – STZ-icv tretirane životinje; CTR+GAL – kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; STZ+GAL – STZ-icv tretirane životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; GLP-1 – glukagonu sličan peptid 1; aGLP-1 – aktivni oblik GLP-1; Aβ – amiloid β. Podaci su obrađeni Kruskal-Wallis neparametrijskim one-way ANOVA testom s Wilcoxon signed rank post-hoc testom za međusobnu analizu skupina. \*  $p < 0,05$  u usporedbi s CTR; #  $p < 0,05$  u usporedbi sa STZ; \$  $p < 0,05$  u usporedbi s CTR+GAL.

Rezultate biokemijskih mjerenja u Pokusu 2 prikazuje Tablica 6. Izmjerene su statistički značajne razlike u razinama galaktoze u likvoru kontrolnih životinja na tretmanu oralnom galaktozom u odnosu na kontrolne (+156% CTR+GAL vs. CTR,  $p=0,022$ ). Amiloid β bio je povišen u hipokampusu STZ-icv životinja u odnosu na kontrolne (+87% STZ vs. CTR,  $p=0,004$ ), uz gotovo značajno smanjenje nakon dvomjesečne terapije oralnom galaktozom (-37% STZ+GAL vs. STZ,  $p=0,065$ ).

**Tablica 6** Izmjereni biokemijski parametri iz uzoraka krvne plazme, likvora i hipokampusa štakora u Pokusu 2.

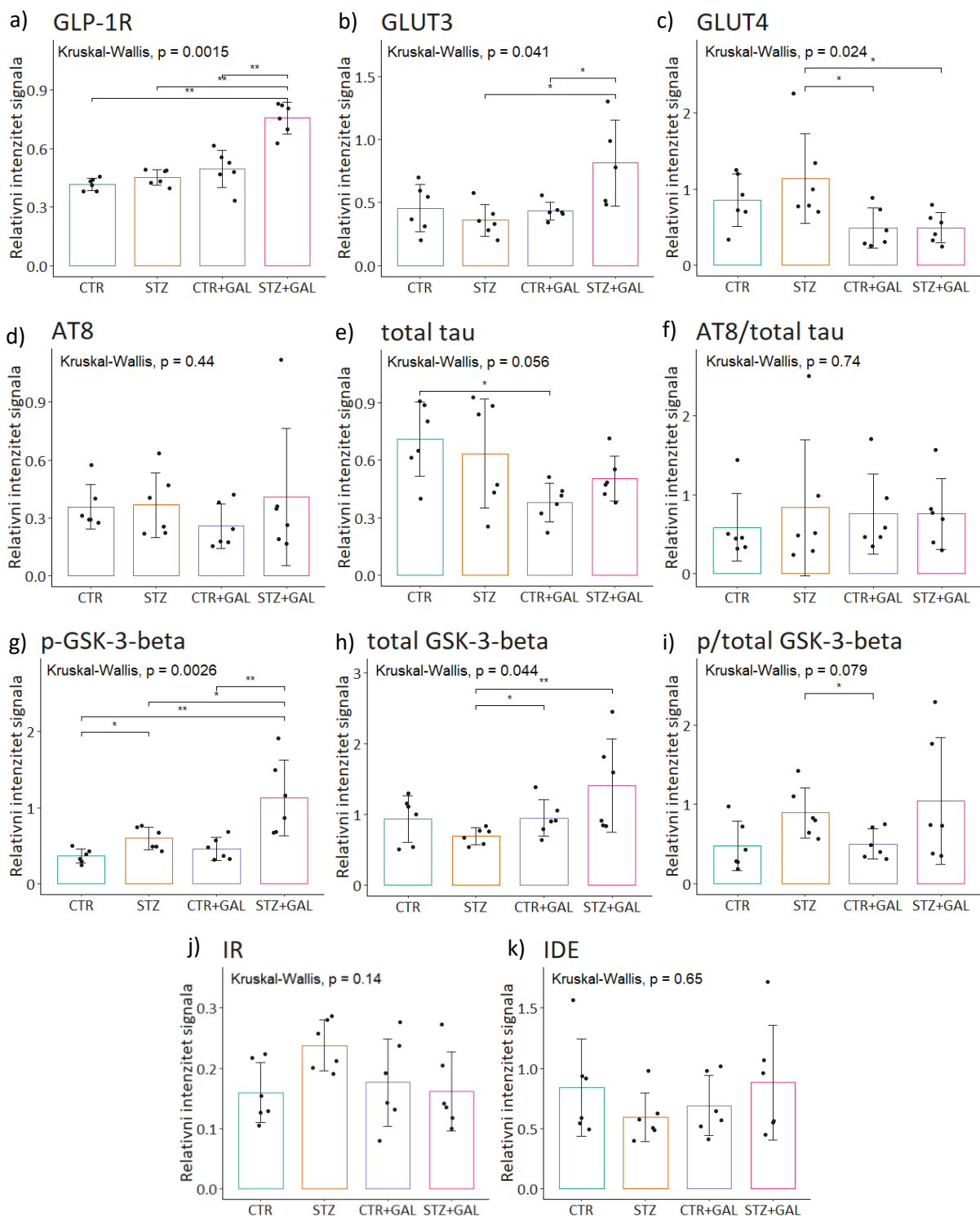
	CTR	STZ	CTR+GAL	STZ+GAL
glukoza (plazma)	8,31 ± 2,17 N=9	7,80 ± 1,97 N=11	7,16 ± 1,44 N=11	6,68 ± 1,03 N=11
glukoza (likvor)	3,38 ± 1,21 N=10	3,46 ± 0,81 N=10	3,54 ± 0,74 N=10	3,44 ± 0,72 N=11
galaktoza (plazma)	145,34 ± 43,80 N=10	180,17 ± 46,25 N=11	157,53 ± 31,91 N=11	154,97 ± 45,08 N=11

	CTR	STZ	CTR+GAL	STZ+GAL
galaktoza (likvor)	27,04 ± 22,84 N=9	33,01 ± 16,30 N=10	69,25 ± 46,06 * N=10	50,88 ± 26,83 N=9
inzulin (plazma)	20,88 ± 10,80 N=9	18,19 ± 6,89 N=11	13,05 ± 4,98 N=11	16,57 ± 4,69 N=10
inzulin (likvor)	1,23 ± 1,45 N=10	0,79 ± 0,36 N=10	0,97 ± 0,69 N=10	0,94 ± 0,57 N=11
GLP-1 (plazma)	19,49 ± 9,07 N=9	14,84 ± 8,27 N=11	13,88 ± 6,69 N=11	13,05 ± 9,08 N=11
aGLP-1 (plazma)	4,12 ± 2,08 N=10	3,97 ± 1,55 N=11	4,36 ± 3,26 N=11	3,60 ± 2,22 N=11
GLP-1 (likvor)	3,72 ± 1,00 N=9	3,76 ± 0,56 N=10	3,47 ± 0,54 N=8	3,77 ± 1,73 N=11
A $\beta$ (hipokampus)	56,05 ± 12,47 N=5	104,80 ± 50,98 * N=6	87,06 ± 30,23 N=6	66,46 ± 22,50 N=6

Podaci su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  SD. CTR – kontrolne životinje; STZ – STZ-icv tretirane životinje; CTR+GAL – kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; STZ+GAL – STZ-icv tretirane životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; GLP-1 – glukagonu sličan peptid 1; aGLP-1 – aktivni oblik GLP-1; A $\beta$  – amiloid  $\beta$ . Podaci su obrađeni Kruskal-Wallis neparametrijskim one-way ANOVA testom s Wilcoxon signed rank post-hoc testom za međusobnu analizu skupina. \*  $p < 0,05$  u usporedbi s CTR.

#### 5.1.4. Western blot

U Pokusu 1 nađena je povećana ekspresija receptora za GLP-1 u hipokampusu životinja tretiranih STZ-icv koje su primile dvomjesečnu terapiju oralnom galaktozom (+81% vs. CTR,  $p=0,002$ ; +69% vs. STZ,  $p=0,002$ ; +52%, vs. CTR+GAL,  $p=0,002$ ; Slika 26a). Isto tako, u STZ+GAL skupini nađena je i povećana ekspresija GLUT3 (+125% vs. STZ,  $p=0,017$ ; +88% vs. CTR+GAL,  $p=0,017$ ; Slika 26b). S druge strane, ekspresija GLUT4 prijenosnika za glukozu bila je smanjena u STZ-icv tretiranih životinja na terapiji oralnom galaktozom (-57% vs. STZ,  $p=0,015$ ; Slika 27c). Ekspresija ukupnog proteina tau bila je snižena u kontrolnih životinja na terapiji oralnom galaktozom (-47% vs. CTR,  $p=0,015$ ; Slika 26e), dok se razine fosforiliranog proteina tau i omjer fosforiliranog i ukupnog proteina nisu značajnije razlikovale među ispitivanim skupinama (Slika 26d, f). Ekspresija fosforiliranog GSK3- $\beta$  bila je povećana u STZ-icv životinja (+64% vs. CTR,  $p=0,015$ ), a dodatno je povećanje izazvala terapija oralnom galaktozom (+92% vs. STZ,  $p=0,041$ ; +151% vs. CTR+GAL,  $p=0,009$ ; +214% vs. CTR,  $p=0,002$ ; Slika 26g). Sličan je trend izmjeren i u razinama ukupnog GSK3- $\beta$ , gdje je u STZ-icv životinja došlo do povećanja nakon tretmana galaktozom (+104% vs. STZ,  $p=0,002$ ; Slika 26h). Ekspresije IDE i IR u hipokampusu nisu se značajnije razlikovale među ispitivanim skupinama (Slika 26j, k).

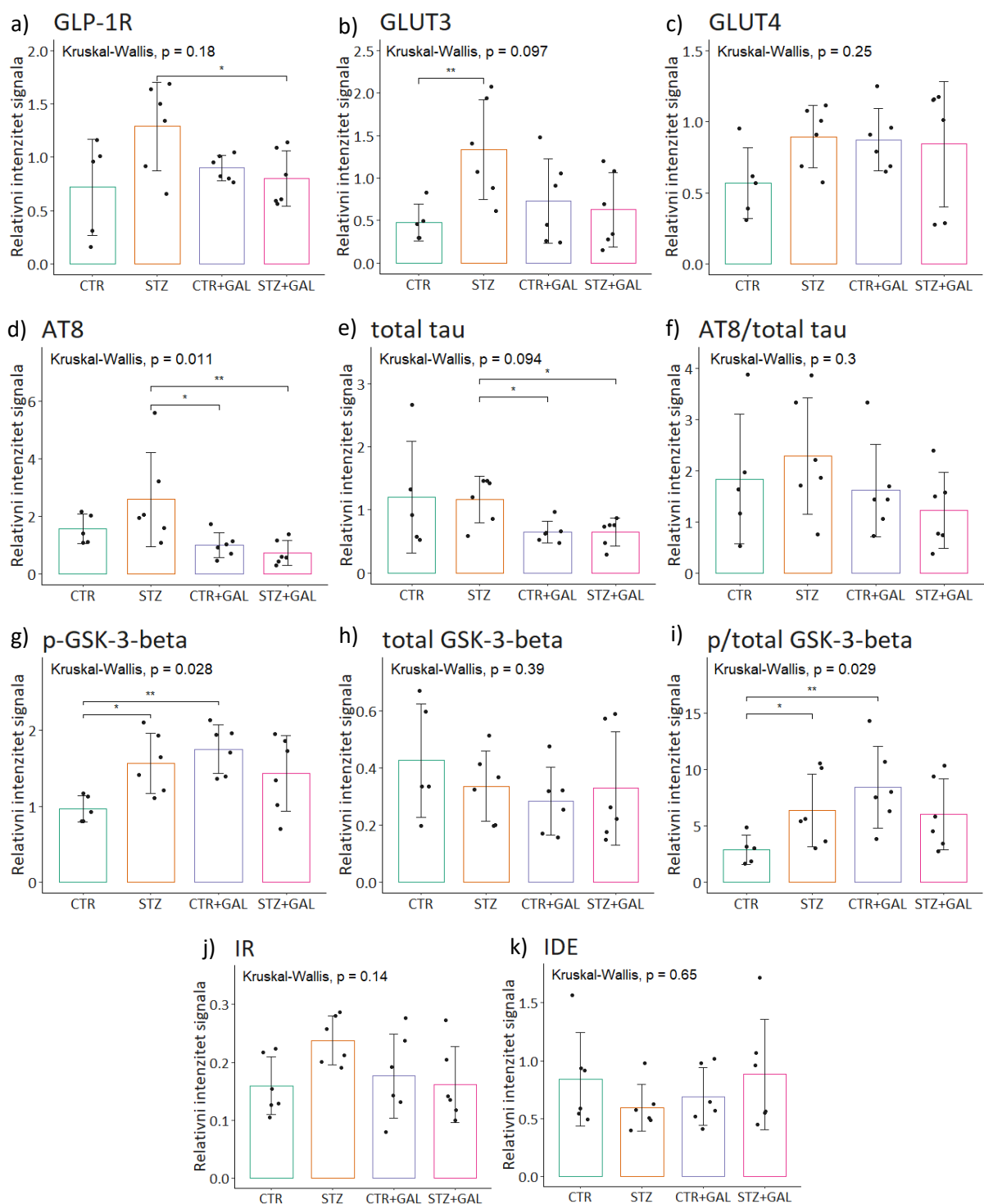


**Slika 26** Rezultati Western blot mjerenja ekspresije proteina povezanih s inzulinskim sustavom, nosačima za glukozu, amiloidnom i tau patologijom te GLP-1 receptorom u hipokampusu štakora u Pokusu 1.

Svaki stupac predstavlja srednju vrijednost  $\pm$  SD relativnog intenziteta signala na Western blotu normaliziranog prema ukupnom sadržaju proteina mjenjenog preko ekspresije  $\beta$ -aktina ili  $\beta$ -tubulina u uzorcima hipokampusu. Pojedinačne točke na stupcima predstavljaju vrijednost relativnog intenziteta signala pojedine životinje. Grafovi prikazuju ekspresiju (a) receptora za glukagonu sličan peptid-1 (GLP-1R); (b) prijenosnika za glukozu 3 (GLUT3); (c) prijenosnika za glukozu 4 (GLUT4); (d) proteina tau fosforiliranog serinu 202 i treoninu 205 (AT8); (e) ukupnog proteina tau (total tau); (g) fosforilirane glikogen sintaza kinaze 3 beta (p-GSK-3- $\beta$ ); (h) ukupne glikogen sintaza kinaze 3 beta (total GSK-3- $\beta$ );

*(j) inzulinskog receptora (IR); (k) enzima koji razgrađuje inzulin (IDE) te omjere (f) fosforiliranog i ukupnog proteina tau te (i) fosforilirane i ukupne GSK-3-β. CTR – kontrolne životinje; STZ – STZ-icv tretirane životinje; CTR+GAL – kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; STZ+GAL – STZ-icv tretirane životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom. N=6. Podaci su obrađeni Kruskal-Wallis neparametrijskim one-way ANOVA testom s Wilcoxon signed rank post-hoc testom za međusobnu analizu skupina. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .*

Suprotno od Pokusa 1, u Pokusu 2 je tretman oralnom galaktozom utjecao na smanjenje razine ekspresije receptora za GLP-1 u hipokampusu životinja tretiranih STZ-icv (-38% vs. STZ,  $p=0,041$ ; Slika 27a). Ekspresija prijenosnika GLUT3 bila je povećana u STZ-icv životinja u odnosu na kontrolne (+177% vs. CTR,  $p=0,009$ ; Slika 27b), dok se ekspresija GLUT4 nije značajnije razlikovala (Slika 27c). Primjena oralne galaktoze utjecala je u STZ-icv životinja na smanjenje ekspresije fosforiliranog (-72% vs. STZ,  $p=0,009$ ; Slika 27d) i ukupnog proteina tau (-44% vs. STZ,  $p=0,041$ ; Slika 27e). Razina ekspresije fosforiliranog GSK3-β bila je povećana u hipokampusu kontrolnih životinja na tretmanu oralnom galaktozom (+82% vs. CTR,  $p=0,004$ ) te u STZ-icv životinja (+64% vs. CTR,  $p=0,017$ ; Slika 27g), a obzirom da se razine ukupnog GSK3-β nisu značajno razlikovale, isti je trend zabilježen u omjeru fosforiliranog i ukupnog GSK3-β (+193% CTR+GAL vs. CTR,  $p=0,009$ ; +122% STZ vs. CTR,  $p=0,03$ ; Slika 27i). Ekspresija inzulinskog receptora bila je povišena u STZ-icv (+41% vs. CTR,  $p=0,017$ ) i STZ+GAL životinja u odnosu na kontrolne (+58% vs. CTR,  $p=0,017$ ; Slika 27j). Tretman oralnom galaktozom utjecao je na povećanje razine ekspresije IDE u hipokampusu kontrolnih životinja (+82% vs. CTR,  $p=0,004$ ) i STZ-icv životinja (+100% vs. CTR,  $p=0,004$ ; Slika 27k).



**Slika 27** Rezultati Western blot mjerenja ekspresije proteina povezanih s inzulinskim sustavom, nosačima za glukozu, amiloidnom i tau patologijom te GLP-1 receptorom u hipokampusu štakora u Pokusu 2.

Svaki stupac predstavlja srednju vrijednost  $\pm$  SD relativnog intenziteta signala na Western blotu normaliziranom prema ukupnom sadržaju proteina mjenjenog preko ekspresije  $\beta$ -aktina ili  $\beta$ -tubulina u uzorcima hipokampusu. Pojedinačne točke na stupcima predstavljaju vrijednost relativnog intenziteta signala pojedine životinje. Grafovi prikazuju ekspresiju (a) receptora za glukagonu sličan peptid-1 (GLP-1R); (b) prijenosnika za glukozu 3 (GLUT3); (c) prijenosnika za glukozu 4 (GLUT4); (d) proteina tau fosforiliranog serinu 202 i treoninu 205 (AT8); (e) ukupnog proteina tau; (g) fosforilirane glikogen sintaza kinaze 3 beta ( $p$ -GSK-3- $\beta$ ); (h) ukupne glikogen sintaza kinaze 3 beta (GSK-3- $\beta$ ); (j) inzulinskog

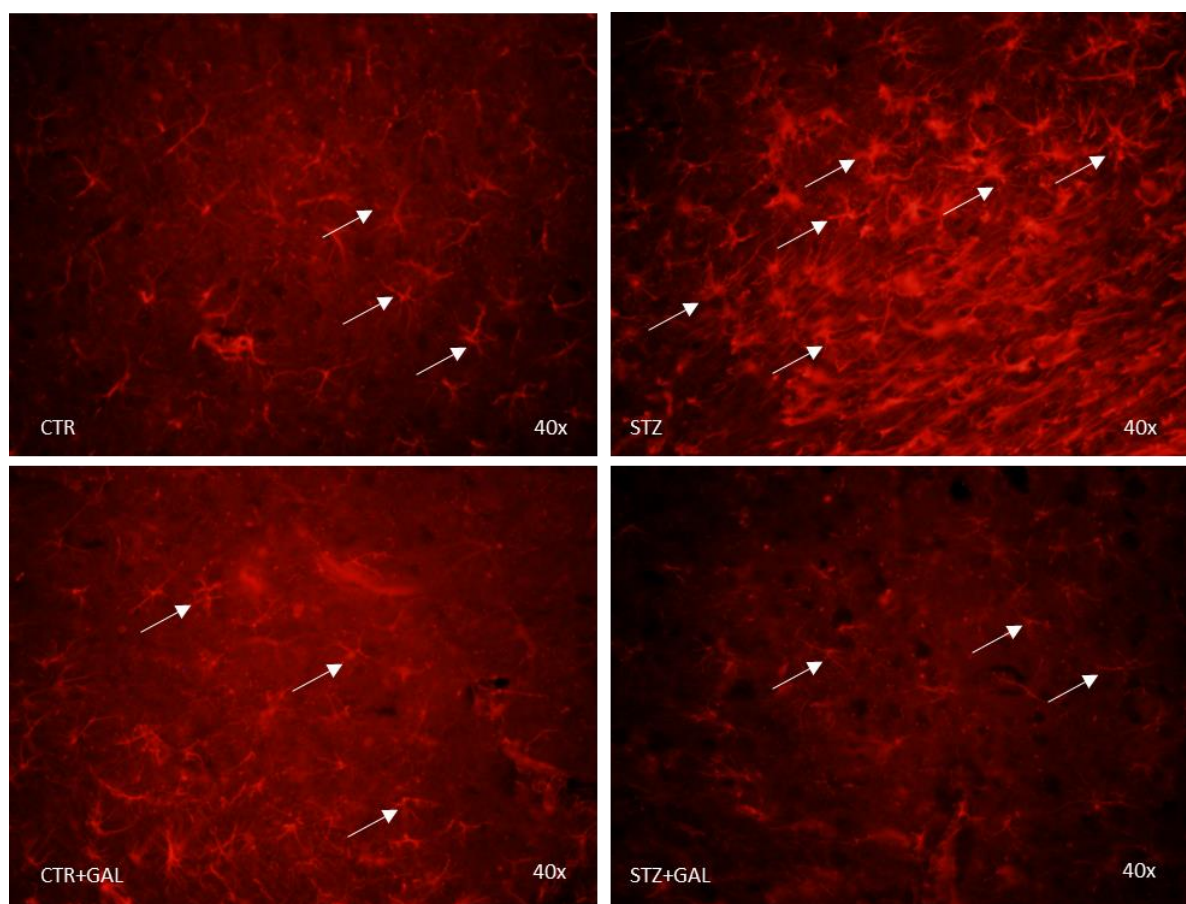


receptora (IR); (k) enzima koji razgrađuje inzulin (IDE) te omjere (f) fosforiliranog i ukupnog proteina tau te (i) fosforilirane i ukupne GSK-3- $\beta$ . CTR – kontrolne životinje; STZ – STZ-icv tretirane životinje; CTR+GAL – kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; STZ+GAL – STZ-icv tretirane životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom. N=6. Podaci su obrađeni Kruskal-Wallis neparametrijskim one-way ANOVA testom s Wilcoxon signed rank post-hoc testom za međusobnu analizu skupina. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

## 5.1.5. Imunohistokemijska analiza

### 5.1.5.1. Biljeg astrocita GFAP

U Pokusu 1 uočena je astrocitoza u parijetalnoj moždanoj kori životinja tretiranih STZ-icv, dok je u tretman oralnom galaktozom uspješno umanjio ekspresiju astrocitnog biljega GFAP. U kontrolnih životinja nije bilo razlike u ekspresiji nakon dvomjesečnog tretmana oralnom galaktozom. U ostalim promatranim regijama nije uočena razlika u ekspresiji GFAP-a. Ekspresiju GFAP-a u parijetalnoj moždanoj kori životinja u Pokusu 1 prikazuje Slika 28.



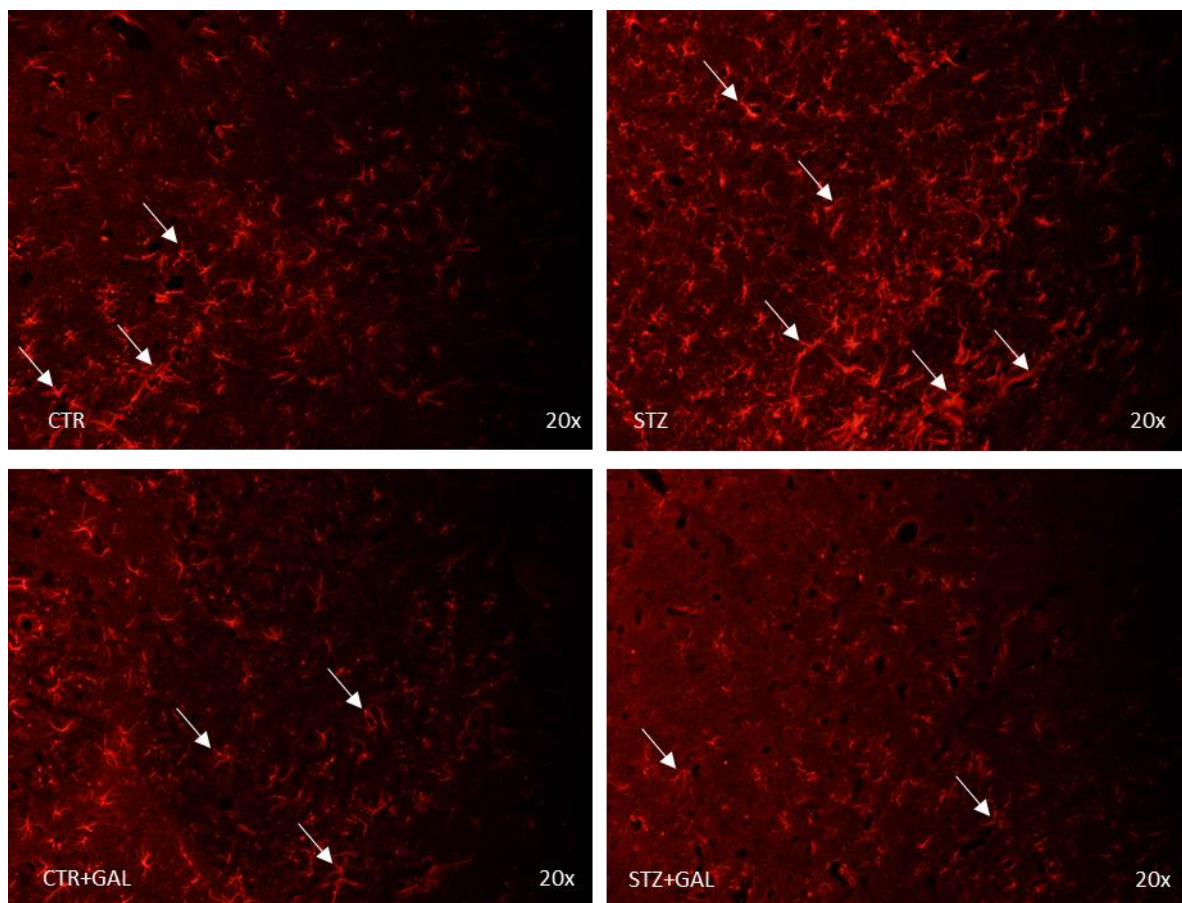
**Slika 28** Ekspresija kiselog vlaknastog proteina glije (GFAP) u parijetalnoj moždanoj kori štakora iz Pokusa 1 vizualizirana imunohistokemijskom metodom.

CTR – kontrolne životinje; STZ – STZ-icv tretirane životinje; CTR+GAL – kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; STZ+GAL – STZ-icv tretirane životinje koje su



primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom. Povećanje na mikroskopu = 40x. Strelice označavaju imunopozitivan signal na protutijelo za GFAP.

U Pokusu 2 vidljiva je astrocitoza u STZ životinja u svim promatranim regijama mozga u usporedbi s CTR. Tretman oralnom galaktozom nije utjecao na ekspresiju astrocitnog biljega GFAP u kontrolnih životinja, ali je u STZ-icv tretiranih životinja njegova ekspresija bila smanjena. Slika 29 prikazuje ekspresiju GFAP-a u parijetalnoj moždanoj kori.



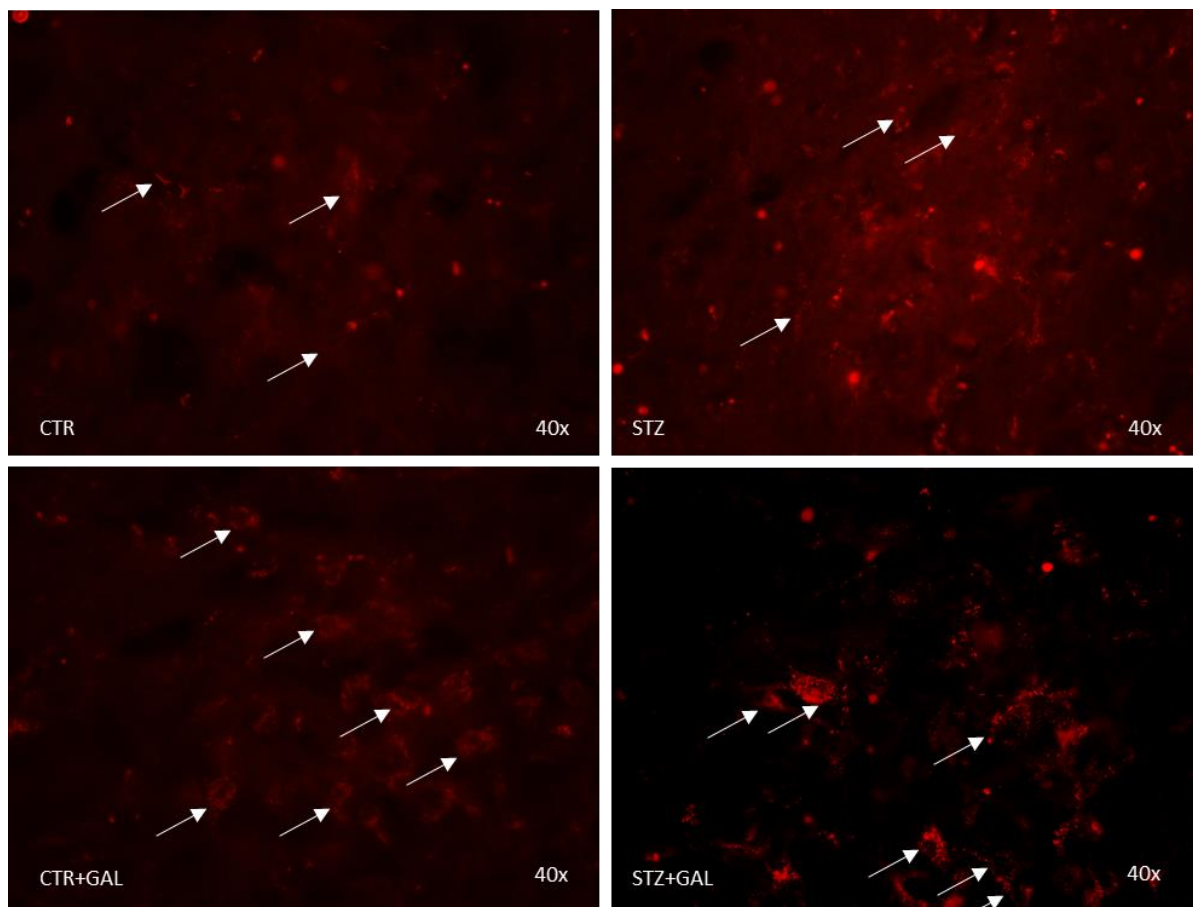
**Slika 29** Ekspresija kiselog vlaknastog proteina glije (GFAP) u parijetalnoj moždanoj kori štakora iz Pokusa 2 vizualizirana imunohistokemijskom metodom.

CTR – kontrolne životinje; STZ – STZ-icv tretirane životinje; CTR+GAL – kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; STZ+GAL – STZ-icv tretirane životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom. Povećanje na mikroskopu = 20x. Strelice označavaju imunopozitivan signal na protutijelo za GFAP.

#### 5.1.5.2. GLP-1 receptor

U Pokusu 1 je proteinski biljeg za GLP-1 receptor bio pojačano eksprimiran u hipotalamusu štakora nakon dvomjesečnog tretmana oralnom galaktozom, kako u kontrolnih, tako i u STZ-

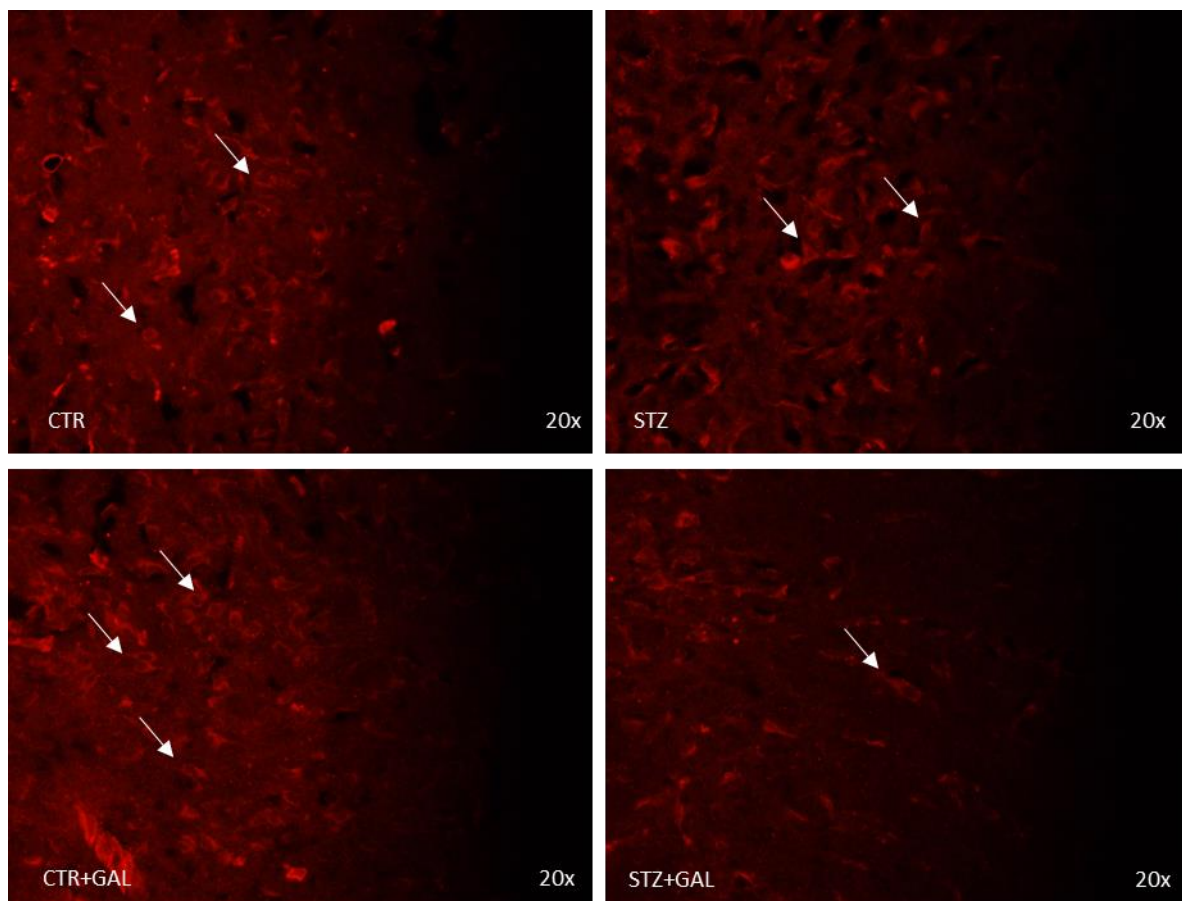
icv tretiranih životinja (Slika 30). U ostalim regijama od interesa nisu nađene razlike u ekspresiji biljega za GLP-1 između ispitivanih skupina.



**Slika 30** Ekspresija receptora za glukagonu sličan peptid-1 (GLP-1R) u hipotalamusu štakora iz Pokusa 1 vizualizirana imunohistokemijskom metodom.

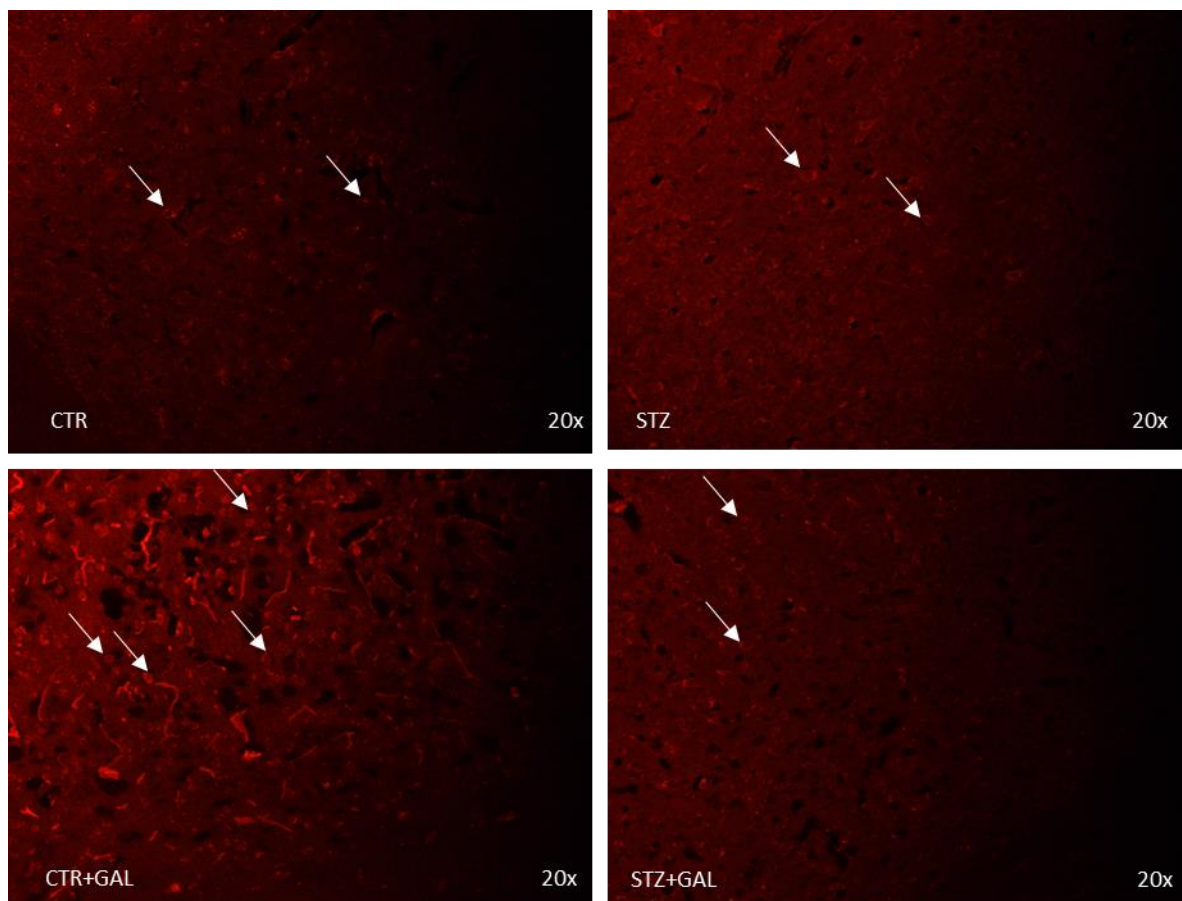
CTR – kontrolne životinje; STZ – STZ-icv tretirane životinje; CTR+GAL – kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; STZ+GAL – STZ-icv tretirane životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom. Povećanje na mikroskopu = 40x. Strelice označavaju imunopozitivan signal na protutijelo za GLP-1R.

U Pokusu 2 ekspresija proteinskog biljega za GLP-1R bila je povećana u hipotalamusu CTR+GAL životinja u usporedbi s netretiranim kontrolnim životinjama, dok je kod STZ životinja promjena obrnuta, tretman oralnom galaktozom smanjio je ekspresiju GLP-1R u STZ+GAL životinja u usporedbi sa STZ životinjama (Slika 31). U moždanoj kori galaktoza je također povećala ekspresiju receptora u kontrolnih životinja, ali je taj učinak izostao u STZ životinja (Slika 32).



**Slika 31** Ekspresija receptora za glukagonu sličan peptid-1 (GLP-1R) u hipotalamusu štakora iz Pokusa 2 vizualizirana imunohistokemijskom metodom.

*CTR* – kontrolne životinje; *STZ* – STZ-icv tretirane životinje; *CTR+GAL* – kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; *STZ+GAL* – STZ-icv tretirane životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom. Povećanje na mikroskopu = 20x. Strelice označavaju imunopozitivan signal na protutijelo za GLP-1R.



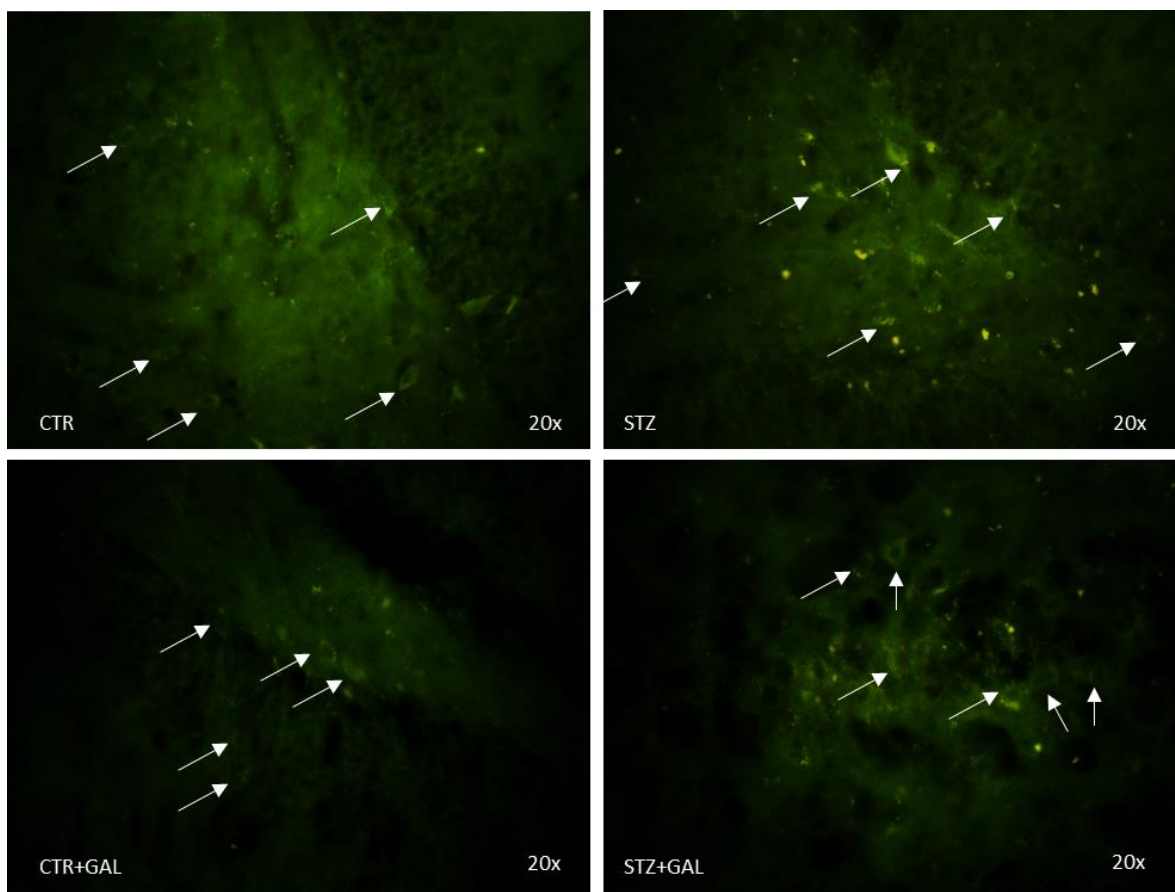
**Slika 32** Ekspresija receptora za glukagonu sličan peptid 1 (GLP-1R) u parijetalnoj moždanoj kori štakora iz Pokusa 2 vizualizirana imunohistokemijskom metodom.

*CTR* – kontrolne životinje; *STZ* – STZ-icv tretirane životinje; *CTR+GAL* – kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; *STZ+GAL* – STZ-icv tretirane životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom. Povećanje na mikroskopu = 20x. Strelice označavaju imunopozitivan signal na protutijelo za GLP-1R.

### 5.1.5.3. Fosforilirani protein tau – AT8

Ekspresija fosforiliranog proteina tau u Pokusu 1 bila je blago povećana u hipokampusu STZ životinja i STZ+GAL u usporedbi s CTR i CTR+GAL, dok je u hipotalamusu i moždanoj kori ekspresija bila podjednaka. Imunofluorescentno bojanje protutijelom na AT8 u hipokampusu štakora iz Pokusa 1 prikazuje Slika 33.

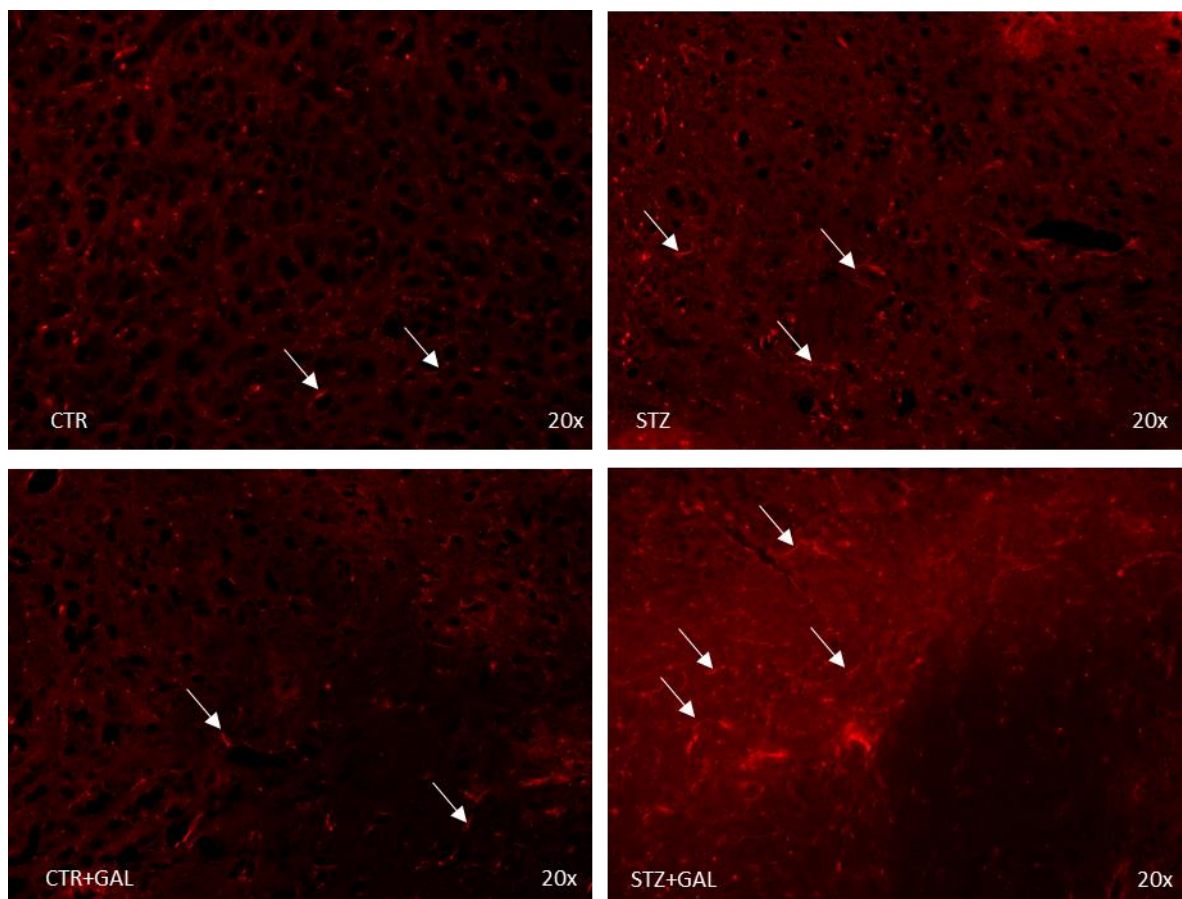




**Slika 33** Ekspresija fosforiliranog proteina tau na serinu 202 i treoninu 205 (AT8) u hipokampusu štakora iz Pokusa 1 vizualizirana imunohistokemijskom metodom.

CTR – kontrolne životinje; STZ – STZ-icv tretirane životinje; CTR+GAL – kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; STZ+GAL – STZ-icv tretirane životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom. Povećanje na mikroskopu = 20x. Strelice označavaju imunopozitivan signal na protutijelo za AT8.

Povećana ekspresija fosforiliranog proteina tau (AT8) primijećena je u STZ životinja u svim promatranim regijama u usporedbi s CTR. Oralna primjena galaktoze u STZ životinja još je dodatno povećala ekspresiju AT8u usporedbi sa STZ grupom, dok primjena galaktoze u kontrolnih životinja (CTR+GAL) nije izazvala promjene ekspresije AT8. Slika 34 prikazuje ekspresiju u hipotalamusu.

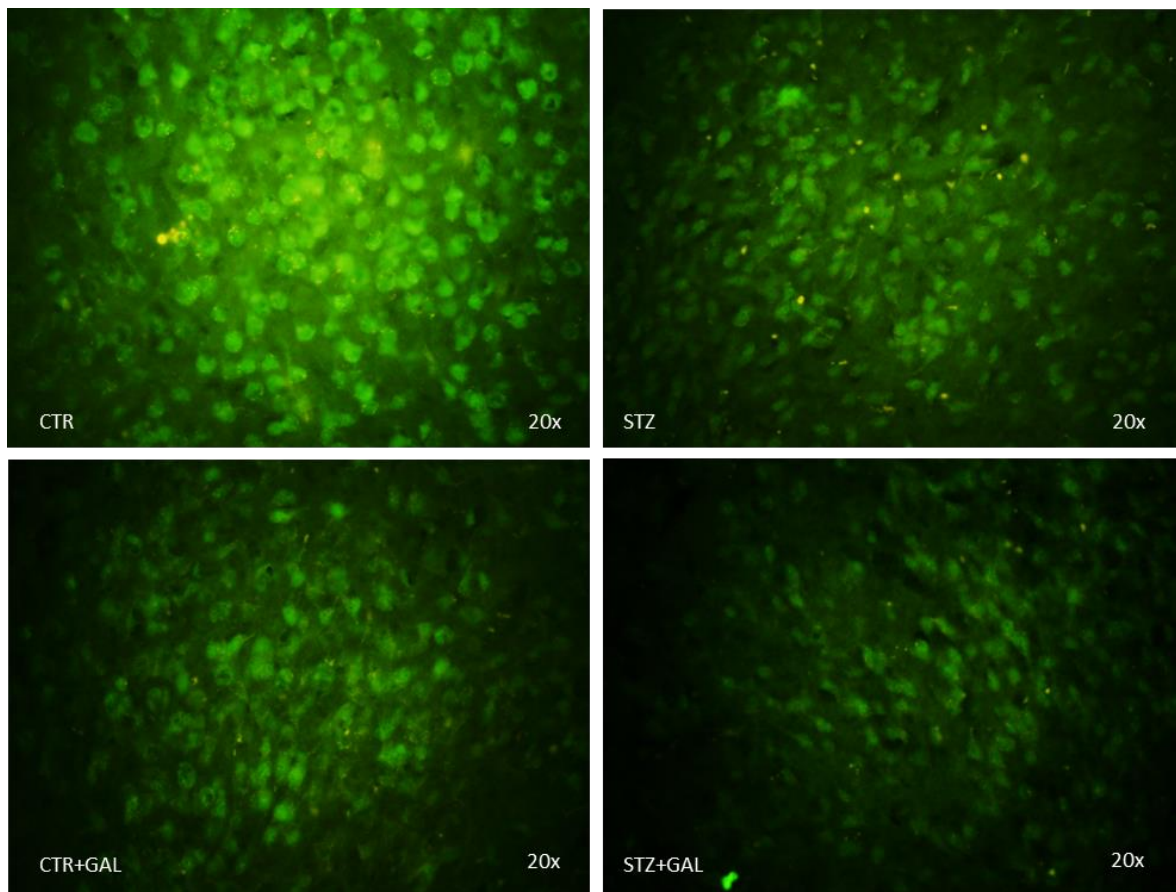


**Slika 34** Ekspresija fosforiliranog proteina tau na serinu 202 i treoninu 205 (AT8) u hipotalamusu štakora iz Pokusa 2 vizualizirana imunohistokemijskom metodom.

CTR – kontrolne životinje; STZ – STZ-icv tretirane životinje; CTR+GAL – kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; STZ+GAL – STZ-icv tretirane životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom. Povećanje na mikroskopu = 20x. Strelice označavaju imunopozitivan signal na protutijelo za AT8.

#### 5.1.5.4. Biljeg neurona NeuN

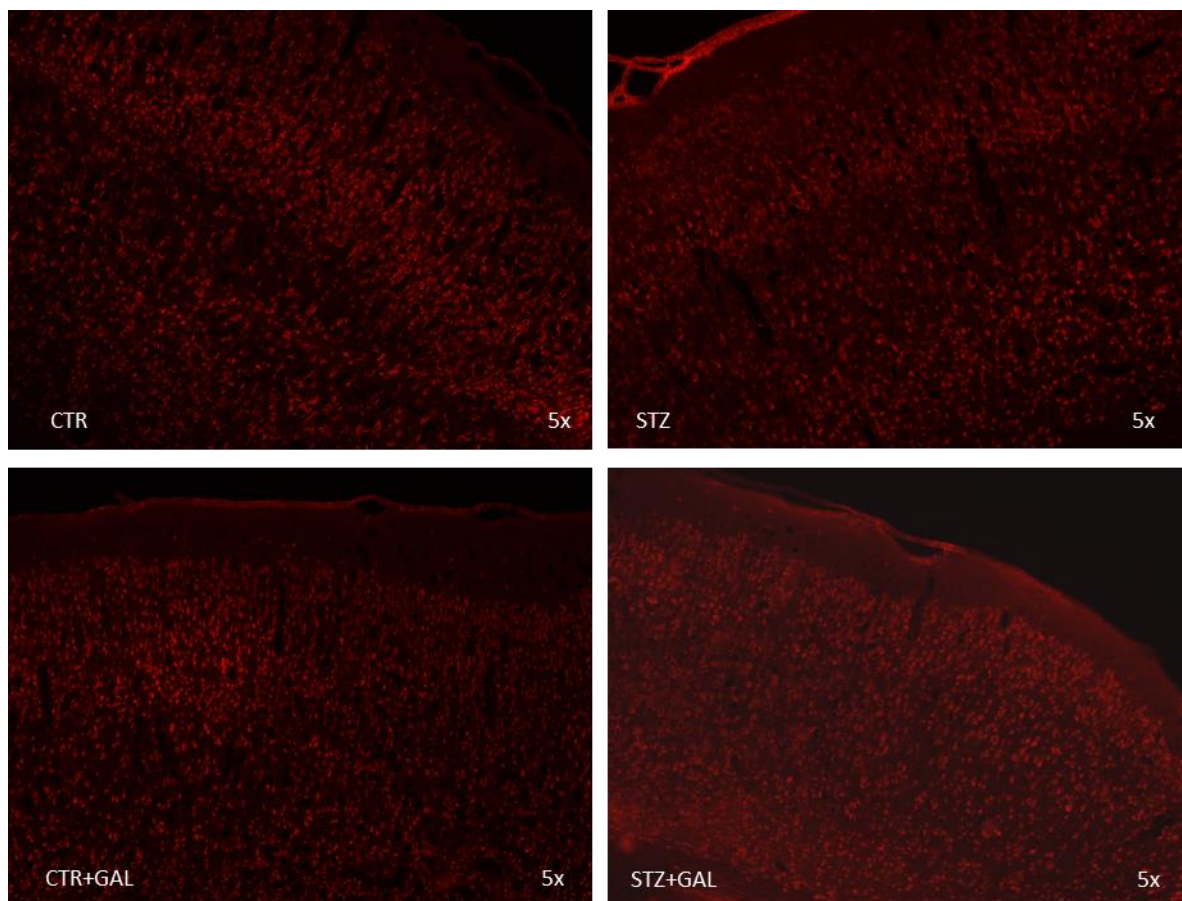
U Pokusima 1 i 2 u nijednoj promatranoj regiji nije primijećena razlika u ekspresiji biljega neurona NeuN. Slika 35 prikazuje imunohistokemijsko bojanje NeuN protutijelom u hipotalamusu životinja iz Pokusa 1, dok Slika 36 prikazuje ekspresiju NeuN biljega u parijetalnoj moždanoj kori u Pokusu 2.



**Slika 35 Ekspresija biljega za neurone NeuN u hipotalamusu štakora u Pokusu 1 vizualizirana imunohistokemijskom metodom.**

*CTR – kontrolne životinje; STZ – STZ-icv tretirane životinje; CTR+GAL – kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; STZ+GAL – STZ-icv tretirane životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom. Povećanje na mikroskopu = 20x.*





**Slika 36** Ekspresija biljega za neurone NeuN u parijetalnoj moždanoj kori štakora u Pokusu 2 vizualizirana imunohistokemijskom metodom.

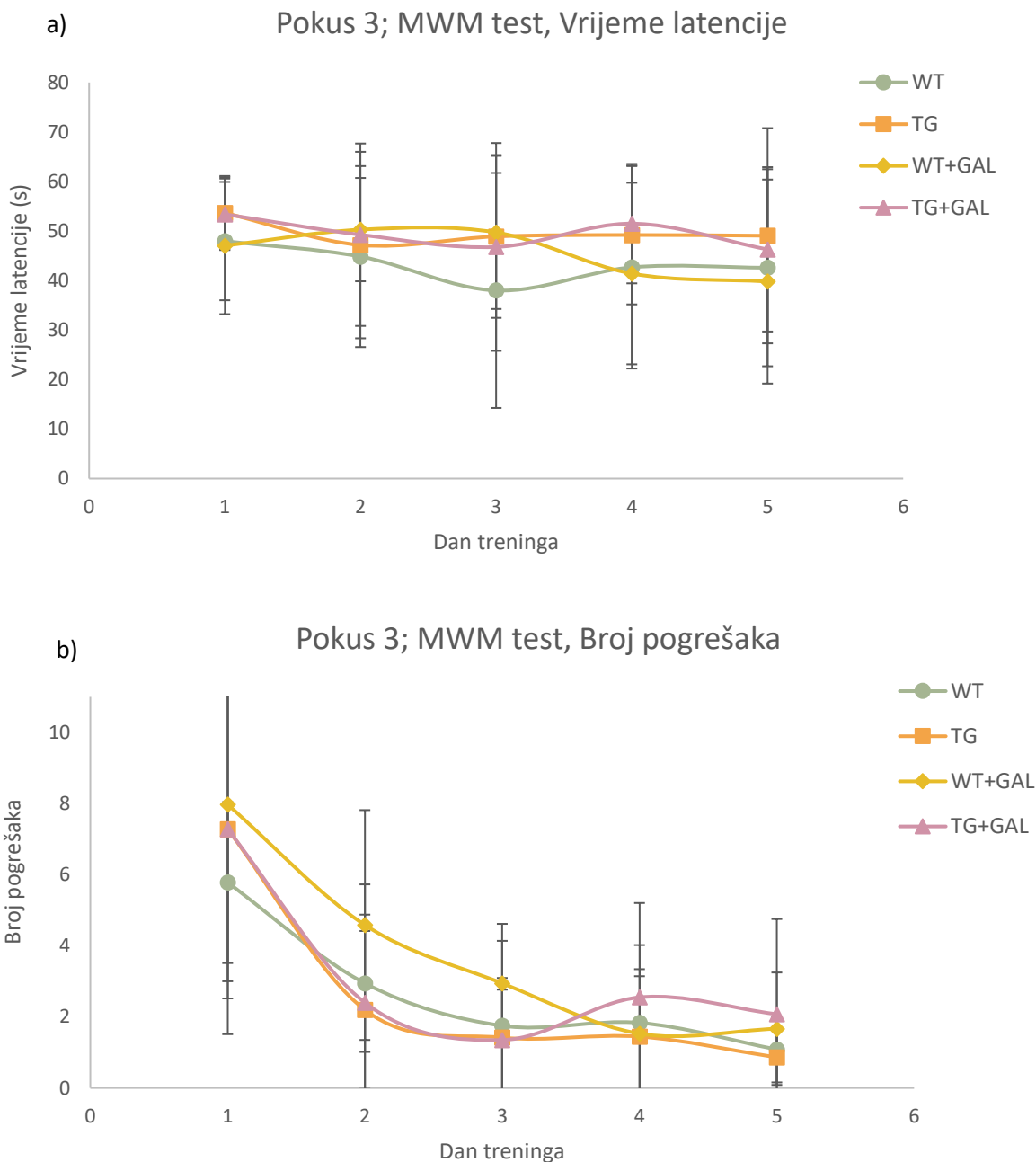
CTR – kontrolne životinje; STZ – STZ-icv tretirane životinje; CTR+GAL – kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; STZ+GAL – STZ-icv tretirane životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom. Povećanje na mikroskopu = 5x.

## **5.2. Rezultati pokusa 3 i 4, učinak peroralno primijenjene galaktoze u mišjem modelu familijarnog oblika bolesti**

### **5.2.1. Kognitivni i bihevioralni učinci**

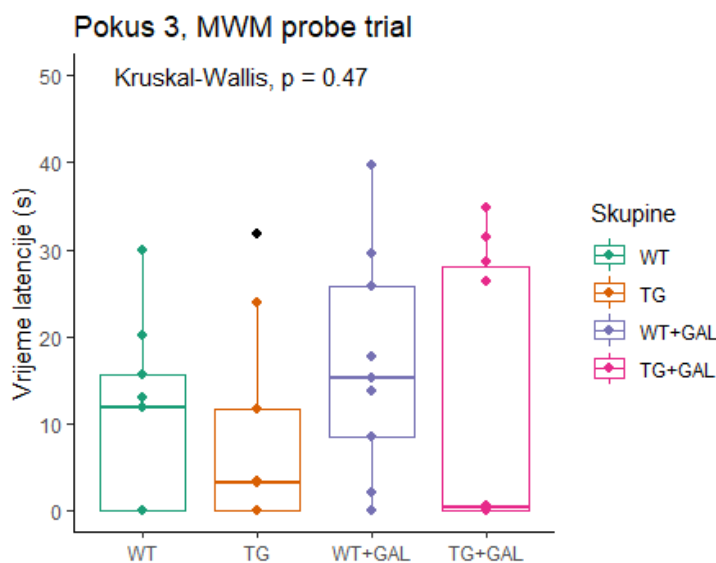
U Pokusu 3, koji predstavlja pre-simptomatski stadij fAB, gdje su miševi u dobi od 5 mjeseci započeli dvomjesečni tretman galaktoze, MWM test plivanja nije pokazao razliku između kontrolnih (WT) i transgениčnih (TG) životinja kao ni blagotvoran, ali ni štetan utjecaj galaktoze, bilo u broju pogrešaka i vremenu latencije kroz 5 dana učenja (Slika 37), bilo 6. dan ispitivanja prostornog pamćenja (Slika 38). Razlike među skupinama nije bilo niti u PAT testu strahom uvjetovanog učenja (Slika 39).





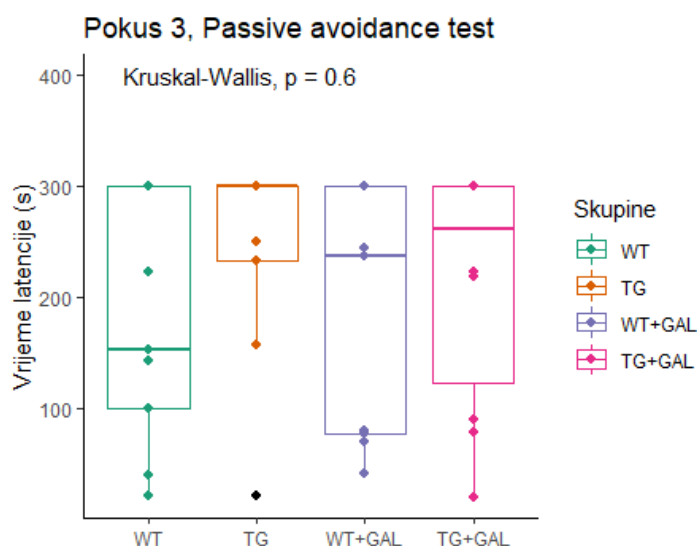
**Slika 37 Učenje u Morris Water Maze testu plivanja u labirintu u miševa u Pokusu 3.**

Svaka točka u grafu predstavlja vrijednost pojedine grupe ((a) vrijeme do pronalaska platforme te (b) broj prelazaka u pogrešne kvadrante) izraženu kao srednja vrijednost  $\pm$  SD tijekom pet dana učenja u MWM testu. WT = kontrolne životinje, TG = transgenične životinje, WT+GAL = kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; TG+GAL = transgenične životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom. N=9 (WT, TG, WT+GAL), 10 (TG+GAL). Podaci su transformirani po prirodnom logaritmu kako bi zadovoljili uvjete normalnosti te analizirani two-way ANOVA testom za ponovljena mjerenja uz Tukey post-hoc test za međusobnu analizu skupina u datom danu treninga.



**Slika 38 Probe trial Morris Water Maze testa plivanja u labirintu u miševa Pokusu 3.**

Svaki box-plot dijagram prikazuje odnos minimuma, maksimuma, donjega i gornjega kvartila te medijana vremena provedenog u traženom kvadrantu šesti dan MWM ispitivanja, dok točke na dijagramu predstavljaju pojedine vrijednosti životinje, a crno obojene točke predstavljaju vrijednosti s najvećim odstupanjem pojedine grupe (outlieri). WT = kontrolne životinje; TG = transgenične životinje; WT+GAL = kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; TG+GAL = transgenične životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom.  $N=9$  (WT, TG, WT+GAL), 10 (TG+GAL). Podaci su obrađeni Kruskal-Wallis neparametrijskim one-way ANOVA testom s Wilcoxon signed rank post-hoc testom za međusobnu analizu skupina.

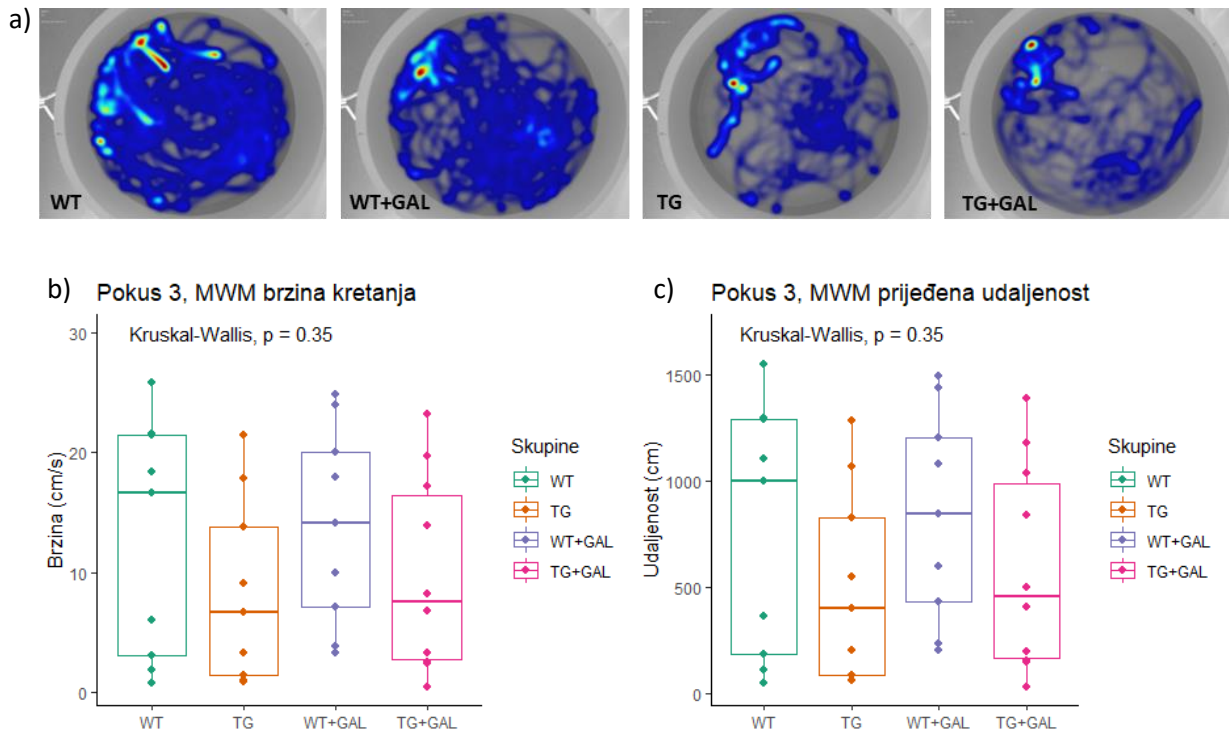


**Slika 39 Passive avoidance test strahom uvjetovanog učenja u miševa Pokusu 3.**

Svaki box-plot dijagram prikazuje odnos minimuma, maksimuma, donjega i gornjega kvartila te medijana vremena latencije, dok točke na dijagramu predstavljaju pojedine vrijednosti životinje, a crno obojene točke predstavljaju vrijednosti s najvećim odstupanjem pojedine grupe (outlieri). WT = kontrolne životinje; TG = transgenične životinje; WT+GAL = kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; TG+GAL = transgenične životinje koje su primile

*dvomjesečni tretman oralnom galaktozom. N=9 (WT, TG, WT+GAL), 10 (TG+GAL). Podaci su obrađeni Kruskal-Wallis neparametrijskim one-way ANOVA testom s Wilcoxon signed rank post-hoc testom za međusobnu analizu skupina.*

Uzorci plivanja miševa analizirani toplinskim kartama (Slika 40a) pokazali su smanjenu aktivnost transgeničnih miševa u bazenu za MWM u usporedbi s kontrolnim miševima neovisno o tretmanu oralnom galaktozom, a isti se trend očitovao i u smanjenoj brzini kretanja (Slika 40b) te ukupno prijeđenom putu u bazenu (Slika 40c).

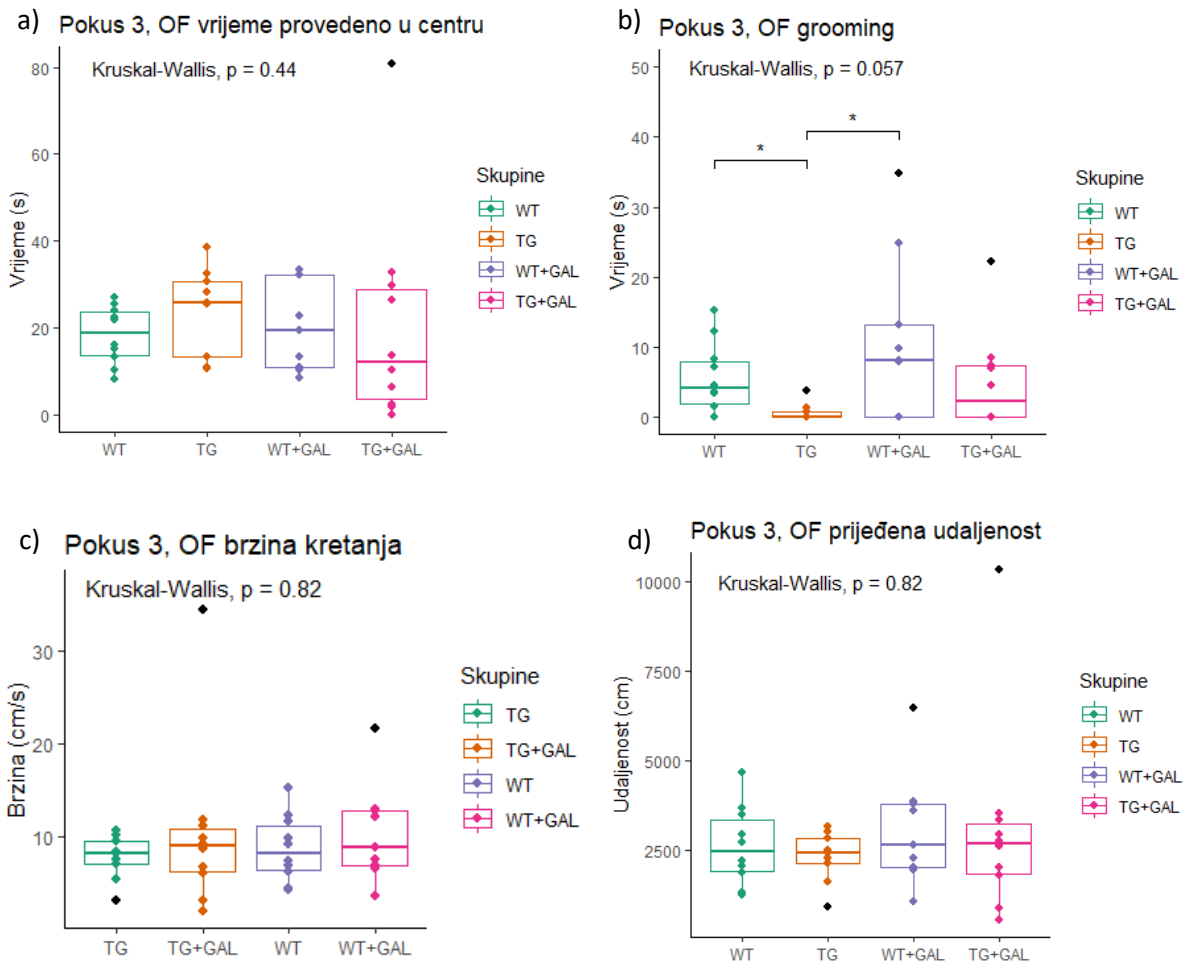


**Slika 40 Aktivnost miševa u Morris Water Maze bazenu u Pokusu 3.**

*(a) Toplinske karte izrađene su preklapanjem putanja kretanja svake životinje u pojedinoj skupini tijekom 6. dana ispitivanja u MWM-u pomoću softverske platforme Noldus EthoVision XT.*

*Svaki box-plot dijagram prikazuje odnos minimuma, maksimuma, donjega i gornjega kvartila te medijana (b) brzine kretanja u MWM-u 6. dana ispitivanja, odnosno (c) ukupno prijeđene udaljenosti u MWM-u 6. dana ispitivanja, dok točke na dijagramu predstavljaju pojedine vrijednosti životinje. WT = kontrolne životinje; TG = transgenične životinje; WT+GAL = kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; TG+GAL = transgenične životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom. N=9 (WT, TG, WT+GAL), 10 (TG+GAL). Podaci su obrađeni Kruskal-Wallis neparametrijskim one-way ANOVA testom s Wilcoxon signed rank post-hoc testom za međusobnu analizu skupina.*

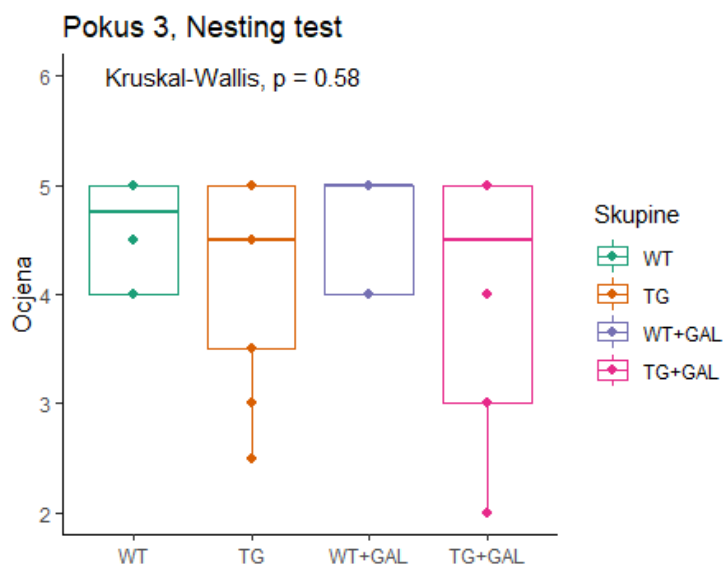
U OF testu otvorenog polja, transgenične životinje pokazale su jednaku lokomotornu aktivnost kao i kontrolne (Slika 41c, d), međutim 88% manje vremena provedeno u timarenju ukazalo je na smanjene razine stresa i anksioznosti u TG skupini (vs. WT,  $p=0,012$ ; Slika 41b). Tretman galaktozom nije utjecao na parametre mjerene OF testom otvorenog polja.



**Slika 41 Open field test otvorenog polja proveden u miševa u Pokusu 3.**

Svaki box-plot dijagram prikazuje odnos minimuma, maksimuma, donjega i gornjega kvartila te medijana (a) vremena provedenog u centru aparata, (b) ukupnog vremena provedenog u timarenju (grooming), (c) brzine kretanja u aparatu, (d) ukupno prijeđene udaljenosti u aparatu, dok točke na dijagramu predstavljaju pojedine vrijednosti životinje, a crno obojene točke predstavljaju vrijednosti s najvećim odstupanjem pojedine grupe (outlieri). WT = kontrolne životinje; TG = transgenične životinje; WT+GAL = kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; TG+GAL = transgenične životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom.  $N=10$  (WT, TG+GAL), 9 (TG, WT+GAL). Podaci su obrađeni Kruskal-Wallis neparametrijskim one-way ANOVA testom s Wilcoxon signed rank post-hoc testom za međusobnu analizu skupina.  $*p < 0,05$ .

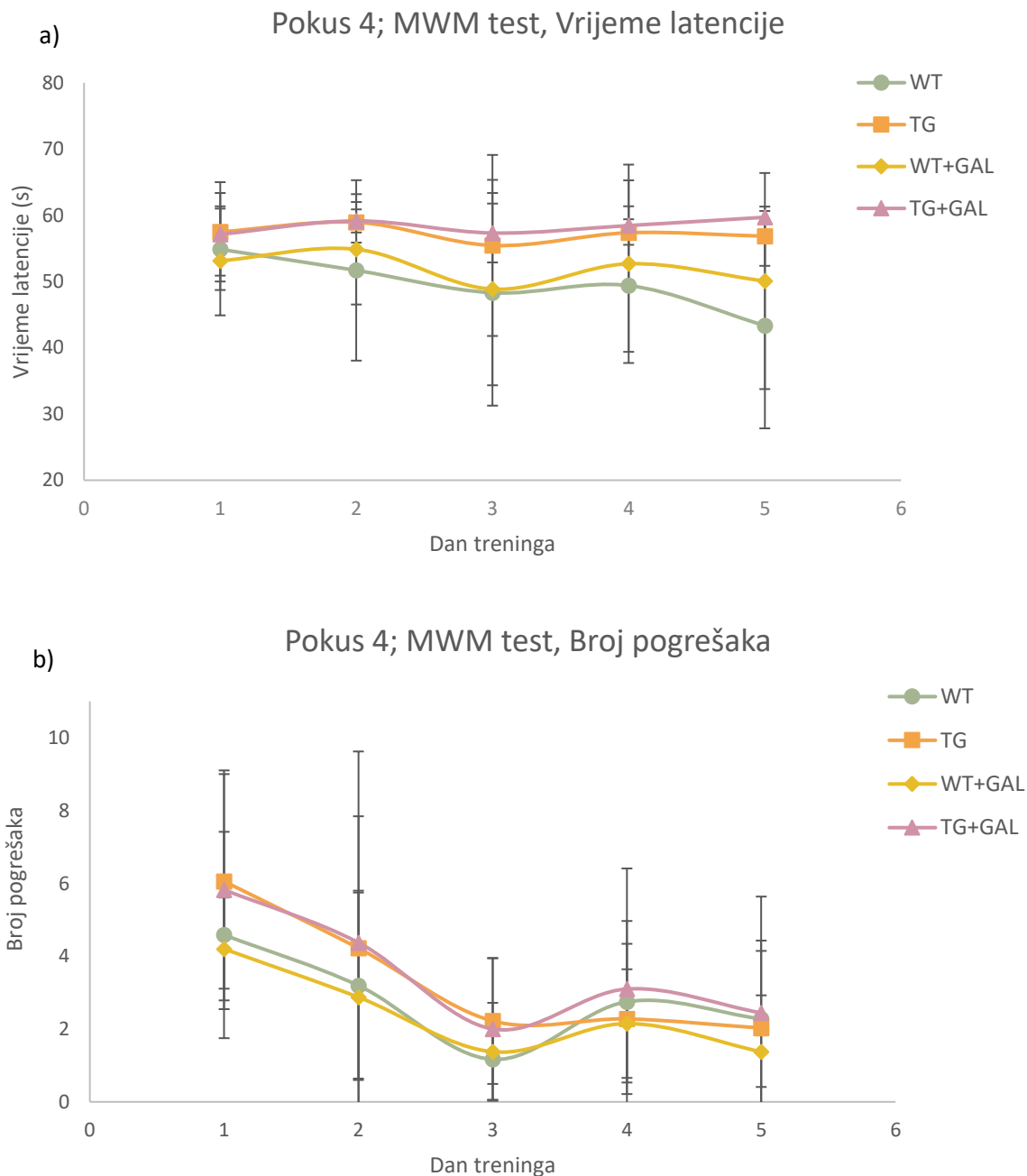
U *nesting* testu poremećaja svijanja gnijezda ispitivane skupine nisu se značajno razlikovale, iako su ocjene gnijezda transgeničnih životinja pokazivale lošiji trend od kontrolnih (Slika 42).



**Slika 42 Nesting test svijanja gnijezda proveden u miševa u Pokusu 3.**

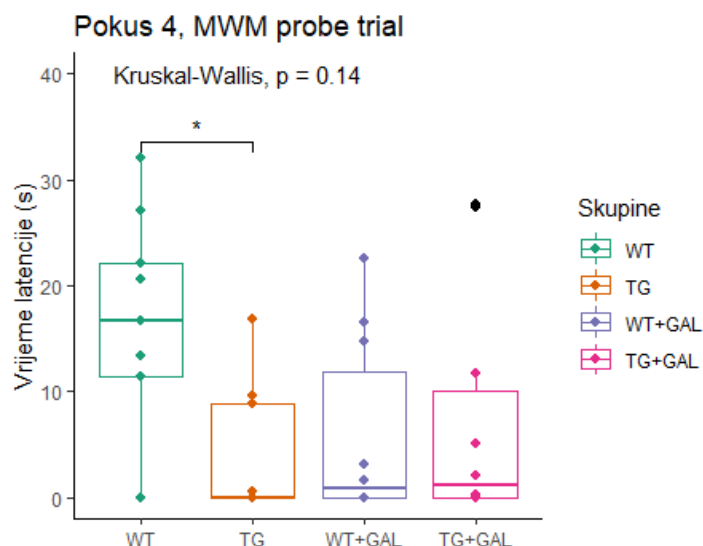
Svaki box-plot dijagram prikazuje odnos minimuma, maksimuma, donjega i gornjega kvartila te medijana numeričke ocjene integriteta svijenog gnijezda, dok točke na dijagramu predstavljaju pojedine vrijednosti životinje. WT = kontrolne životinje; TG = transgenične životinje; WT+GAL = kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; TG+GAL = transgenične životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom.  $N=10$  (WT, TG+GAL), 9 (TG, WT+GAL). Podaci su obrađeni Kruskal-Wallis neparametrijskim one-way ANOVA testom s Wilcoxon signed rank post-hoc testom za međusobnu analizu skupina.

U Pokusu 4, koji predstavlja kasniji stadij fAB, miševi su u dobi od 10 mjeseci započeli dvomjesečni tretman galaktoze. U MWM testu plivanja u labirintu nije bilo razlike između kontrolnih (WT) i transgeničnih (TG) životinja kao ni učinka galaktoze u broju pogrešaka i vremenu latencije kroz 5 dana učenja (Slika 43). U *probe trial*-u 6. dan ispitivanja prostornog pamćenja transgenične životinje značajno su kraće vrijeme provele u potrazi za platformom u ciljnom kvadrantu (-75% TG vs. WT,  $p=0,029$ ), dok terapija galaktozom nije imala značajnog utjecaja u nijednoj skupini (Slika 44). Paradoksalni rezultati dobiveni su u PAT testu strahom uvjetovanog učenja gdje su kontrolne životinje pokazale značajno kraće vrijeme latencije od svih ostalih skupina (-55% vs. TG,  $p=0,013$ ; -57% vs. WT+GAL,  $p=0,012$ ; -55% vs. TG+GAL,  $p=0,01$ ; Slika 45).



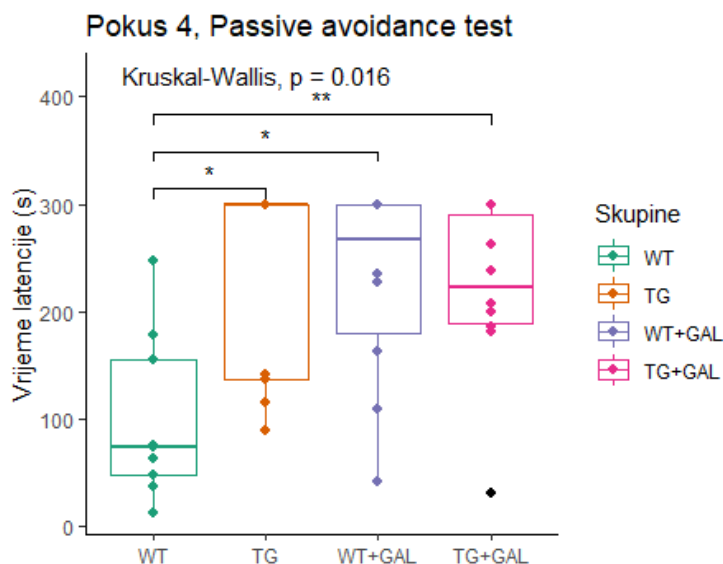
**Slika 43 Učenje u Morris Water Maze testu plivanja u labirintu u miševa u Pokusu 4.**

Svaka točka u grafu predstavlja vrijednost pojedine grupe ((a) vrijeme do pronalaska platforme te (b) broj prelazaka u pogrešne kvadrante) izraženu kao srednja vrijednost  $\pm$  SD tijekom pet dana učenja u MWM testu. WT = kontrolne životinje, TG = transgenične životinje, WT+GAL = kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; TG+GAL = transgenične životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom. N=9 (WT, TG), 10 (TG+GAL, WT+GAL). Podaci su transformirani po prirodnom logaritmu kako bi zadovoljili uvjete normalnosti te analizirani two-way ANOVA testom za ponovljena mjerenja uz Tukey post-hoc test za međusobnu analizu skupina u datom danu treninga.



**Slika 44 Probe trial Morris Water Maze testa plivanja u labirintu u miševa u Pokusu 4.**

Svaki box-plot dijagram prikazuje odnos minimuma, maksimuma, donjega i gornjega kvartila te medijana vremena provedenog u traženom kvadrantu šesti dan MWM ispitivanja, dok točke na dijagramu predstavljaju pojedine vrijednosti životinje, a crno obojene točke predstavljaju vrijednosti s najvećim odstupanjem pojedine grupe (outlieri). WT = kontrolne životinje; TG = transgenične životinje; WT+GAL = kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; TG+GAL = transgenične životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom.  $N=9$  (WT, TG), 10 (TG+GAL, WT+GAL). Podaci su obrađeni Kruskal-Wallis neparametrijskim one-way ANOVA testom s Wilcoxon signed rank post-hoc testom za međusobnu analizu skupina. \*  $p < 0,05$ .



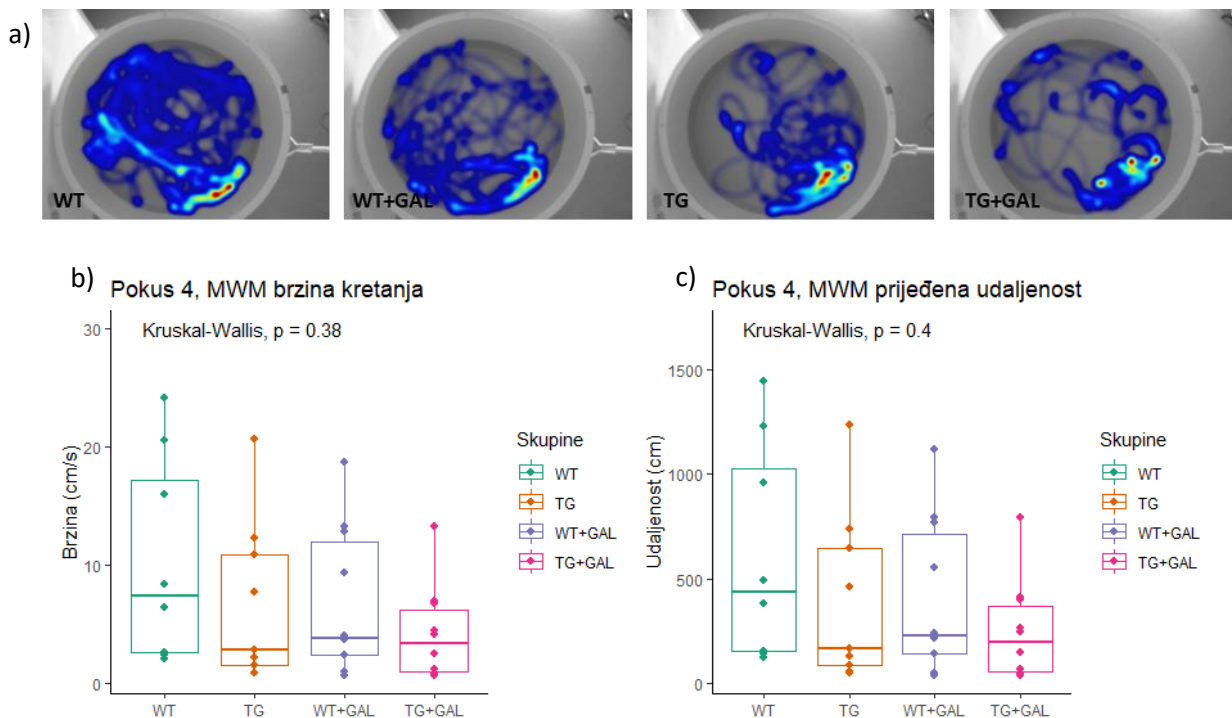
**Slika 45 Passive avoidance test strahom uvjetovanog učenja u miševa u Pokusu 4.**

Svaki box-plot dijagram prikazuje odnos minimuma, maksimuma, donjega i gornjega kvartila te medijana vremena latencije, dok točke na dijagramu predstavljaju pojedine vrijednosti životinje, a crno obojene točke predstavljaju vrijednosti s najvećim odstupanjem pojedine grupe (outlieri). WT = kontrolne životinje; TG = transgenične životinje; WT+GAL = kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; TG+GAL = transgenične životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom.  $N=9$  (WT, TG), 10 (TG+GAL, WT+GAL). Podaci su



obrađeni Kruskal-Wallis neparametrijskim one-way ANOVA testom s Wilcoxon signed rank post-hoc testom za međusobnu analizu skupina. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

Kao i u Pokusu 3, transgenični su miševi u Pokusu 4 također pokazali smanjenu aktivnost u bazenu za MWM u usporedbi s kontrolnim miševima, te je tretman oralnom galaktozom utjecao na dodatno smanjenje aktivnosti u obje ispitivane skupine, što je vidljivo iz toplinskih karti (Slika 46a), kao i iz trenda smanjene brzine kretanja (Slika 46b) i ukupno prijeđene udaljenosti u bazenu (Slika 46c).



**Slika 46 Aktivnost miševa u Morris Water Maze bazenu u Pokusu 4.**

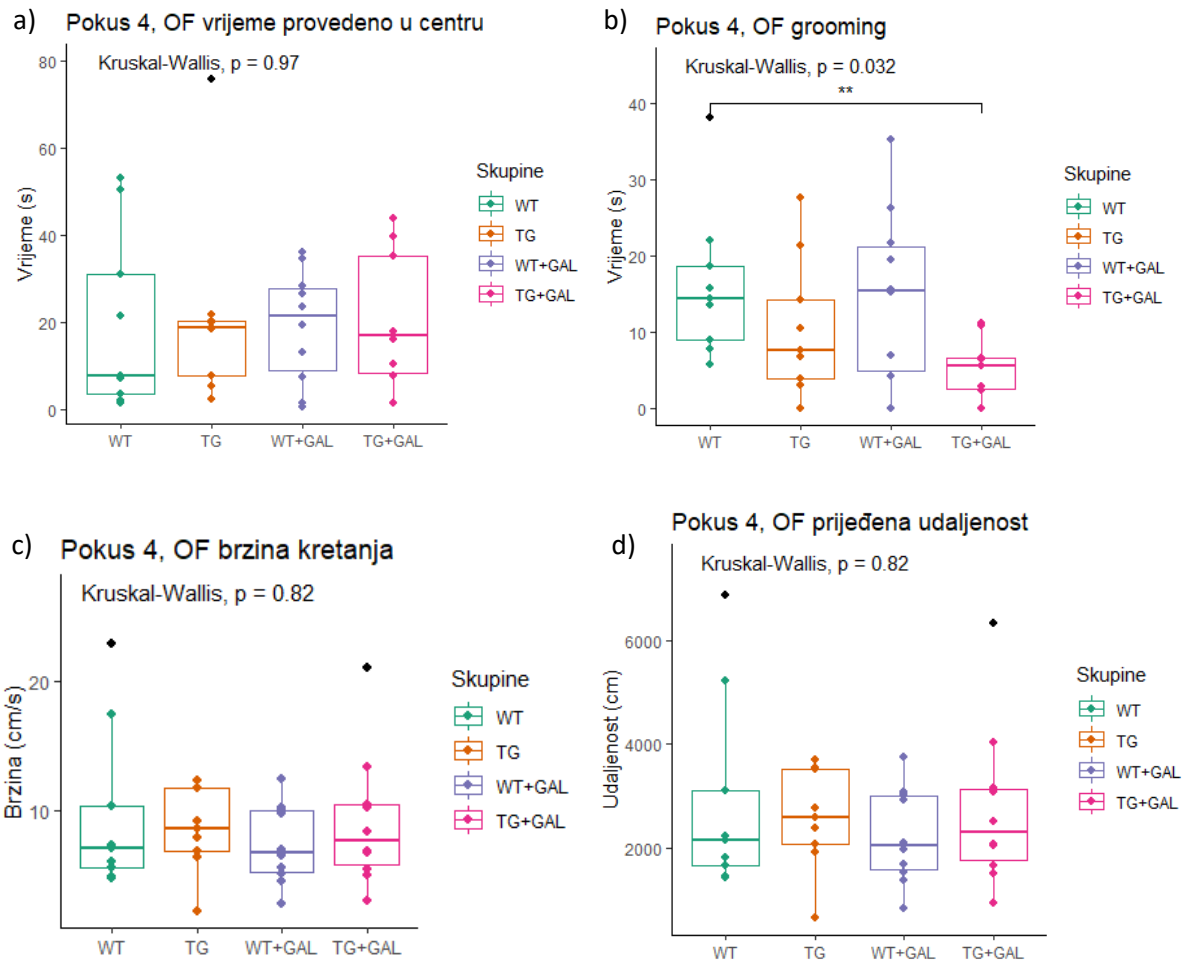
(a) Toplinske karte izrađene su preklapanjem putanja kretanja svake životinje u pojedinoj skupini tijekom 6. dana ispitivanja u MWM-u pomoću softverske platforme Noldus EthoVision XT.

Svaki box-plot dijagram prikazuje odnos minimuma, maksimuma, donjega i gornjega kvartila te medijana (b) brzine kretanja u MWM-u 6. dana ispitivanja, odnosno (c) ukupno prijeđene udaljenosti u MWM-u 6. dana ispitivanja, dok točke na dijagramu predstavljaju pojedine vrijednosti životinje. WT = kontrolne životinje; TG = transgenične životinje; WT+GAL = kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; TG+GAL = transgenične životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom. N=9 (WT, TG), 10 (TG+GAL, WT+GAL). Podaci su obrađeni Kruskal-Wallis neparametrijskim one-way ANOVA testom s Wilcoxon signed rank post-hoc testom za međusobnu analizu skupina.

U OF testu otvorenog polja nije bilo razlike u lokomotornoj aktivnosti miševa (Slika 47c,d), dok su transgenični miševi pokazali manji interes za timarenje (-35% TG vs. WT,  $p=0.16$ ),



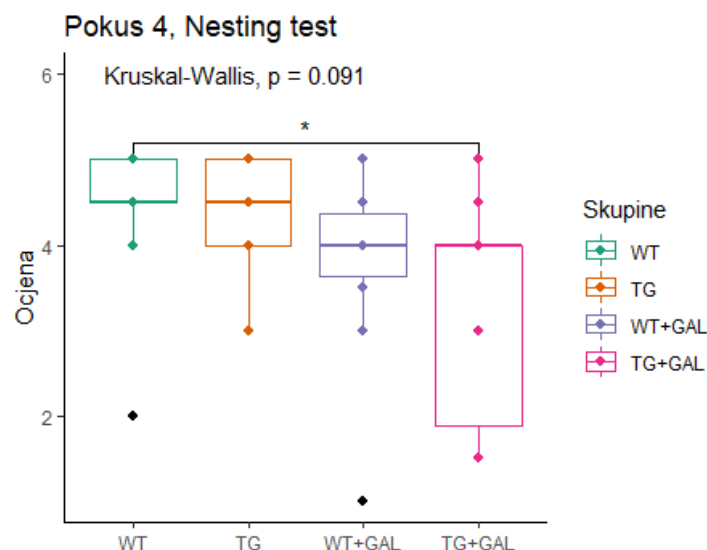
posebno nakon dvomjesečne terapije oralnom galaktozom (-68% TG+GAL vs. WT,  $p=0,003$ ; Slika 47b).



**Slika 47 Open field test otvorenog polja proveden u miševa u Pokusu 4.**

Svaki box-plot dijagram prikazuje odnos minimuma, maksimuma, donjega i gornjega kvartila te medijana (a) vremena provedenog u centru aparata, (b) ukupnog vremena provedenog u timarenju (grooming), (c) brzine kretanja u aparatu, (d) ukupno prijeđene udaljenosti u aparatu, dok točke na dijagramu predstavljaju pojedine vrijednosti životinje, a crno obojene točke predstavljaju vrijednosti s najvećim odstupanjem pojedine grupe (outlieri). WT = kontrolne životinje; TG = transgenične životinje; WT+GAL = kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; TG+GAL = transgenične životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom.  $N=9$  (WT, TG),  $10$  (TG+GAL, WT+GAL). Podaci su obrađeni Kruskal-Wallis neparametrijskim one-way ANOVA testom s Wilcoxon signed rank post-hoc testom za međusobnu analizu skupina. \*\*  $p < 0,01$ .

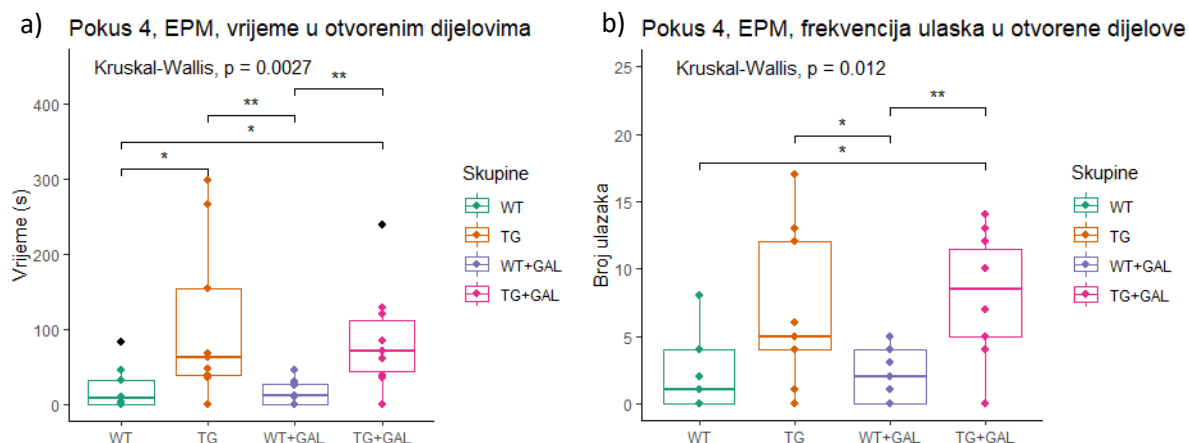
U *nesting* testu dvomjesečni tretman oralnom galaktozom nepovoljno je utjecao na mogućnost svijanja gnijezda u transgeničnih miševa (-24% TG+GAL vs. WT,  $p=0,03$ ; Slika 48).



**Slika 48 Nesting test svijanja gnijezda proveden u miševa u Pokusu 4.**

Svaki box-plot dijagram prikazuje odnos minimuma, maksimuma, donjega i gornjega kvartila te medijana numeričke ocjene integriteta svijenog gnijezda, dok točke na dijagramu predstavljaju pojedine vrijednosti životinje, a crno obojene točke predstavljaju vrijednosti s najvećim odstupanjem pojedine grupe (outlieri). WT = kontrolne životinje; TG = transgenične životinje; WT+GAL = kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; TG+GAL = transgenične životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom.  $N=9$  (WT, TG), 10 (TG+GAL, WT+GAL). Podaci su obrađeni Kruskal-Wallis neparametrijskim one-way ANOVA testom s Wilcoxon signed rank post-hoc testom za međusobnu analizu skupina. \*  $p < 0,05$ .

U Pokusu 4 proveden je *elevated plus maze* (EPM) test uzdignutog križnog labirinta koji je pokazao da transgenične životinje provode značajno više vremena u otvorenim dijelovima instrumenta od kontrolnih (+434% TG vs. WT,  $p=0.023$ ), na što galaktoza nije imala utjecaja (+406% TG+GAL vs. WT+GAL,  $p=0.004$ ; Slika 49a). Slično, transgenične životinje pokazale su veću razinu aktivnosti i frekvenciju ulazaka u otvorene dijelove instrumenta (+200% TG+GAL vs. WT,  $p=0.019$ ; +226% TG vs. WT+GAL,  $p=0.045$ ; +279% TG+GAL vs. WT+GAL,  $p=0.005$ ; Slika 49b). Oba parametra upućuju na smanjeno anksiozno ponašanje transgeničnih miševa u odnosu na divlji tip miša, odnosno, kontrolne životinje.



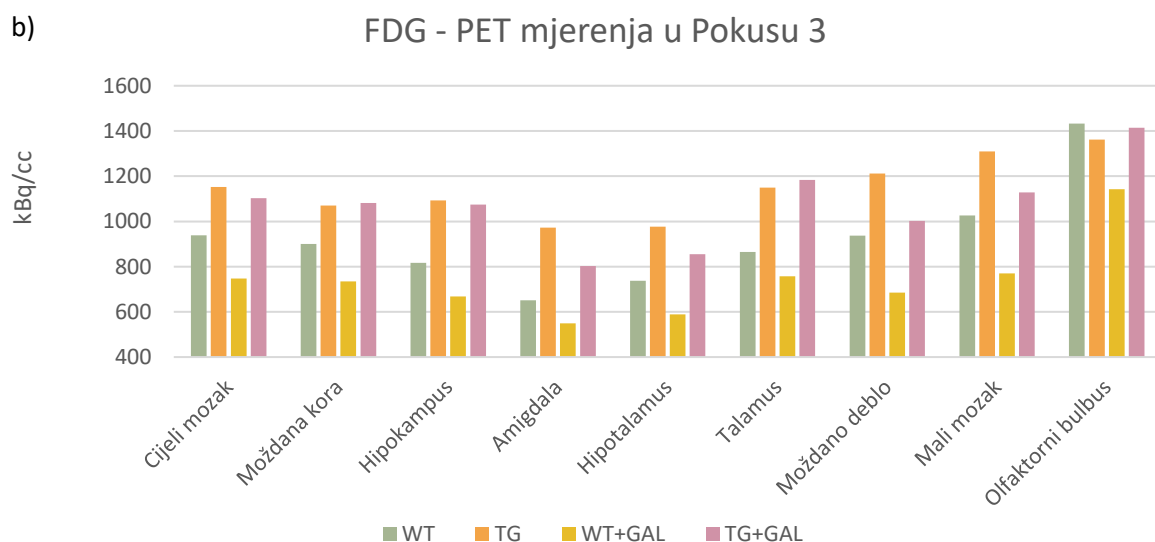
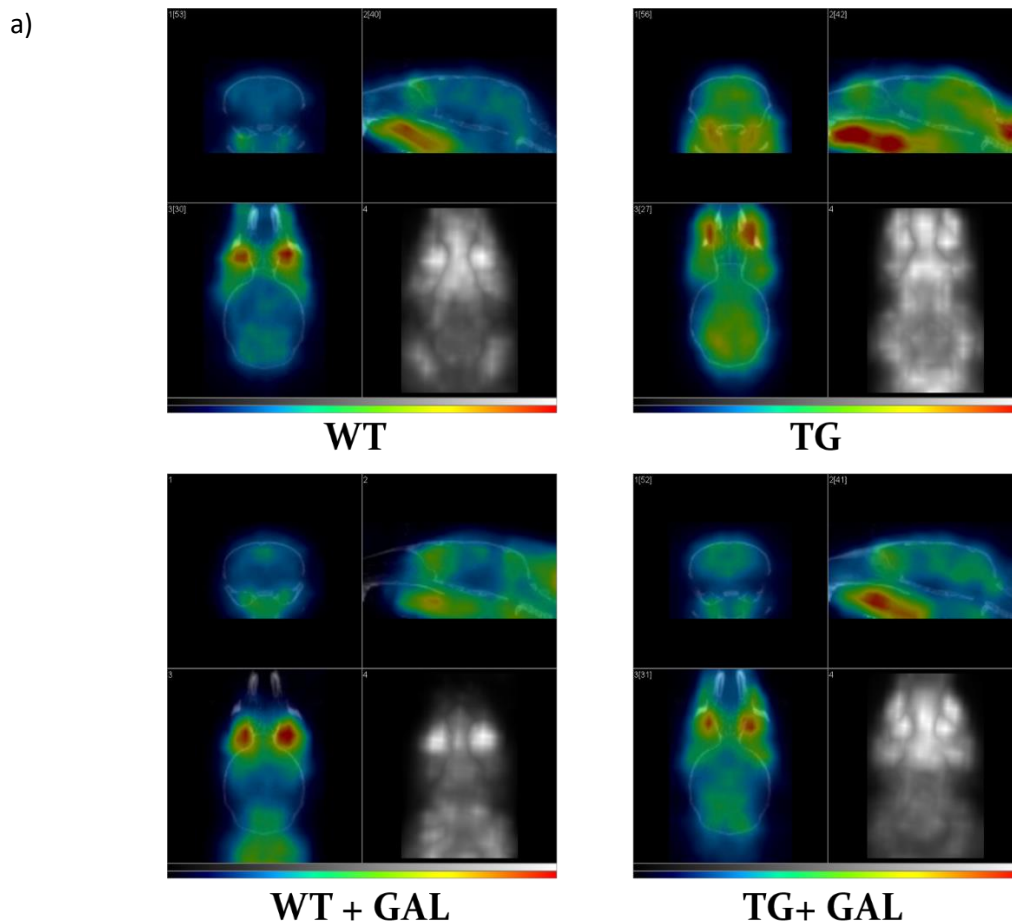
**Slika 49 EPM test uzdignutog križnog labirinta proveden u miševa u Pokusu 4.**

Svaki box-plot dijagram prikazuje odnos minimuma, maksimuma, donjega i gornjega kvartila te medijana (a) vremena provedenog u otvorenim dijelovima instrumenta i (b) frekvencije ulaska u otvorene dijelove instrumenta, dok točke na dijagramu predstavljaju pojedine vrijednosti životinje, a crno obojene točke predstavljaju vrijednosti s najvećim odstupanjem pojedine grupe (outlieri). WT = kontrolne životinje; TG = transgenične životinje; WT+GAL = kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; TG+GAL = transgenične životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom.  $N=9$  (WT, TG, WT+GAL), 10 (TG+GAL). Podaci su obrađeni Kruskal-Wallis neparametrijskim one-way ANOVA testom s Wilcoxon signed rank post-hoc testom za međusobnu analizu skupina. \*  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

### 5.2.2. FDG-PET mjerenja

Unos glukoze u stanice mozga mjereno je FDG-PET skeniranjem u 2 miša po skupini u Pokusu 3 i 4 miša po skupini u Pokusu 4, koji su odabrani kao reprezentativni temeljem rezultata kognitivnih ispitivanja, odnosno, odabrani su oni miševi koji su imali kognitivne performanse najbliže prosječnoj vrijednosti ispitivane skupine.

*In vivo* metabolička mjerenja unosa glukoze u Pokusu 3 pokazala su hipermetabolizam u transgeničnih miševa u odnosu na kontrolne (+23% na razini cijelog mozga), s istaknutijim razlikama u amigdali (+50%), hipokampusu (+34%) te hipotalamusu i talamusu (+33%) (Slika 50b). Tretman oralnom galaktozom snizio je unos glukoze u transgeničnih miševa 4% na razini cijelog mozga, s najizraženijim sniženjem u amigdali (-18%), moždanom deblu (-17%), malom mozgu (-14%) i hipotalamusu (-12%) (Slika 50b). Terapija oralnom galaktozom također je snizila vrijednosti u kontrolnih životinja, i to 20% na nivou čitavog mozga, a ponajviše u moždanom deblu (-27%), malom mozgu (-25%), hipotalamusu i olfaktornom bulbusu (-20%) (Slika 50b).

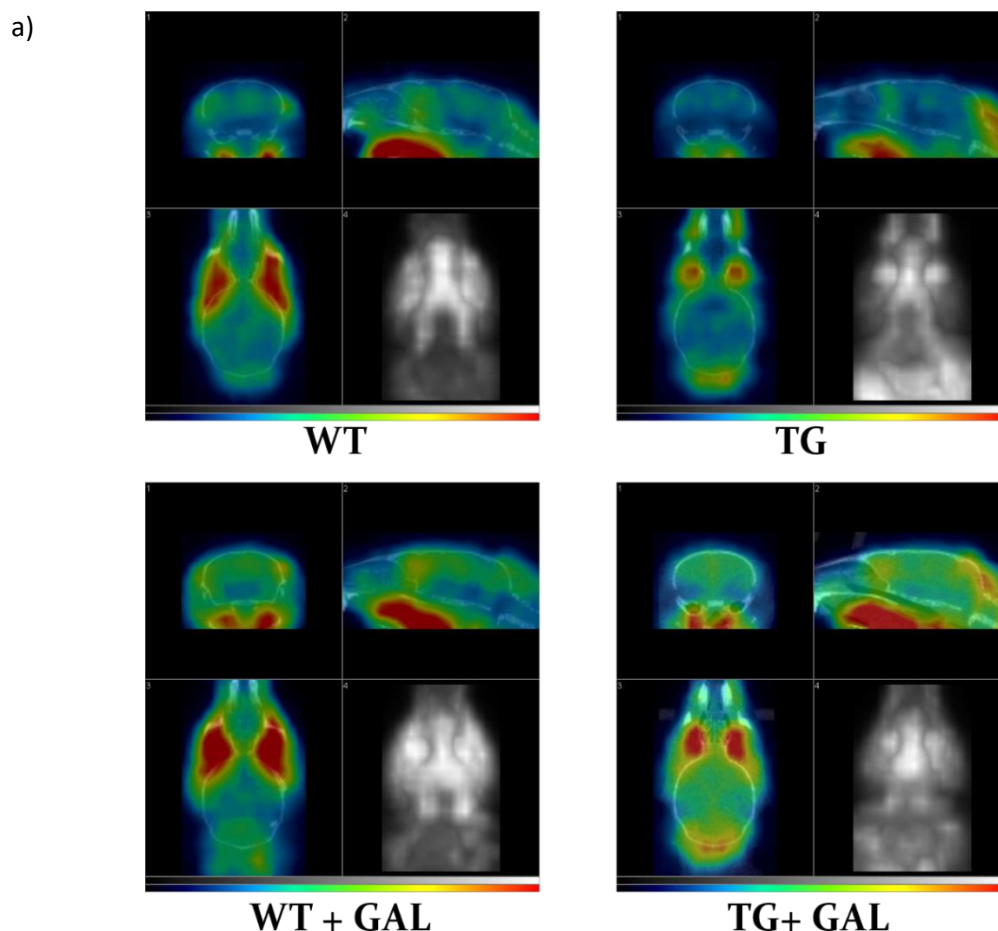


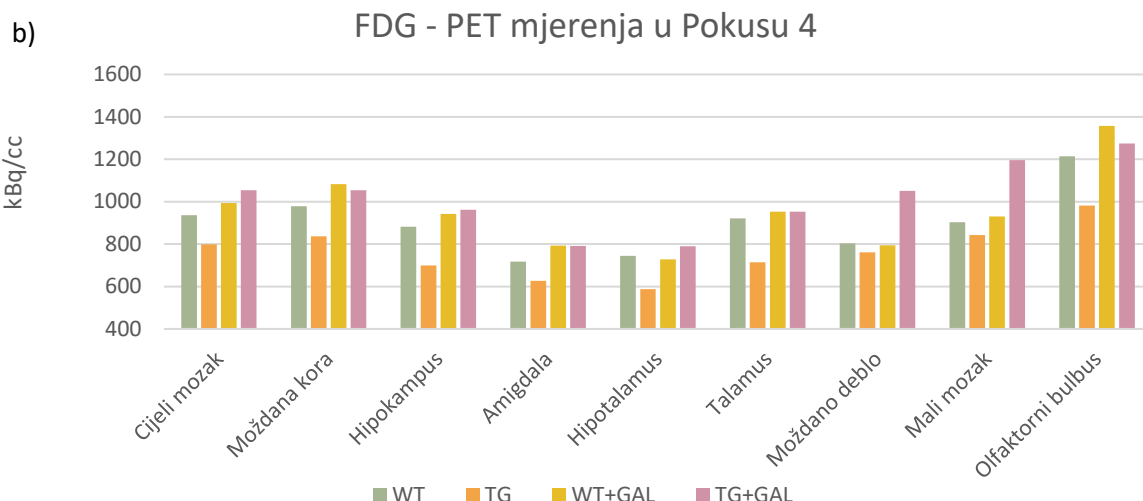
**Slika 50** Pozitronska emisijska tomografija (PET) unosa radioaktivno obilježenog analoga glukoze fluorodeoksiglukoze (FDG) u mozgu miševa u Pokusu 3.

(a) Reprezentativne slike PET skeniranja; (b) odabrane regije od interesa analizirane su PMOD™ softverom za analizu unosa glukoze/stope metabolizma. Svaki stupac predstavlja srednju vrijednost izračunate količine kilobekerela po kubičnom centimetru (kBq/cc) cijelog mozga ili pojedine regije. WT = kontrolne životinje; TG = transgenične životinje; WT+GAL = kontrolne životinje koje su primile

*dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; TG+GAL = transgenične životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom. N=2.*

Transgenični miševi u Pokusu 4 pokazali su sniženi metabolizam glukoze u mozgu u odnosu na kontrolne miševe na razini čitavog mozga (-15%) te u svim regijama od interesa; najveće promjene izmjerene su u talamusu (-23%), hipotalamusu i hipokampusu (-21%) te olfaktornom bulbusu (-19%) (Slika 51b). Tretman oralnom galaktozom uspješno je korigirao hipometabolizam transgeničnih životinja; na razini cijelog mozga unos glukoze bio je 32% veći u odnosu na netretirane transgenične životinje, s najistaknutijim primjenama u malom mozgu (+42%), moždanom deblu i hipokampusu (+38%) te hipotalamusu (+34%) (Slika 51b). Tretman oralnom galaktozom nije značajnije utjecao na kontrolne životinje; izmjereno je 6%-tno povećanje unosa glukoze na razini cijelog mozga s manjim povećanjima i smanjenjima u regijama od interesa (Slika 51b).



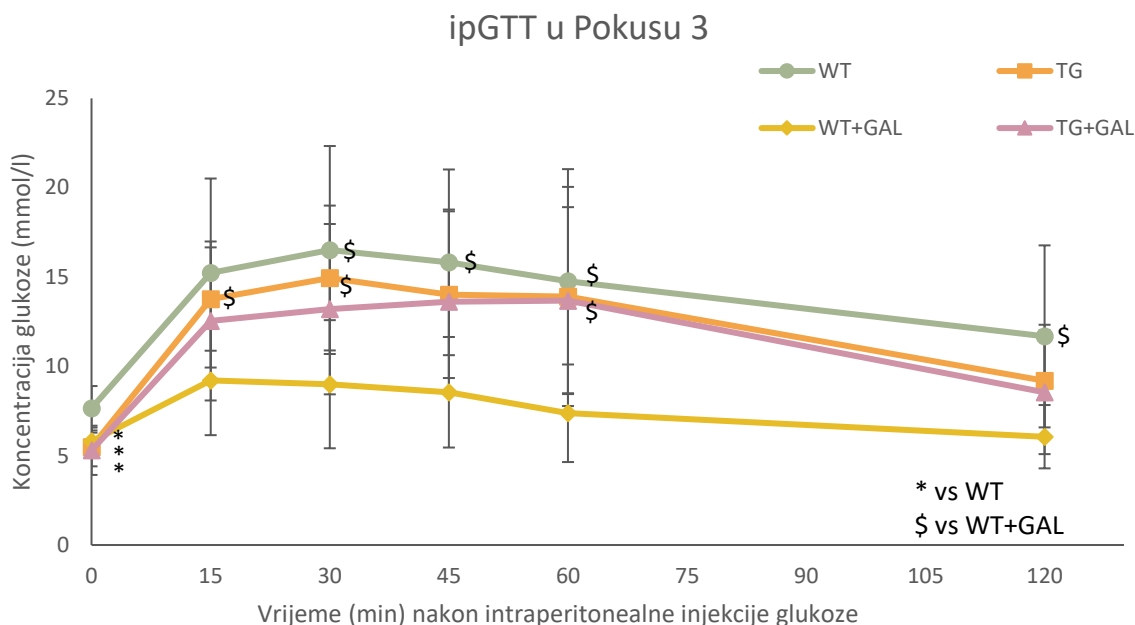


**Slika 51 Pozitronska emisijska tomografija (PET) unosa radioaktivno obilježenog analoga glukoze fluorodeoksiglukoze (FDG) u mozgu miševa u Pokusu 4.**

(a) Reprezentativne slike PET skeniranja; (b) odabrane regije od interesa analizirane su PMOD™ softverom za analizu unosa glukoze/stope metabolizma. Svaki stupac predstavlja srednju vrijednost izračunate količine kilobekerela po kubičnom centimetru (kBq/cc) cijelog mozga ili pojedine regije. WT = kontrolne životinje; TG = transgenične životinje; WT+GAL = kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; TG+GAL = transgenične životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom. N=4.

### 5.2.3. Intraperitonealni test tolerancije glukoze (ipGTT)

U Pokusu 3 bazalne razine glukoze u kontrolnih miševa bile su značajno više od svih ostalih ispitivanih skupina (+27% do +39%,  $p < 0,05$ ). Tolerancija transgeničnih miševa na glukozu nije se značajno razlikovala u odnosu na kontrolne miševe kao što tretman galaktozom u transgeničnih miševa nije doveo do promjene tolerancije glukoze u odnosu na netretirane transgenične životinje. Kontrolni miševi tretirani dvomjesečnom terapijom oralne galaktoze imali su snižene vrijednosti glukoze u krvi u svim vremenskim točkama nakon primjene intraperitonealne injekcije otopine glukoze, sa statistički značajnim razlikama u svim vremenskim točkama nakon primjene ip glukoze: 15 min (-33% vs. TG,  $p = 0,031$ ), 30 min (-46% vs. WT,  $p = 0,028$ ; -40% vs. TG,  $p = 0,027$ ), 45 min (-46% vs. WT,  $p = 0,016$ ), 60 min (-50% vs. WT,  $p = 0,035$ ; -46% vs. TG+GAL,  $p = 0,024$ ) te 120 min (-48% vs. WT,  $p = 0,046$ ) (Slika 52).

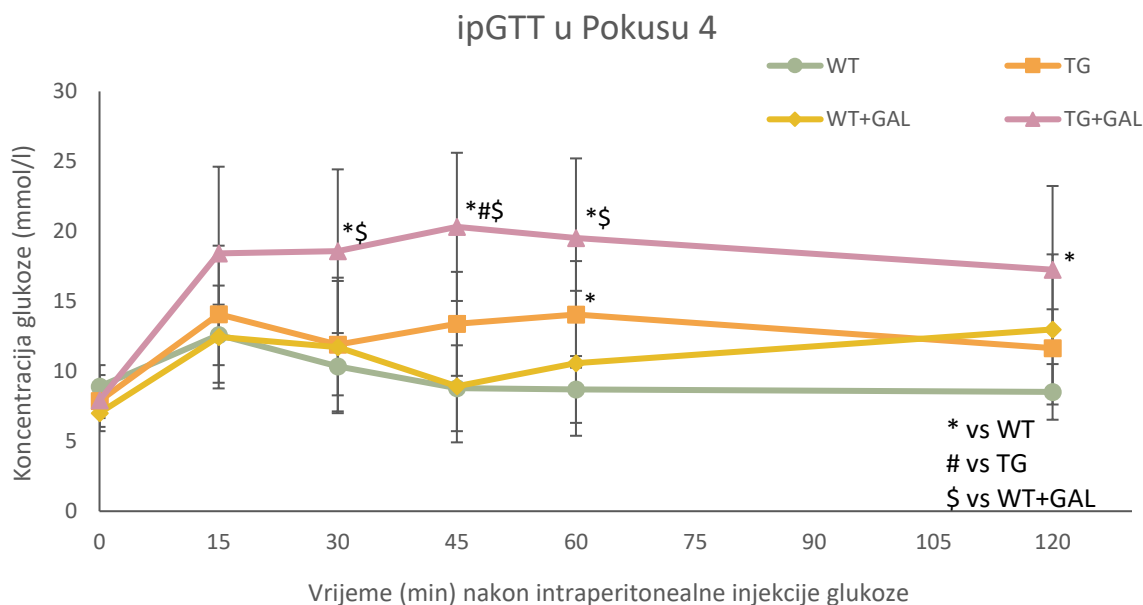


**Slika 52 Intraperitonealni test tolerancije glukoze u miševa u Pokusu 3.**

Svaka točka u grafu predstavlja vrijednost koncentracije glukoze (mmol/l) izraženu kao srednja vrijednost  $\pm$  SD u multoj točki prije primjene intraperitonealne injekcije otopine glukoze te 15, 30, 45, 60 i 120 minuta nakon nje. WT = kontrolne životinje, TG = transgenične životinje, WT+GAL = kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; TG+GAL = transgenične životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom. N=9 (WT, TG), 8 (WT+GAL), 10 (TG+GAL). Podaci su analizirani two-way ANOVA testom za ponovljena mjerenja uz Tukey post-hoc test za međusobnu analizu skupina u pojedinoj vremenskoj točki. \*  $p < 0,05$  u usporedbi s WT; \$  $p < 0,05$  u usporedbi s WT+GAL.

U Pokusu 4 transgenični miševi pokazali su lošiju toleranciju glukoze od kontrolnih u svim vremenskim točkama, sa statistički značajnim razlikama 45 min nakon primjene: 15 min (+12%), 30 min (+15%), 45 min (+ 52%,  $p=0,059$ ), 60 min (+62%,  $p=0,016$ ), 120 min (+37%). Tretman galaktozom nije imao značajnijeg utjecaja na kontrolne miševe, dok je u transgeničnih doveo do daljnjeg pogoršanja tolerancije glukoze u svim ispitivanim vremenskim točkama, sa statistički značajnim povećanjem razine glukoze 30 min (+80% vs. WT,  $p=0,007$ ; +58% vs. WT+GAL,  $p=0,046$ ), 45 min (+131% vs. WT,  $p < 0,001$ ; +52% vs. TG,  $p=0,02$ ; +127% vs. WT+GAL,  $p < 0,001$ ), 60 min (+39% vs. WT,  $p < 0,001$ ; +85% vs. WT+GAL,  $p=0,009$ ) i 120 min nakon primjene glukozne otopine (+103% vs. WT,  $p=0,005$ ) (Slika 53).





**Slika 53 Intraperitonealni test tolerancije glukoze u miševa u Pokusu 4.**

Svaka točka u grafu predstavlja vrijednost koncentracije glukoze (mmol/l) izraženu kao srednja vrijednost  $\pm$  SD u nultoj točki prije primjene intraperitonealne injekcije otopine glukoze te 15, 30, 45, 60 i 120 minuta nakon nje. WT = kontrolne životinje, TG = transgenične životinje, WT+GAL = kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; TG+GAL = transgenične životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom. N=8 (WT), 9 (TG), 10 (TG+GAL, WT+GAL). Podaci su analizirani two-way ANOVA testom za ponovljena mjerenja uz Tukey post-hoc test za međusobnu analizu skupina u pojedinoj vremenskoj točki. \*  $p < 0,05$  u usporedbi s WT; #  $p < 0,05$  u usporedbi s TG; \$  $p < 0,05$  u usporedbi s WT+GAL.

**5.2.4. Biokemijski parametri**

Sve biokemijske parametre mjerene u Pokusu 3 prikazuje Tablica 7. U odnosu na kontrolne, transgenične životinje imale su snižene razine inzulina u plazmi (-55% TG vs. WT,  $p=0,034$ ), a povišene razine topivog amiloida  $\beta$  (+54% WT+GAL vs. WT,  $p=0,041$ ). Tretman galaktozom utjecao je na povišenje razina inzulina u plazmi transgeničnih životinja (+131% TG+GAL vs. TG,  $p=0,001$ ).

**Tablica 7 Izmjereni biokemijski parametri iz uzoraka krvne plazme i hipokampusa miševa u Pokusu 3.**

	WT	TG	WT+GAL	TG+GAL
glukoza (plazma)	9,34 $\pm$ 1,92 N=10	8,80 $\pm$ 1,16 N=9	9,64 $\pm$ 2,33 N=9	8,09 $\pm$ 1,64 N=10
galaktoza (plazma)	151,01 $\pm$ 21,32 N=10	139,42 $\pm$ 39,23 N=8	137,87 $\pm$ 26,97 N=9	113,93 $\pm$ 24,47 * N=9
inzulin (plazma)	9,60 $\pm$ 6,32 N=10	4,34 $\pm$ 2,24 * N=8	12,46 $\pm$ 7,03 # N=9	14,00 $\pm$ 10,91 # N=9
GLP-1 (plazma)	12,40 $\pm$ 9,15 N=7	16,04 $\pm$ 8,81 N=8	16,06 $\pm$ 0,55 N=9	15,20 $\pm$ 8,92 N=10



	WT	TG	WT+GAL	TG+GAL
aGLP-1 (plazma)	2,95 ± 1,28 N=10	2,43 ± 0,29 N=8	2,72 ± 0,55 N=9	2,45 ± 0,44 N=9
Aβ (hipokampus)	0,54 ± 0,19 N=6	0,83 ± 0,24 * N=6	0,64 ± 0,14 N=6	0,96 ± 0,30 \$ N=6

Podaci su izraženi kao srednja vrijednost ± SD. WT – kontrolne životinje; TG – transgenične životinje; WT+GAL – kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; TG+GAL – transgenične životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; GLP-1 – glukagonu sličan peptid 1; aGLP-1 – aktivni oblik GLP-1; Aβ – amiloid β. Podaci su obrađeni Kruskal-Wallis neparametrijskim one-way ANOVA testom s Wilcoxon signed rank post-hoc testom za međusobnu analizu skupina. \*  $p < 0,05$  u usporedbi s WT; #  $p < 0,05$  u usporedbi s TG; \$  $p < 0,05$  u usporedbi s WT+GAL.

U Pokusu 4 terapija oralnom galaktozom utjecala je u transgeničnih životinja na povećanje razina amiloida β u hipokampusu (+66% TG+GAL vs. TG,  $p=0,03$ ). Tablica 8 prikazuje rezultate biokemijskih mjerenja u Pokusu 4.

**Tablica 8 Izmjereni biokemijski parametri iz uzoraka krvne plazme i hipokampusa miševa u Pokusu 4.**

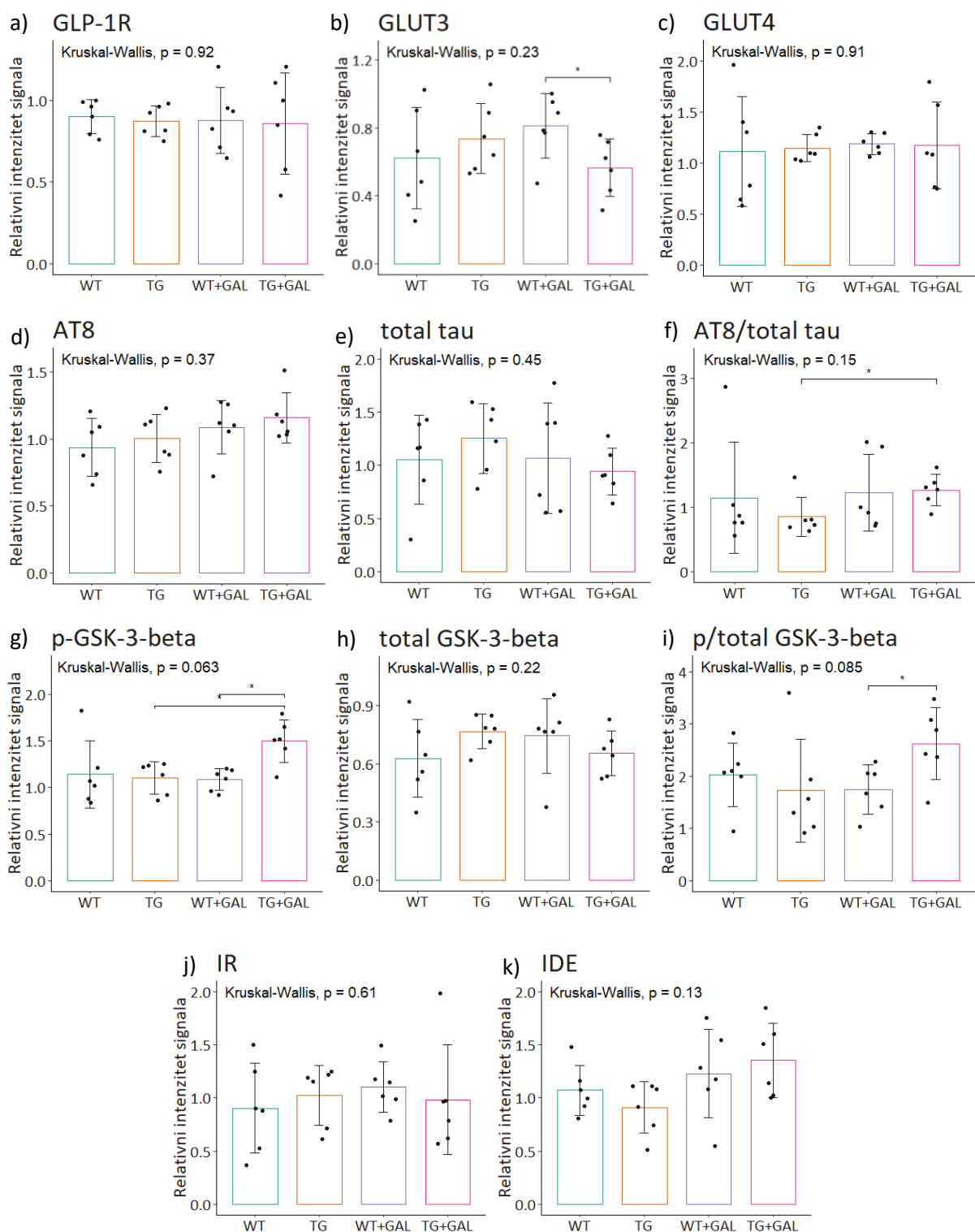
	WT	TG	WT+GAL	TG+GAL
glukoza (plazma)	10,41 ± 1,46 N=9	11,08 ± 2,16 N=9	11,61 ± 1,85 N=10	10,68 ± 1,89 N=10
galaktoza (plazma)	48,77 ± 8,29 N=9	53,62 ± 9,72 N=9	49,46 ± 7,80 N=10	45,46 ± 10,35 N=10
inzulin (plazma)	6,02 ± 2,91 N=7	4,89 ± 2,71 N=9	4,95 ± 2,48 N=8	3,04 ± 3,17 N=10
GLP-1 (plazma)	15,06 ± 5,01 N=9	16,40 ± 8,66 N=9	16,85 ± 7,38 N=10	16,63 ± 6,03 N=10
aGLP-1 (plazma)	4,41 ± 0,95 N=8	3,98 ± 0,30 N=9	3,95 ± 0,28 N=9	4,17 ± 0,29 N=8
Aβ (hipokampus)	1,23 ± 0,40 N=6	1,18 ± 0,53 N=6	1,49 ± 0,54 N=6	1,96 ± 0,55 ** N=5

Podaci su izraženi kao srednja vrijednost ± SD. WT – kontrolne životinje; TG – transgenične životinje; WT+GAL – kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; TG+GAL – transgenične životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; GLP-1 – glukagonu sličan peptid 1; aGLP-1 – aktivni oblik GLP-1; Aβ – amiloid β. Podaci su obrađeni Kruskal-Wallis neparametrijskim one-way ANOVA testom s Wilcoxon signed rank post-hoc testom za međusobnu analizu skupina. \*  $p < 0,05$  u usporedbi s WT; #  $p < 0,05$  u usporedbi s TG.

### 5.2.5. Western blot

U Pokusu 3 izmjerena je smanjena ekspresija prijenosnika za glukozu GLUT3 u hipokampusu transgeničnih miševa u odnosu na kontrolne miševе nakon terapije oralnom galaktozom (-30% TG+GAL vs. WT+GAL,  $p=0,026$ ; Slika 54b). Oralna galaktoza utjecala je na povećanje omjera ekspresije fosforiliranog i ukupnog proteina tau u transgeničnih životinja (+49% TG+GAL vs. TG,  $p=0,0411$ ; Slika 54f). Također, u transgeničnih je životinja povećana ekspresija

fosforiliranog GSK3- $\beta$  nakon tretmana oralnom galaktozom (+36% TG+GAL vs. TG,  $p=0,026$ ; +39% TG+GAL vs. WT+GAL,  $p=0,0152$ ; Slika 54g), te je povećan omjer fosforiliranog i ukupnog GSK3- $\beta$  (+50% TG+GAL vs. WT+GAL,  $p=0,026$ ; Slika 54i). Ispitivane skupine nisu se značajno razlikovale u ekspresiji GLP-1 receptora, GLUT4, IR i IDE (Slika 54a, c, j, k).

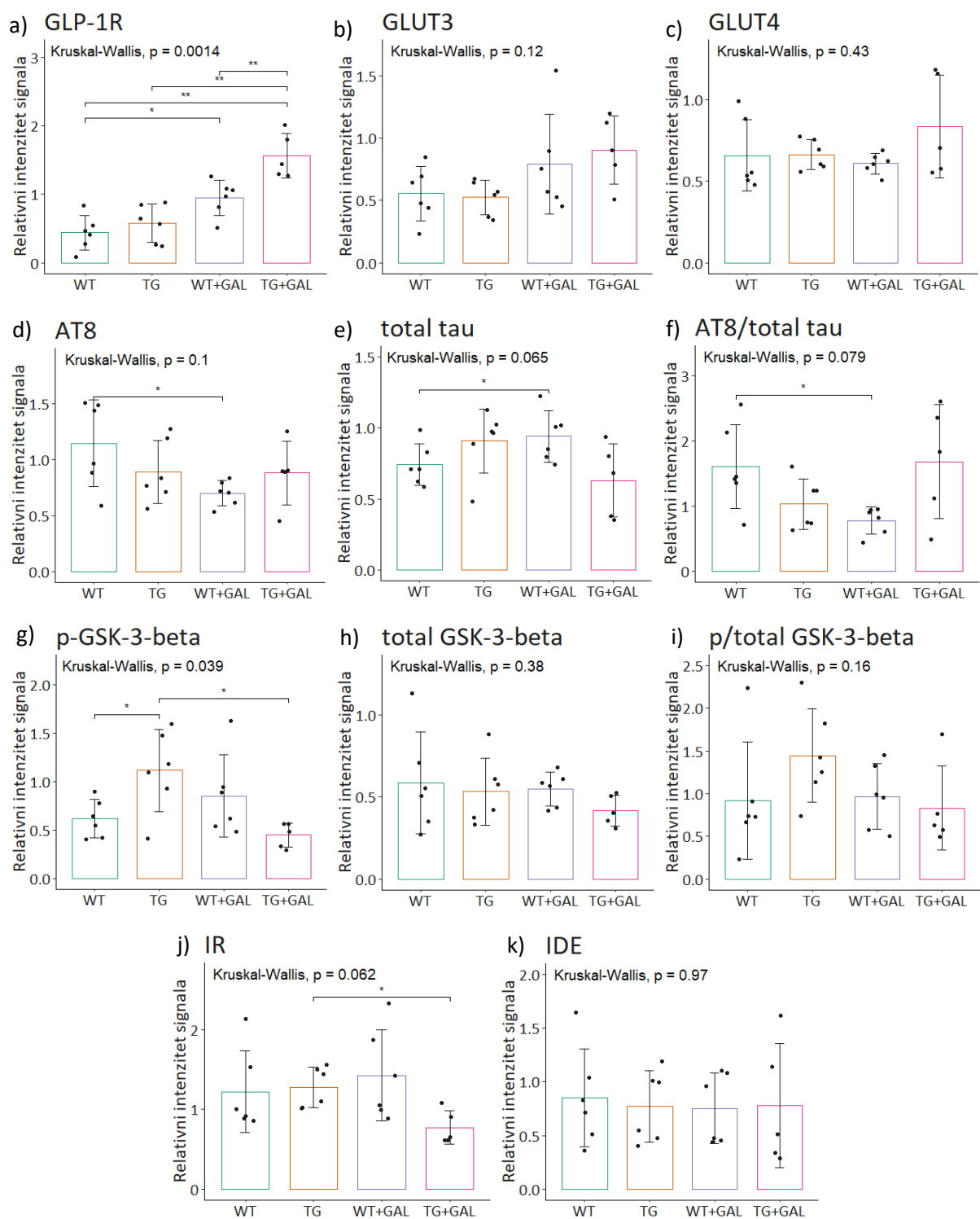


**Slika 54** Rezultati Western blot mjerenja ekspresije proteina povezanih s inzulinskim sustavom, nosačima za glukozu, amiloidnom i tau patologijom te GLP-1 receptorom u hipokampusu miševa u Pokusu 3.

Svaki stupac predstavlja srednju vrijednost  $\pm$  SD relativnog intenziteta signala na Western blotu normaliziranog prema ukupnom sadržaju proteina mjenog preko ekspresije  $\beta$ -aktina ili  $\beta$ -tubulina u uzorcima hipokampusa. Pojedinačne točke na stupcima predstavljaju vrijednost relativnog intenziteta signala pojedine životinje. Grafovi prikazuju ekspresiju (a) receptora za glukagonu sličan peptid-1 (GLP-1R); (b) prijenosnika za glukozu 3 (GLUT3); (c) prijenosnika za glukozu 4 (GLUT4); (d) proteina tau fosforiliranog serinu 202 i treoninu 205 (AT8); (e) ukupnog proteina tau; (g) fosforilirane glikogen

*sintaza kinaze 3 beta (p-GSK-3-β); (h) ukupne glikogen sintaza kinaze 3 beta (GSK-3-β); (j) inzulinskog receptora (IR); (k) enzima koji razgrađuje inzulin (IDE) te omjere (f) fosforiliranog i ukupnog proteina tau te (i) fosforilirane i ukupne GSK-3-β. WT – kontrolne životinje; TG – transgenične životinje; WT+GAL – kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; TG+GAL – transgenične životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom. N=6. Podaci su obrađeni Kruskal-Wallis neparametrijskim one-way ANOVA testom s Wilcoxon signed rank post-hoc testom za međusobnu analizu skupina. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01.*

Ekspresija receptora za GLP-1 u Pokusu 4 povećana je nakon tretmana oralnom galaktozom u kontrolnih (+116% WT+GAL vs. WT, p=0,015) te u još i većoj mjeri u transgeničnih miševa (+169% TG+GAL vs. TG, p=0,004; +64% TG+GAL vs. WT+GAL, p=0,004; +255% TG+GAL vs. WT, p=0,004; Slika 55a). Ekspresija ukupnog proteina tau bila je povećana u kontrolnih miševa nakon tretmana oralnom galaktozom (+27% WT+GAL vs. WT, p=0,041; Slika 55e), dok je ekspresija fosforiliranog proteina tau AT8 bila smanjena (-39% WT+GAL vs. WT, p=0,041; Slika 55d), kao i omjer fosforiliranog i ukupnog proteina tau (-52% WT+GAL vs. WT, p=0,026; Slika 55). U transgeničnih je miševa nađena povišena ekspresija fosforiliranog GSK3-β u hipokampusu (+81% TG vs. WT, p=0,041), koju je tretman oralnom galaktozom snizio na kontrolne vrijednosti (-60% TG+GAL vs. TG, p=0,03; Slika 55g). Statistički značajne razlike nije bilo u ekspresiji ukupnog GSK3-β niti u omjeru fosforilirane i ukupne kinaze zbog velikog rasapa rezultata ekspresije ukupnog GSK3-β (Slika 55h, i). Terapija oralnom galaktozom utjecala je na smanjenje ekspresije inzulinskog receptora u transgeničnih životinja (-39% TG+GAL vs. TG, p=0,017; Slika 55j). Ekspresija GLUT3, GLUT4 i IDE nije se značajnije razlikovala među ispitivanim grupama (Slika 55b, c, k).



**Slika 55** Rezultati Western blot mjerenja ekspresije proteina povezanih s inzulinskim sustavom, nosačima za glukozu, amiloidnom i tau patologijom te GLP-1 receptorom u hipokampusu miševa u Pokusu 4.

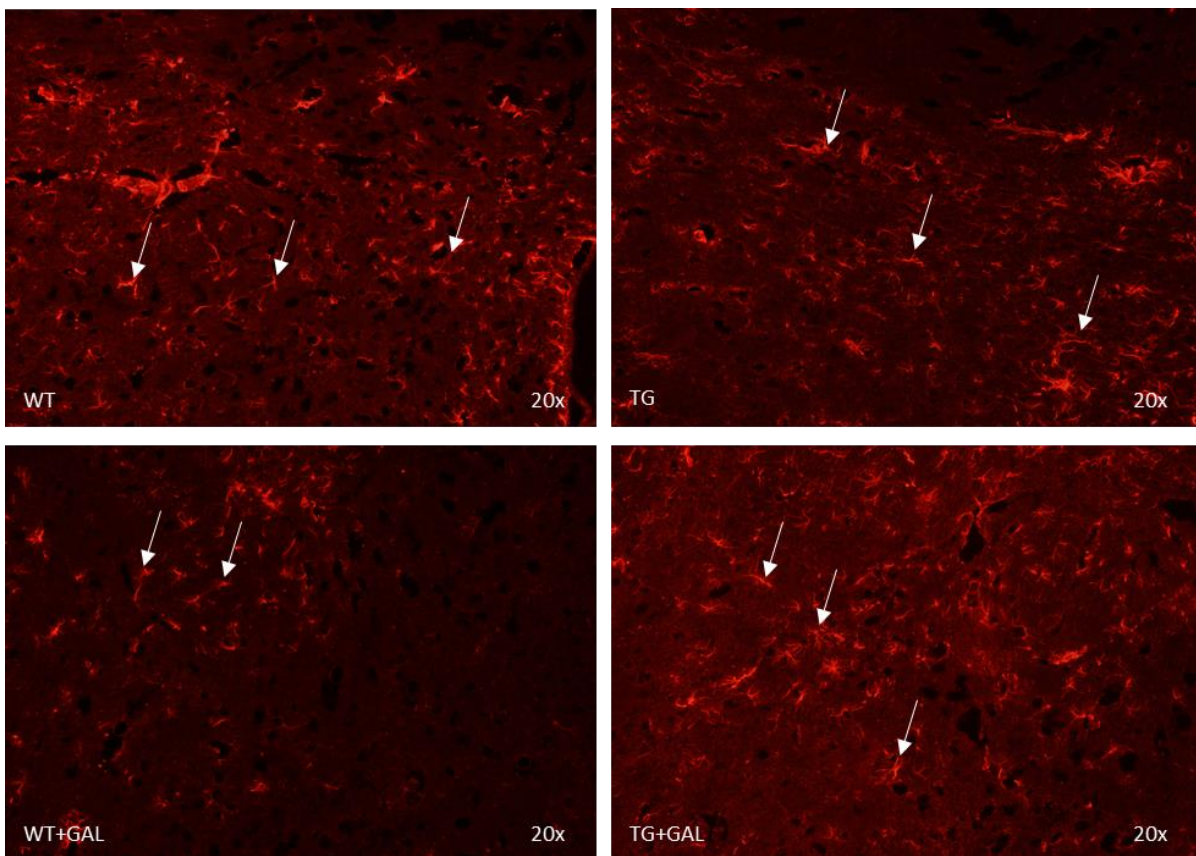
Svaki stupac predstavlja srednju vrijednost  $\pm$  SD relativnog intenziteta signala na Western blotu normaliziranog prema ukupnom sadržaju proteina mjenenog preko ekspresije  $\beta$ -aktina ili  $\beta$ -tubulina u uzorcima hipokampusa. Pojedinačne točke na stupcima predstavljaju vrijednost relativnog intenziteta signala pojedine životinje. Grafovi prikazuju ekspresiju (a) receptora za glukagonu sličan peptid-1 (GLP-1R); (b) prijenosnika za glukozu 3 (GLUT3); (c) prijenosnika za glukozu 4 (GLUT4); (d) proteina tau fosforiliranog serinu 202 i treoninu 205 (AT8); (e) ukupnog proteina tau; (g) fosforilirane glikogen

sintaza kinaze 3 beta ( $p$ -GSK-3- $\beta$ ); (h) ukupne glikogen sintaza kinaze 3 beta (GSK-3- $\beta$ ); (j) inzulinskog receptora (IR); (k) enzima koji razgrađuje inzulin (IDE) te omjere (f) fosforiliranog i ukupnog proteina tau te (i) fosforilirane i ukupne GSK-3- $\beta$ . WT – kontrolne životinje; TG – transgenične životinje; WT+GAL – kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; TG+GAL – transgenične životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom. N=6. Podaci su obrađeni Kruskal-Wallis neparametrijskim one-way ANOVA testom s Wilcoxon signed rank post-hoc testom za međusobnu analizu skupina. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

## 5.2.6. Imunohistokemijska analiza

### 5.2.6.1. Biljeg astrocita GFAP

U Pokusu 3 biljeg astrocita GFAP bio je promijenjen u hipotalamusu kontrolnih miševa nakon tretmana oralnom galaktozom gdje je njegova ekspresija bila smanjena u odnosu na ostale ispitivane skupine, kako prikazuje Slika 56. U ostalim promatranim regijama mozga nisu zabilježene promjene među skupinama.

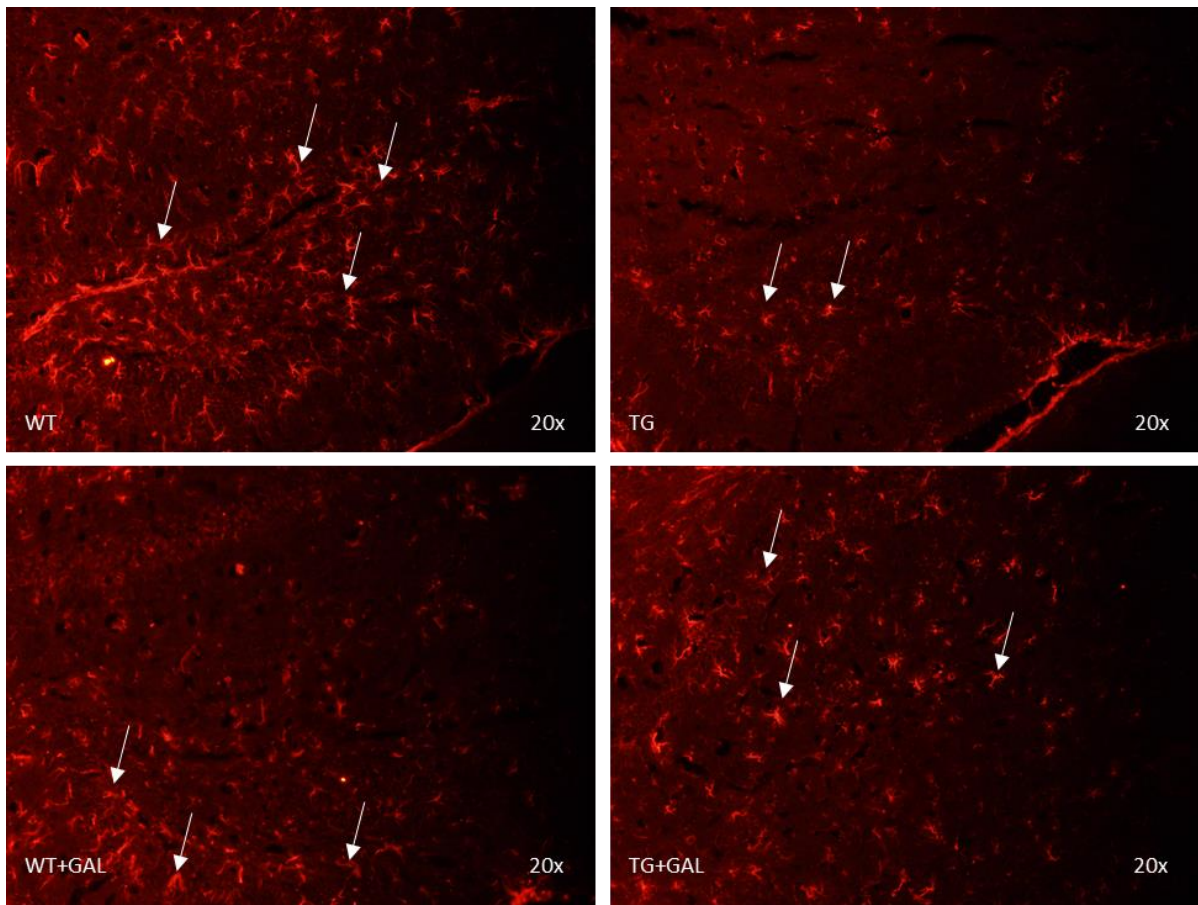


**Slika 56** Ekspresija kiselog vlaknastog proteina glike (GFAP) u hipotalamusu miševa iz Pokusa 3 vizualizirana imunohistokemijskom metodom.

WT – kontrolne životinje; TG – transgenične životinje; WT+GAL – kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; TG+GAL – transgenične životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom. Povećanje na mikroskopu = 20x. Strelice označavaju imunopozitivan signal na protutijelo za GFAP.



U Pokusu 4 uočena je smanjena ekspresija astrocitnog biljega GFAP u hipokampusu i moždanoj kori transgeničnih životinja u usporedbi s kontrolnim. Oralna primjena galaktoze u kontrolnih životinja uzrokovala blago smanjenje ekspresije GFAP u usporedbi s WT životinjama, dok je kod transgeničnih životinja došlo do povećanja ekspresije u usporedbi s TG životinjama. Nisu uočene promjene u ekspresiji u hipotalamusu. Slika 57 prikazuje ekspresiju GFAP-a u hipokampusu miševa iz Pokusa 4.

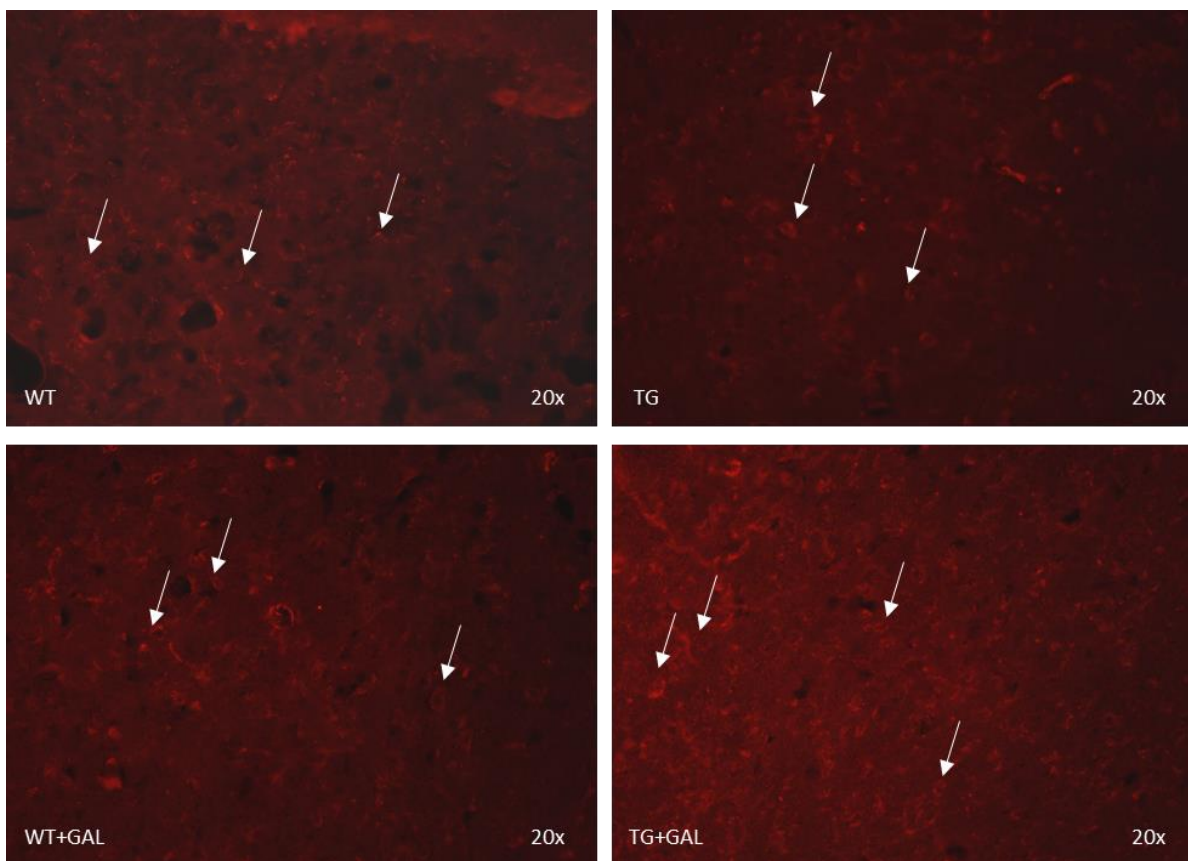


**Slika 57** Ekspresija kiselog vlaknastog proteina glije (GFAP) u hipokampusu miševa iz Pokusa 4 vizualizirana imunohistokemijskom metodom.

WT – kontrolne životinje; TG – transgenične životinje; WT+GAL – kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; TG+GAL – transgenične životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom. Povećanje na mikroskopu = 20x. Strelice označavaju imunopozitivan signal na protutijelo za GFAP.

#### 5.2.6.2. GLP-1 receptor

U Pokusu 3 nađena je povećana ekspresija receptora za GLP-1 u hipotalamusu transgeničnih životinja nakon tretmana oralnom galaktozom, dok u ostalim skupinama i promatranim regijama mozga nije bilo razlika u ekspresiji receptora. Slika 58 prikazuje ekspresiju GLP-1R u hipotalamusu miševa iz Pokusa 3.

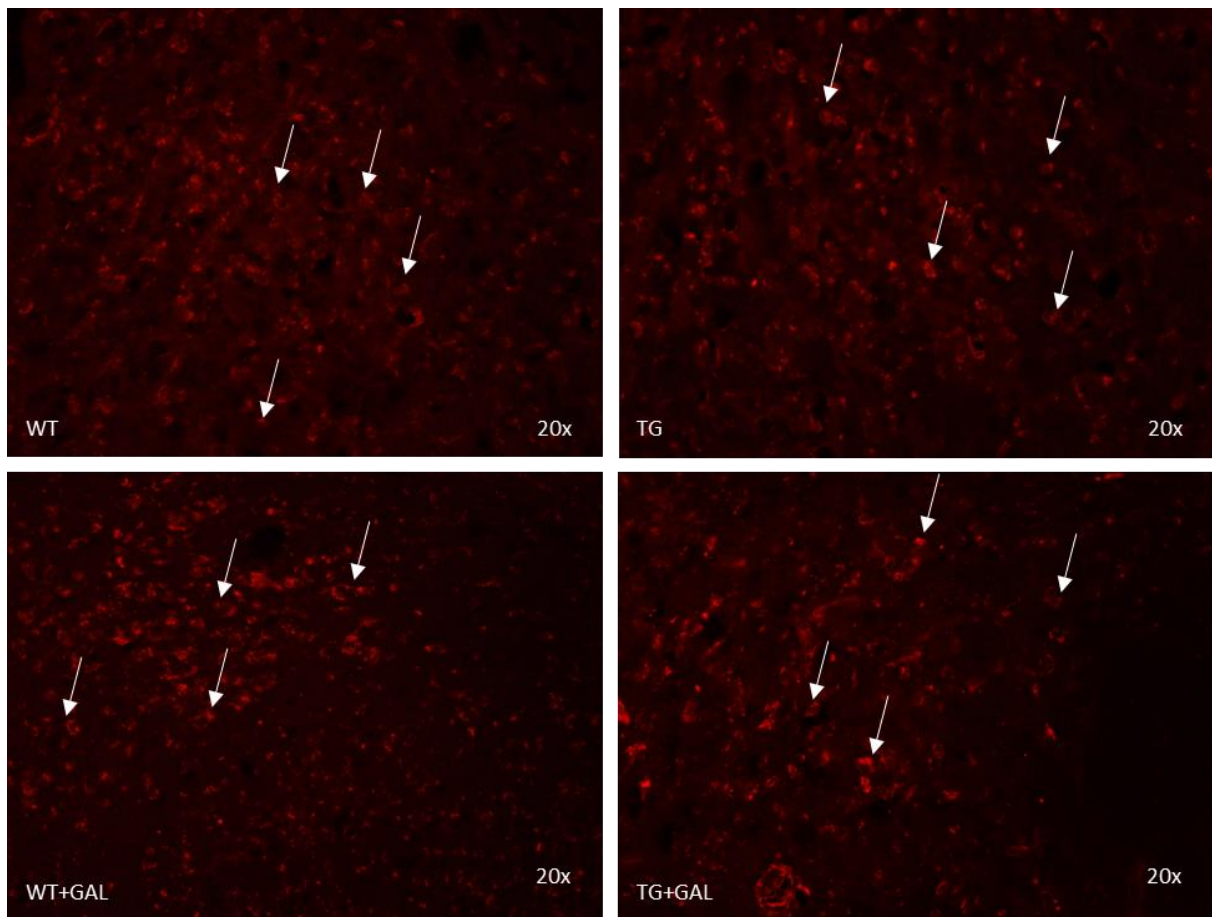


**Slika 58** Ekspresija receptora za glukagonu sličan peptid-1 (GLP-1R) u hipotalamusu miševa iz Pokusa 3 vizualizirana imunohistokemijskom metodom.

WT – kontrolne životinje; TG – transgenične životinje; WT+GAL – kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; TG+GAL – transgenične životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom. Povećanje na mikroskopu = 20x. Strelice označavaju imunopozitivan signal na protutijelo za GLP-1R.

GLP-1R bio je podjednako eksprimiran među skupinama u Pokusu 4. Ekspresija je u svih skupina bila najizraženija u hipotalamusu. Slika 59 prikazuje ekspresiju GLP-1R u hipotalamusu miševa iz Pokusa 4.



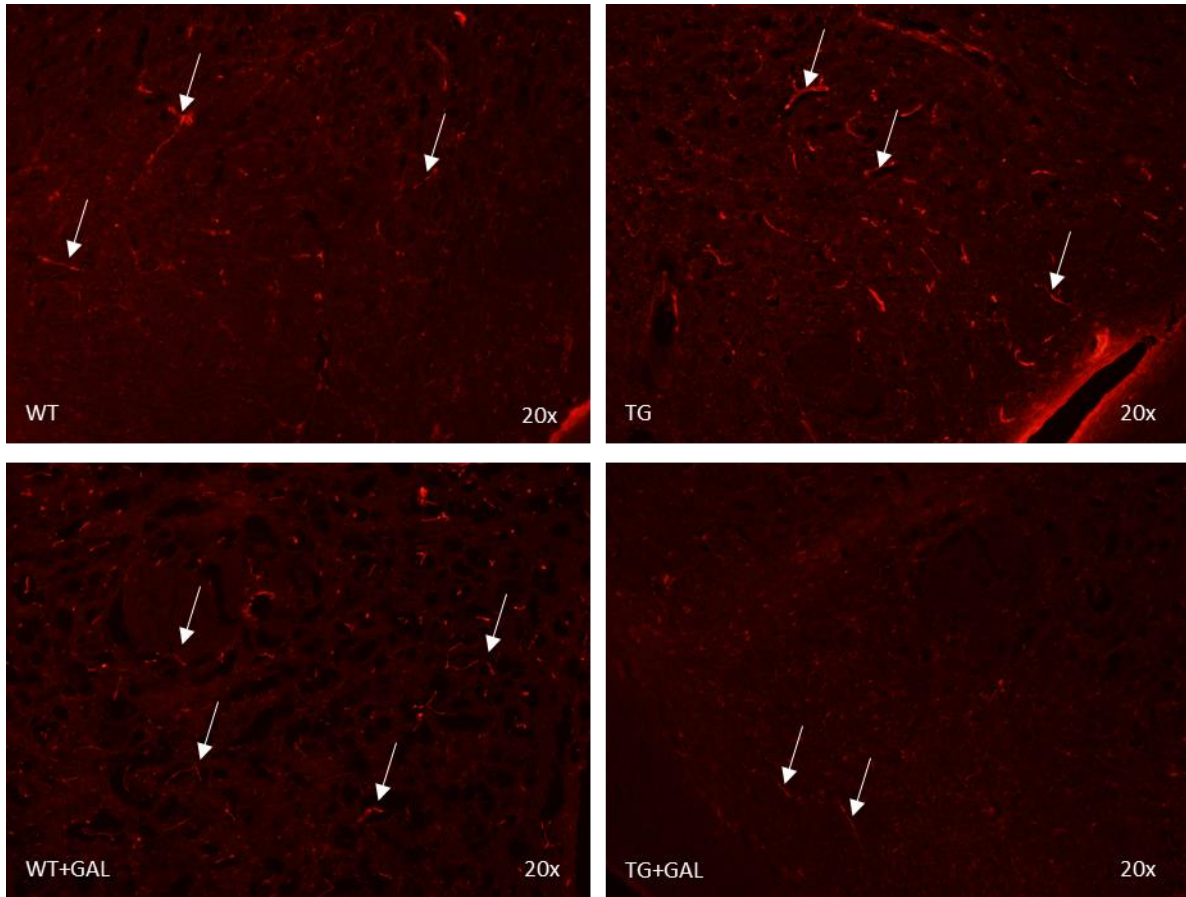


**Slika 59** Ekspresija receptora za glukagonu sličan peptid-1 (GLP-1R) u hipotalamusu miševa iz Pokusa 4 vizualizirana imunohistokemijskom metodom.

WT – kontrolne životinje; TG – transgenične životinje; WT+GAL – kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; TG+GAL – transgenične životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom. Povećanje na mikroskopu = 20x. Strelice označavaju imunopozitivan signal na protutijelo za GLP-1R.

### 5.2.6.3. Fosforilirani protein tau – AT8

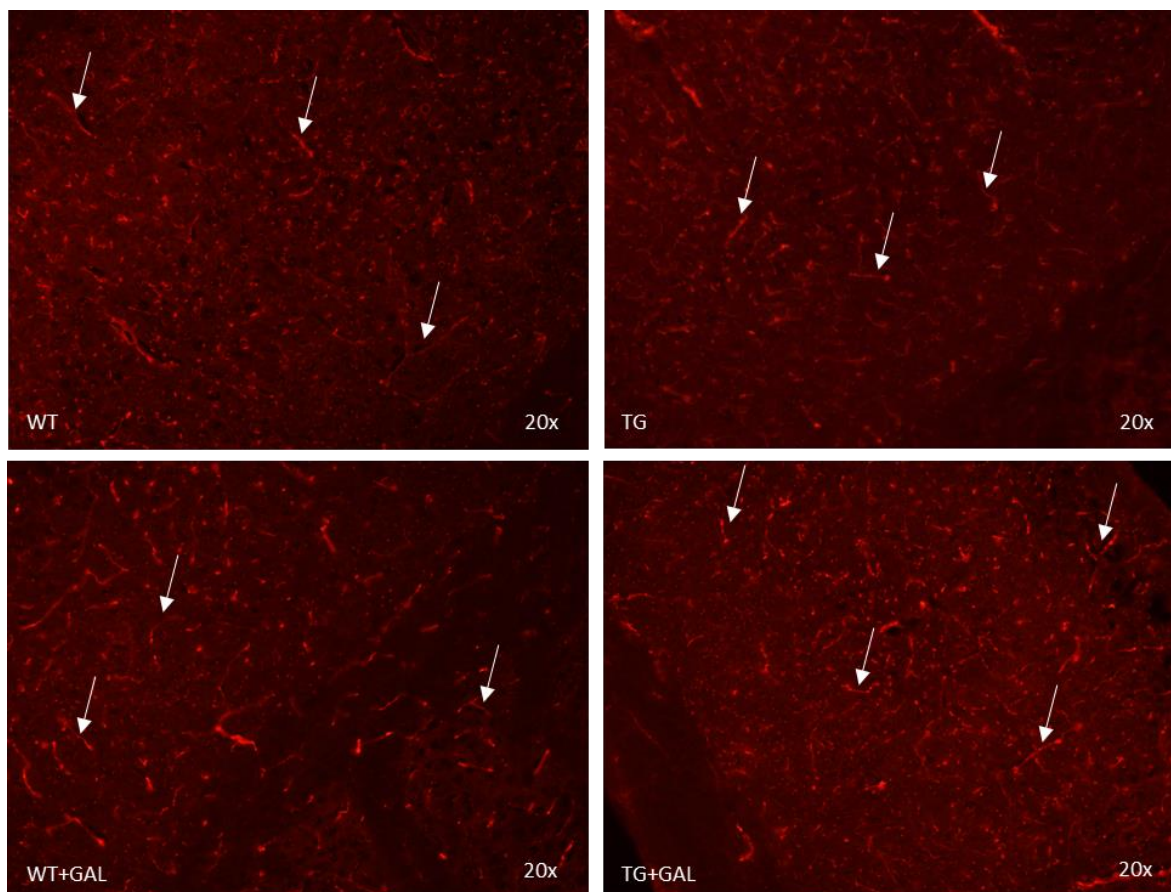
U usporedbi sa kontrolnim životinjama, u Pokusu 3 transgenične životinje imale su podjednaku ekspresiju fosforiliranog proteina tau (AT8). Oralna primjena galaktoze donekle je povećala ekspresiju AT8 u hipotalamusu kontrolnih (WT+GAL) životinja u usporedbi s netretiranim, dok je galaktoza smanjila ekspresiju biljega AT8 u transgeničnim životinjama (TG+GAL) u svim promatranim regijama mozga u usporedbi s netretiranim transgeničnim životinjama. Slika 60 prikazuje ekspresiju AT8 u hipotalamusu.



**Slika 60** Ekspresija fosforiliranog proteina tau na serinu 202 i treoninu 205 (AT8) u hipotalamusu miševa iz Pokusa 3 vizualizirana imunohistokemijskom metodom.

WT – kontrolne životinje; TG – transgenične životinje; WT+GAL – kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; TG+GAL – transgenične životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom. Povećanje na mikroskopu = 20x. Strelice označavaju imunopozitivan signal na protutijelo za AT8.

U Pokusu 4, u usporedbi sa kontrolnim životinjama, transgenične životinje imale su podjednaku ekspresiju AT8. Terapija oralnom galaktozom nije utjecala na ekspresiju kod WT životinja, dok je kod transgeničnih uočen porast ekspresije u hipotalamusu i parijetalnoj kori. Slika 61 prikazuje ekspresiju AT8 u parijetalnoj moždanoj kori miševa u Pokusu 4.



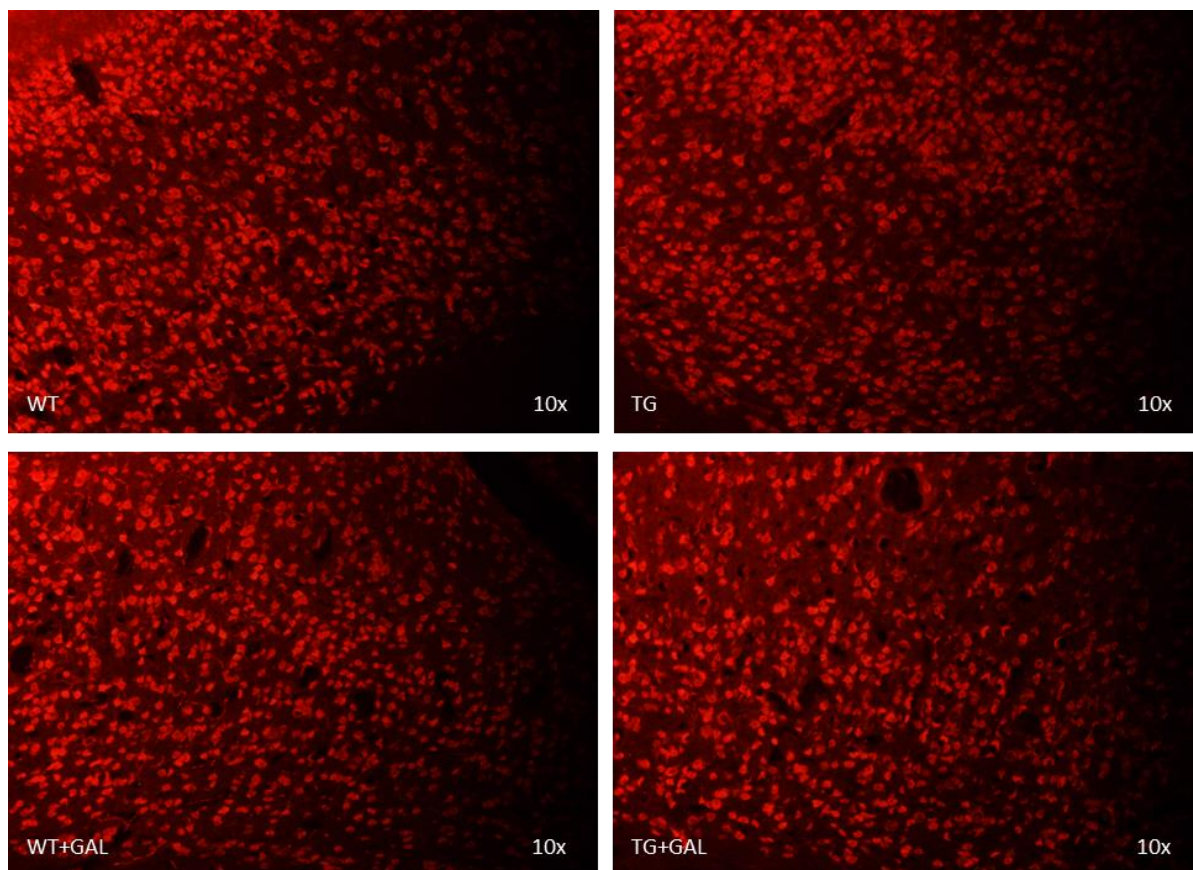
**Slika 61** Ekspresija fosforiliranog proteina tau na serinu 202 i treoninu 205 (AT8) u parijetalnoj moždanoj kori miševa iz Pokusa 4 vizualizirana imunohistokemijskom metodom.

WT – kontrolne životinje; TG – transgenične životinje; WT+GAL – kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; TG+GAL – transgenične životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom. Povećanje na mikroskopu = 20x. Strelice označavaju imunopozitivan signal na protutijelo za AT8.

#### 5.2.6.4. Biljeg neurona NeuN

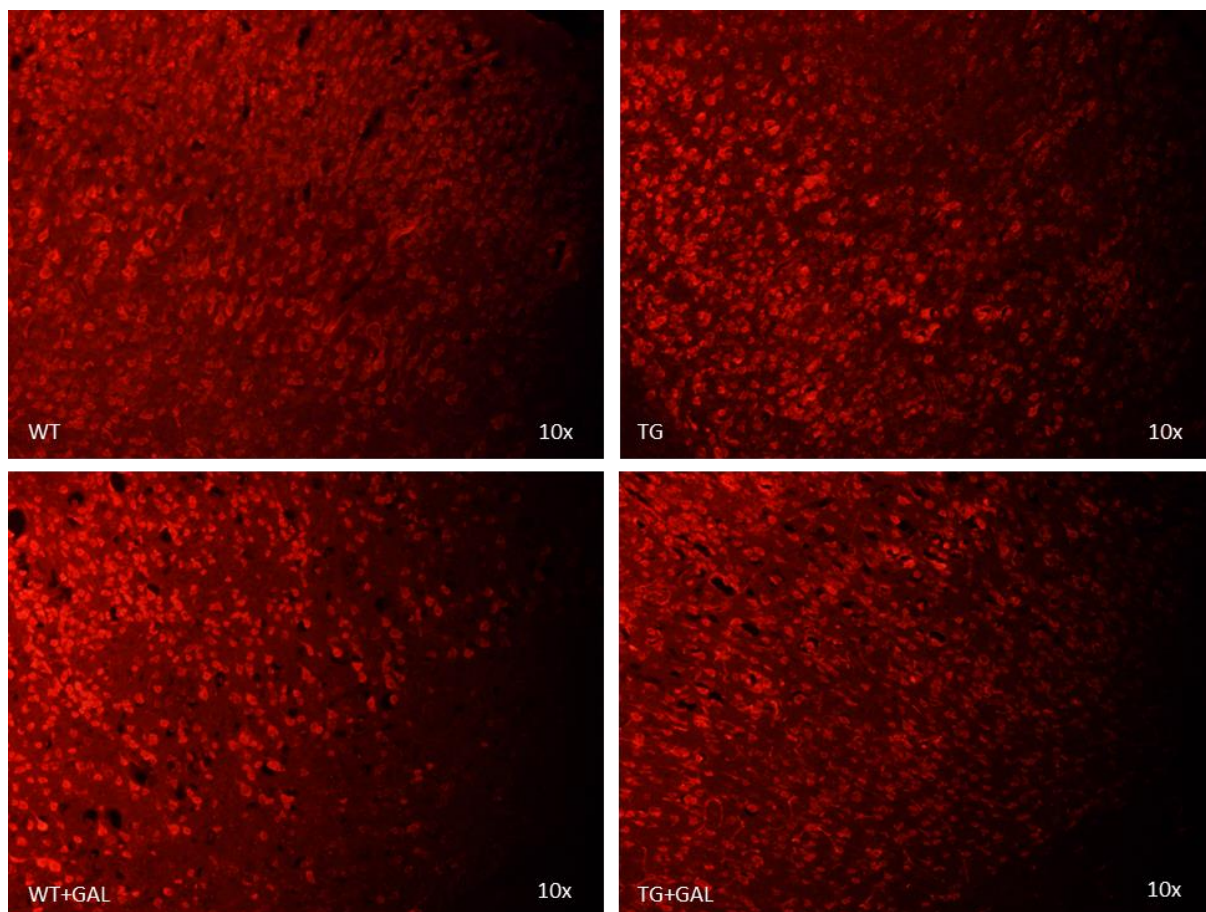
Ekspresija neurona nije se značajnije mijenjala između ispitivanih skupina u Pokusu 3, niti u Pokusu 4. Slika 62 prikazuje imunohistokemijsko bojenje biljegom za neurone NeuN u parijetalnoj moždanoj kori miševa u Pokusu 3, a Slika 63 u Pokusu 4.





**Slika 62** Ekspresija biljega za neurone NeuN u parijetalnoj moždanoj kori miševa u Pokusu 3 vizualizirana imunohistokemijskom metodom.

WT – kontrolne životinje; TG – transgenične životinje; WT+GAL – kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; TG+GAL – transgenične životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom. Povećanje na mikroskopu = 10x.



**Slika 63** Ekspresija biljega za neurone NeuN u parijetalnoj moždanoj kori miševa u Pokusu 4 vizualizirana imunohistokemijskom metodom.

*WT* – kontrolne životinje; *TG* – transgenične životinje; *WT+GAL* – kontrolne životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom; *TG+GAL* – transgenične životinje koje su primile dvomjesečni tretman oralnom galaktozom. Povećanje na mikroskopu = 10x.

## 6. RASPRAVA

Pronalazak novih terapijskih strategija u liječenju AB-a ogroman je izazov u medicinskim istraživanjima radi kompleksne te dijelom još uvijek nepoznate patofiziološke pozadine bolesti. Usto, veliki problem u istraživanju liječenja AB-a predstavlja modeliranje bolesti u eksperimentalnim životinjama i značajne razlike u modelima koji predstavljaju sporadični nasuprot familijarnom modelu bolesti. Obzirom na značajnu ulogu metaboličke podloge u etiopatogenezi AB-a, jedno od mogućih terapijskih rješenja jesu tvari koje mogu uspješno modulirati metaboličke promjene koje su uzrokom bolesti. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati terapijski potencijal i moguće mehanizme povoljnog učinka dugotrajne peroralne primjene galaktoze. Radi potpunijeg shvaćanja djelovanja galaktoze u AB-u i utjecaja na različiti stadij i model bolesti, istraživanje je provedeno u dvije faze dvaju eksperimentalnih modela AB-a; ranom i uznapredovalom štakorskom modelu sporadičnog oblika bolesti te pre-simptomatskom i blagom mišjem modelu familijarnog oblika bolesti.

### 6.1. Učinak peroralno primijenjene galaktoze u štakorskom modelu sporadičnog oblika bolesti

Rezultati Pokusa 1 pokazuju da dvomjesečna terapija oralnom galaktozom u dozi od 200 mg/kg povoljno utječe na kognitivne deficite izazvane streptozotocinom u modelu ranog sAB-a (Slika 16a; Slika 18). Ovi rezultati potvrđuju povoljan učinak oralne galaktoze utvrđen u prethodnom istraživanju naše istraživačke skupine gdje je peroralna primjena galaktoze u trajanju od jednog mjeseca uspješno spriječila nastanak kognitivnog deficita u istom modelu sAB-a (263). S druge strane, u Pokusu 2 gdje su promjene u kognitivnom deficitu i ostala obilježja uznapredovalog sAB-a u trenutku započinjanja terapije ireverzibilne (134), oralna galaktoza nije ispoljila povoljne učinke na kognitivni deficit (Slika 20; Slika 21; Slika 22).

Galaktoza se u eukariotskim stanicama fiziološki nalazi u vrlo malim količinama, pa visoke doze galaktoze izazvane bilo egzogenom primjenom, bilo disfunkcionalnim metabolizmom, djeluju patološki i reagiraju sa slobodnim aminima i aminokiselinama u proteinima i peptidima te stvaraju krajnje produkte glikacije koji posljedično uzrokuju oksidativnu štetu u organizmu (426). Stoga se, kako je ranije opisano u uvodu, kronično izlaganje miševa ili štakora parenteralnoj galaktozi koristi kao model starenjem izazvanog oksidativnog stresa u mozgu i

kognitivnog deficita (393,394,396,397). Naizgled se učinci galaktoze izazvani njezinom parenteralnom primjenom čine kontradiktornima povoljnim učincima koji su dobiveni u Pokusu 1. Međutim, velika je razlika u načinu primjene galaktoze u ovom istraživanju i u prethodno opisanim modelima starenja, što može pružiti objašnjenje za suprotne učinke koje kronična primjena galaktoze ima na kognitivnu funkciju u laboratorijskih životinja. Prema rezultatima prikazanim u Pokusu 1, možemo pretpostaviti da peroralno primijenjena galaktoza ima izravan i neizravan učinak.

Nakon peroralne primjene, galaktoza se u gastrointestinalnom traktu apsorbira aktivnim prijenosom u enterocite putem SGLT1 te putem GLUT2 prijenosnika koji se pojačano eksprimira na apikalnoj membrani enterocita pri visokim koncentracijama heksoza unesenih prehranom (427,428). Većina apsorbirane galaktoze iz crijeva eliminira se u jetri, a preostale male količine dosežu ostale organe, uključujući mozak, te mogu izravno djelovati na stanice mozga. Literaturni podaci ukazuju na to da galaktoza ulazi u neurone putem o inzulinu neovisnog prijenosnika za glukozu GLUT3 (401,402,429), čija je gustoća u mozgu smanjena u oboljelih od sAB-a (430). U našem preliminarnom istraživanju, jednomjesečna peroralna primjena galaktoze spriječila je smanjenu ekspresiju GLUT3 u hipokampusu STZ-icv tretiranih štakora (263). Nakon ulaska u stanice, galaktoza se brzo metabolizira u glukozu putem Leloirovog puta (431). Literaturni podaci pokazuju kako je kapacitet mozga za unos i metabolizam galaktoze sličan jetri (400), što ukazuje na mogućnost da u patološkim stanjima sa smanjenim razinama unutarstanične glukoze poput sAB-a, galaktoza može poslužiti kao alternativni izvor energije u neuronima. Budući je prijenosnik za glukozu GLUT3 kolokaliziran s inzulin-ovisnim prijenosnikom GLUT4 u neuronima moždane kore i hipokampusu u štakora (427,432), kronična primjena galaktoze može kompenzirati disfunkcionalni GLUT4 u stanju inzulinske rezistencije u mozgu u AB-u (433) i poboljšati hipometabolizam glukoze u mozgu, što su pokazali i rezultati FDG-PET skeniranja u Pokusu 1 (Slika 24). Rezultati Western blot analize ekspresije GLUT3 u hipokampusu u Pokusu 1 pokazali su izraženi učinak peroralno primijenjene galaktoze na povećanje gustoće GLUT3 (Slika 26b), što upućuje da bi upravo taj protein mogao biti primarni cilj galaktoze u STZ-icv tretiranih štakora. S druge strane, GLUT4, čija je ekspresija snižena u STZ-icv životinja tretiranih oralnom galaktozom (Slika 26c), vjerojatno je uključen u kompenzatorni odgovor na prebacivanje glavnog izvora energije s glukoze na galaktozu. U ovom stadiju STZ-icv inducirane patologije u kojem su prisutne rane neurofibrilarne promjene i početak intraneuronalnog nakupljanja A $\beta$ 1-42 u parijeto-temporalnoj moždanoj kori (134), galaktoza je imala veći utjecaj na hipokampalne metaboličke

parametre nego na neuropatološka obilježja uznapredovalog sAB-a (fosforilirani/ukupni protein tau, topivi A $\beta$ ; Slika 26d, e, f; Tablica 5) i signalni put inzulinskog receptora (fosforilirani/ukupni GSK3 $\beta$ , IR, IDE; Slika 26i, j, k). Galaktoza može doći u mozak putem sistemske cirkulacije nakon peroralne i parenteralne primjene, no poznavajući štetne učinke galaktoze pri visokim koncentracijama (434) te široki opseg metabolizma galaktoze u jetri, razine galaktoze mnogo su niže nakon peroralne u odnosu na parenteralnu primjenu što su pokazali i preliminarni pokusi s bolus dozama galaktoze koji su prethodili ovom istraživanju (435).

Neizravni učinci galaktoze na boljitak kognitivne funkcije u Pokusu 1 odnose se na parakrino djelovanje u crijevima, gdje, za razliku od parenteralne primjene, peroralno primijenjena galaktoza snažno stimulira endokrine L-stanice u crijevu na lučenje GLP-1 (436) koji u mozgu djeluje neuroprotektivno i neurotrofično te promiče neurogenezu (437,438). GLP-1 porijeklom iz crijeva (te u manjoj mjeri iz alfa stanica gušterače) djeluje kao inkretinski hormon koji ovisno o dozi utječe na lučenje inzulina iz beta stanica gušterače (439). Navedeno su pokazali i preliminarni pokusi u kojim je bolus doza galaktoze normalizirala smanjenje razina inzulina 1 mjesec nakon STZ-icv tretmana, dok u Pokusima 1 i 2, gdje homeostaza inzulina nije bila narušena, tretman oralnom galaktozom nije imao utjecaja na razine inzulina. Stoga bi se moglo pretpostaviti da je galaktozom inducirani porast razine inzulina kao dio njezinog povoljnog učinka ovisan o narušenosti homeostaze inzulina.

L-stanice u crijevu su u izravnom kontaktu s oralno primijenjenim nutrijentima na svojoj luminalnoj površini, a preko bazolateralne površine u kontaktu su s vaskularnim tkivom i parenteralno primijenjenim spojevima (440). Na luminalnoj i bazolateralnoj membrani enterocita prisutne su različite strukture i signalni mehanizmi, što može biti razlogom različitog odgovora na peroralnu i parenteralnu primjenu galaktoze. Međutim, pojedine studije navode i štetan utjecaj galaktoze na kognitivnu funkciju i parametre oksidativnog stresa i nakon peroralne primjene bolus doza galaktoze (393,394,397). No, navedena istraživanja nisu nužno u koliziji s ovdje predstavljenim rezultatima povoljnog utjecaja galaktoze na kognitivni deficit u Pokusu 1. Naime, kronični unos malih količina galaktoze putem pića može dovesti do jačeg GLP-1-posredovanog učinka zbog dodatne stimulacije njegova lučenja putem GIP-a u gornjim dijelovima crijeva, što je možda prisutno u manjoj mjeri ili nedostaje kod primjene bolus doza (439,441,442). Također, unosom galaktoze u obliku napitka, dolazi do aktivacije receptora za osjet slatkog na jeziku, što izostaje prilikom primjene galaktoze gastričnom sondom. Po aktivaciji receptora šećerima u usnoj šupljini, započinje signalna kaskada koja dovodi do



aktivacije susjednih osjetnih aferentnih neurona koji šalju signale u moždane centre uključene u percepciju okusa i druge funkcije (443,444). Ovi su receptori eksprimirani i u gastrointestinalnom traktu gdje reguliraju lučenje GLP-1 (445), a ekspresija GLP-1 nađena je i u okusnim pupoljcima u štakora (446).

GLP-1 izlučen iz L-stanica brzo se metabolizira i inaktivira enzimom DPP-IV, koji je prisutan na četkastoj membrani enterocita te u endotelnim stanicama koje oblažu kapilare *laminae propriae* (447) zbog čega manje od 25% novo izlučenog GLP-1 napušta crijeva u aktivnom obliku (439), ali i u dijelovima mozga poput hipotalamusa, hipokampusu, cirkumventrikularnih organa i koroidnog plexusa (440). U našim je preliminarnim pokusima razina aktivnog GLP-1 mjesec dana nakon primjene STZ-icv bila nepromijenjena (435), dok je u Pokusu 1, 3 mjeseca nakon STZ-icv tretmana ta razina značajno snižena u odnosu na kontrolne životinje (Tablica 5), što ukazuje na to da je disfunkcija GLP-1 signalizacije značajnija s odmakom STZ-icv patologije. Ovi su rezultati u skladu s literaturnim podacima o dugotrajnoj inhibiciji DPP-IV u miševima sklonim AB-u (448), te terapijskom učinku inhibitora DPP-IV na kognitivnu disfunkciju u inzulin-rezistentnih štakora (330) i dijabetičara s i bez AB-a (449) (Tablica 4). Međutim, u uvjetima gdje patologije nema, dugoročna primjena oralne galaktoze može uzrokovati drugačije, potencijalno štetne učinke na razine aktivnog GLP-1 u plazmi, što je vidljivo iz rezultata Pokusa 1, gdje su galaktozom tretirane kontrolne životinje imale značajno niže razine aktivnog GLP-1 (Tablica 5). U Pokusu 2, gdje je patologija u podmakloj, ireverzibilnoj fazi nije bilo značajnih učinaka na razine aktivnog ni ukupnog GLP-1 u plazmi ni likvoru (Tablica 6).

GLP-1 izlučen u crijevima i njegov aktivni oblik iz krvotoka jednostavnom difuzijom prolaze krvno-moždanu barijeru (450), a dospjevaju i na mjesta mimo barijere i djeluju izravno na aktivaciju određenih neurona (451). Osim toga, GLP-1 iz crijeva može se vezati te aktivirati osjetna aferentna vlakna vagalnog živca, koji će aktivirati neurone u jezgri solitarnog trakta koji projiciraju u moždano deblo, hipotalamus i prednji mozak. GLP-1 također može biti sintetiziran u neuronima čija su stanična tijela u moždanom deblu (452). GLP-1 i GLP-1R eksprimirani su i u hipokampusu, strukturi mozga koja je ključna u različitim oblicima učenja i pamćenja (453). GLP-1R spregnut je s različitim G proteinskim signalnim putevima koji dovode do aktivacije adenilil ciklaze, protein kinaze C i MAPK-a, a u mozgu su ovi putevi uključeni u plastičnost i proces učenja te predstavljaju potencijalne mete za djelovanje na kognitivnu funkciju (454,455). Poboljšanje kognitivne funkcije STZ-icv štakora na terapiji peroralnom galaktozom praćeno normalizacijom razine aktivnog GLP-1 u plazmi i povećanom ekspresijom GLP-1R u

hipokampusu (Slika 26a) u skladu je s literaturnim podacima poboljšanja asocijativnog i prostornog pamćenja u miševa s povećanom ekspresijom GLP-1R u hipokampusu, kao i slijedom icv primjene GLP-1 (456). GLP-1 bi alternativno mogao dosegnuti hipokampus iz likvora obzirom da su mjerljive količine aktivnog GLP-1 u likvoru nađene u Sprague-Dawley štakora (457), dok su u Pokusima 1 i 2 te razine bile ispod granica mjerenja ELISA kitova na raspolaganju. GLP-1 u likvoru bi mogao biti crijevnog podrijetla, ali bi također mogao biti proizveden u jezgri solitarnog trakta i izlučen u likvor (458). Relativni doprinos perifernog u odnosu na središnje proizveden GLP-1 na utjecaj moždanih funkcija još je uvijek nejasan (459). GLP-1R pronađeni su u čitavom središnjem živčanom sustavu i na glija i na neuronskom tipu stanica (460). Literaturni podaci podupiru neurotrofnu i neuroprotektivnu ulogu stimulacije GLP-1R u sve većem broju staničnih i životinjskih neurodegeneracijskih modela kao i u neurogenezi (460–462). *In vitro* studije sugeriraju da neuritogeni učinci i učinci promicanja rasta stimulacijom GLP-1R proizlaze iz interferencije između Pi3K puta i izvanstaničnog signalom-reguliranog puta mitogen aktivirane protein kinaze (ERK) (462). Pi3K i ERK predstavljaju važne elemente nizvodno od dva IR signalna puta. Uz to, povećanje ekspresije GLP-1R u hipokampusu, postignuto hipokampalnim prijenosom gena, izazvalo je značajno poboljšanje učenja u životinja, sa smanjenom latencijom i prijeđenom udaljenosti za pronalazak skrivene platforme u MWM testu (456). Također važna moždana regija za GLP-1 jest hipotalamus, gdje je nađena široka rasprostranjenost GLP-1R s vrlo visokom gustoćom GLP-1R-ekspimirajućih neurona u dorzomedijalnoj jezgri, arkuatnim i periventrikularnim jezgrama kao i unutar stražnjeg hipotalamičkog područja (452) i gdje se smatra da sudjeluje u neuroendokrinim odgovorima i regulaciji energetske ravnoteže (463). Hipotalamičke projekcije pod kontrolom metaboličkih hormona reguliraju aktivnost hipokampusa, ali i *vice versa*; mehanizmi hipokampalnog učenja i pamćenja izravno doprinose funkcijama regulacije unosa hrane (464). U Pokusu 1, kronična peroralna primjena galaktoze uzrokovala je značajni porast hipotalamičke ekspresije GLP-1R (Slika 30). Uzevši u obzir da je sAB praćen centralnim hipometabolizmom glukoze i inzulinskom rezistencijom (465), rezultate naše istraživačke skupine gdje je primjena STZ-icv uzrokovala promjene ekspresije hipotalamičkog GLUT2 i IR-a (272) te rezultate FDG-PET skeniranja u Pokusu 1 i 2, gdje je oralna primjena galaktoze utjecala na poboljšanje metabolizma glukoze u mozgu STZ-icv tretiranih životinja (Slika 24, Slika 25), može se pretpostaviti da kronična primjena oralne galaktoze povoljno utječe na metaboličku disfunkciju u hipotalamusu.

Još jedan od mogućih mehanizama blagotvornog djelovanja peroralne primjene galaktoze odnosi se na metabolizam galaktoze, koja se jednako kao glukoza, metabolizira u aminokiseline i dovodi do povišenih razina glutamata i GABA-e, čija je uloga važna u normalnoj kognitivnoj funkciji (466). Prednost galaktoze pred glukozom jest da metaboliti galaktoze dulje vrijeme opstaju u mozgu (466). Biosinteza aminokiselina iz heksoza putem limunske kiseline troši amonijak koji je povišen u AB-u (467). Galaktozom inducirano povišenje razina glutamata također bi mogao biti važan faktor, budući su u mozgu bolesnika s AB-om nađene snižene razine glutamata (468). Međutim, povećanje razine glutamata ne bi smjelo prijeći prag glutamatergički izazvane ekscitotoksičnosti, zbog čega se za niže razine galaktoze koje su posljedica peroralne primjene može očekivati blagotvoran učinak, za razliku od viših razina izazvanih parenteralnom primjenom galaktoze. Usto, povećana unutarstanična razina galaktoze, galaktoze-1-fosfata ili UDP-galaktoze može utjecati na O-Glc-NAcetilaciju regulatornih proteina, što je važan način post-translacijske regulacije funkcije proteina.

Oralno primijenjena galaktoza ima i značajne učinke na sistemsku i moždanu regulaciju oksido-redukcijskog sustava. Oksidativni stres izazvan kroničnom parenteralnom primjenom galaktoze naširoko se koristi u modelima starenja kako je navedeno ranije, ali pokusi s akutnom primjenom oralne galaktoze pokazali su da takva primjena ne uzrokuje sistemske poremećaje regulacije oksido-redukcijske mreže te da se u dozi od 200 mg/kg, kakva je korištena i u ovom istraživanju, uzrokuje pro-oksidativne promjene u hipokampusu koje se kompenziraju u roku od 2 sata od primjene galaktoze (469). Pretpostavljeni mehanizam takve kompenzacije jest metabolička reorganizacija koja uključuje pojačani metabolizam puta pentoze fosfata u cilju povećanja regeneracije antioksidansa i reduktivne biosinteze, postepeno smanjenje aktivnosti neurona i povećanje ekspresije GALK1 enzima iz Leloirovog puta (469).

Crijevna mikrobiota ima jednu od ključnih uloga u modulaciji crijevnog i moždanog funkcioniranja, a literaturni podaci pokazuju da su promjene u sastavu mikrobiote i smanjena raznovrsnost njezinog sastava nađene u patološkim stanjima poput DM2 i AB-a, te da se na iste može djelovati promjenom režima prehrane, uključujući prehranom bogatijom određenim šećerima (470–472), zbog čega valja uzeti u obzir i mogućnost djelovanja oralno primijenjene galaktoze i na crijevnju mikrobiotu. Raznovrsnost crijevnog mikrobioma u transgeničnom mišjem modelu fAB-a APP/PS1 smanjuje se sa starošću, a pripadajući histološki i bihevioralni znakovi AB-a koreliraju s određenim stanjima crijevnog mikrobioma (473). Upotreba mješavine probiotika imala je pozitivan učinak na kognitivnu funkciju i metabolički status oboljelih od AB-a (474), dok je u štakora takav tretman umanjio kognitivni deficit uzrokovan starenjem (475). Promjene

u mikrobioti također se u kliničkim ispitivanjima ispituju kao mogući rani prediktivni simptom AB-a (476), a modulacija crijevne mikrobiote kao preventivni i terapijski pristup AB-u (477). Crijevna mikrobiota može aktivirati vagalni živac, čiji određeni signali mogu pokrenuti protuupalni refleks, te takav imunomodulatorni učinak vagusa može imati posljedice na modulaciju funkcije mozga (478). Iako je utjecaj mikrobiote na promjene u STZ-icv modelu još uvijek neistražen, podatak o učinku devetotjedne primjene galaktoze u prehrani, u odnosu na fruktozu i glukozu, na povoljan pomak u sastavu mikrobiote u štakora i posljedično poboljšanje u jetrenoj osjetljivosti na inzulin (479) pruža dodatne dokaze o korisnim učincima peroralno primijenjene galaktoze u odnosu na parenteralnu.

Za razliku od učinka galaktoze u preliminarnom pokusu gdje je tretman oralnom galaktozom uspješno spriječio razvoj kognitivnog deficita (263) te učinka u Pokusu 1 gdje je normalizirao kognitivni deficit u ranom stadiju STZ-icv modela sAB-a (Slika 18), u uznapredovalom stadiju sAB-a te u transgeničnom mišjem modelu fAB-a dvomjesečni tretman oralnom galaktozom nije imao terapijskog značaja na kognitivni deficit u pre-simptomatskom ni u blagom modelu bolesti (Slika 37; Slika 38; Slika 39; Slika 43; Slika 44; Slika 45). Možemo pretpostaviti da blagotvorni učinci peroralno primijenjene galaktoze na kognitivni deficit ovise o specifičnoj patologiji u podlozi modela koja je prisutna u STZ-icv modelu sAB-a, ali izostaje u transgeničnom modelu fAB-a (480,481), te o stadiju i jačini simptomatologije AB-a.

Usprkos izostanku učinka peroralno primijenjene galaktoze na kognitivni deficit u Pokusu 2, ona je ipak pokazala određene blagotvorne učinke, poput poboljšanja metabolizma glukoze u mozgu (Slika 25) i ublažavanja STZ-icv inducirane astrocitoze (Slika 29) jednako kao i u Pokusu 1, te povećanja ekspresije IDE (Slika 27k) uz posljedično smanjenje STZ-icv induciranih povišenih razina A $\beta$  (Tablica 6). Kognitivni deficit i neurokemijske promjene u štakorskom modelu STZ-icv pokazuju akutne, djelomično reverzibilne promjene u ranom post-STZ periodu (oko 1 mjesec) koje se vrate u normalne razine u periodu od 1 do 3 mjeseca, a zatim nakon kritične točke od 3 mjeseca poslije tretmana STZ-icv dolazi do progresivnog i ireverzibilnog pogoršanja kognitivnog deficita uz pojavu patološkog nakupljanja tau/A $\beta$  u daljnjem razvoju bolesti (134). Stoga, možemo pretpostaviti da su ostale promjene u Pokusu 2, gdje je tretman peroralnom galaktozom započet 4 mjeseca nakon STZ-icv primjene, ireverzibilne, što je spriječilo ispoljavanje terapijskog učinka oralne galaktoze viđenog u Pokusu 1.

## **6.2. Učinak peroralno primijenjene galaktoze u mišjem modelu familijarnog oblika bolesti**

Rezultati kognitivnog ispitivanja u Pokusu 4, gdje su miševi započeli tretman oralnom galaktozom u dobi od 12 mjeseci, pokazali su da peroralna primjena galaktoze može imati i štetne učinke na kognitivnu funkciju kontrolnih životinja (Slika 44), koji nisu viđeni u zdravim, kontrolnih štakora u dobi do 9 mjeseci u Pokusu 2 (Slika 21). Učinci oralne galaktoze vjerojatno postaju štetni u fiziološkim uvjetima gdje nema patološkog stanja koje bi zahtijevalo dodatne galaktozom-inducirane prihode energije ili oralna galaktoze pogoršava patologiju povezanu sa starenjem u starijih životinja.

Utjecaj GLP-1 u transgeničnim modelima fAB-a tek se odnedavno počeo više istraživati. Ekspresija mRNA i proteina GLP-1R u hipokampusu sedmomjesečnih 5xFAD miševa bila je povišena u odnosu na kontrolne miševe, kao i u hipokampusu 12 mjeseci starih 3xTg-AD miševa (482), dok je u PET istraživanju unosa radioaktivno obilježenog analoga GLP-1 u 12-mjesečnih 3xTg-AD miševa unos analoga bio snižen u odnosu na kontrolne miševe (483). GLP-1R i GLP-1 nađeni su povišenima u uzorcima mozga čovjeka s histopatološki potvrđenim AB-om u usporedbi sa zdravim kontrolama jednake dobi, a u istoj je studiji potvrđena i snižena ekspresija GLP-1 i GLP-1R u 3xTg-AD miševa u dobi od 12 mjeseci (331). U APP/PS1 transgeničnih miševa u dobi od 6 mjeseci ekspresija GLP-1 u crijevima također je bila snižena, kao i ekspresija GLP-1R u mozgu (484) dok je u istih miševa u dobi od 15 do 18 mjeseci ekspresija GLP-1R u mozgu bila nepromijenjena u odnosu na kontrole iste dobi (485). U transgeničnom modelu fAB-a Tg2576 do sada nisu mjereni parametri GLP-1 i GLP-1R. U Pokusima 3 i 4 razine aktivnog i ukupnog GLP-1 u plazmi bile su podjednake u svim skupinama miševa (Tablica 7; Tablica 8). Hipokampalni GLP-1R u Pokusu 3 nije se značajnije razlikovao među ispitivanim skupinama (Slika 54a, Slika 41), dok je u hipotalamusu tretman oralnom galaktozom utjecao na povećanje ekspresije receptora u transgeničnih životinja (Slika 58). U Pokusu 4 je peroralna primjena galaktoze utjecala na povećanje ekspresije receptora u hipokampusu kontrolnih i transgeničnih miševa (Slika 55a). Iz ovih se rezultata može pretpostaviti da je usprkos djelovanju na povećanje razine GLP-1R u mozgu, nedostatak blagotvornog djelovanja galaktoze na razine GLP-1 u plazmi razlogom njezine nedjelotvornosti na kognitivni deficit u modelu fAB-a. Ovakvo objašnjenje podupiru i literaturni podaci iz studija u kojima je pokazan blagotvorni učinak analoga GLP-1 na kognitivni deficit i druge značajke AB-a u različitim transgeničnim modelima (301,486–492). Međutim, dugotrajna

terapija liraglutidom nije imala učinka na depozite amiloida u mozgu u dva različita transgenična modela APP/PS1 koji su predstavljali amiloidozu niskog i visokog stupnja, što može ukazivati na diferencijalnu osjetljivost različitih transgeničnih modela (493). Dugotrajna terapija eksenatidom, također agonistom GLP-1, uzrokovala je poboljšanje i kratkoročnog i dugoročnog pamćenja u PS-K1 modelu, ali ne i u 3xTg-AD modelu, što je najvjerojatnije bila posljedica povećanja anaerobne glikolize u mozgu, na što eksenatid nije pokazao učinak u 3xTg-AD modelu (494); iz čega je vidljiv značaj odabira pojedinog modela i specifičnog gena na učinke posredovane GLP-1. Kombinacija klasičnog transgeničnog modela i induciranog modela koji ispoljava poremećaj u inzulinskoj rezistenciji bio bi potpuniji model AB-a (133,495) u kojem bi bilo zanimljivo istražiti utjecaj oralne galaktoze na kognitivni deficit i GLP-1.

Rezultati FDG-PET analize u Pokusu 3 pokazuju da Tg2576 miševi u dobi od 9 mjeseci razvijaju hipermetabolizam glukoze u mozgu (Slika 50), što je u skladu s literaturnim podacima o sličnim FDG-PET nalazima predsimptomatskih Tg2576 miševa, gdje je predloženo da je hipermetabolizam odraz kompenzatornog mehanizma neurona (496). Usto, u bolesnika s blagim kognitivnim deficitom ili blagim oblikom demencije nađen je povišen metabolizam glukoze u hipokampusu koji je bio u negativnoj korelaciji s izvršenjem zadataka u više kognitivnih subdomena (497). Luo i suradnici (496) pokazali su da hipermetabolizam glukoze u mozgu opada starenjem u modelu Tg2576, što je pokazano i u rezultatima Pokusa 4, gdje su redukcije u metabolizmu glukoze na razini cijelog mozga iznosile -15% u transgeničnih miševa u dobi od 12 mjeseci, a u istraživanju drugih i do -20% na razini cijelog mozga miševa Tg2576 u dobi >18 mjeseci (498). Obzirom da je peroralno primijenjena galaktoza utjecala na normalizaciju metabolizma glukoze u mozgu u Pokusima 2 (Slika 25), 3 (Slika 50) i 4 (Slika 51), ali za razliku od Pokusa 1 nije dovela do poboljšanja kognitivnog deficita, možemo zaključiti da normalizacija metabolizma glukoze u mozgu doprinosi, ali nije isključivo odgovorna za učinak na kognitivnu funkciju u modelima AB-a. Međutim, prema literaturnim podacima, analog GLP-1 liraglutid normalizirao je metabolizam glukoze u mozgu 12-mjesečnih APP/PS1 transgeničnih miševa što je pratilo i poboljšanje kognitivne funkcije (302). Stoga, ostaje za razjasniti koja je točna kombinacija različitih čimbenika odgovorna za blagotvoran učinak galaktoze na kognitivnu funkciju.

U cilju dodatne karakterizacije transgeničnog modela Tg2576 i njegova metaboličkog profiliranja, u Pokusima 3 i 4 je provedeno i ispitivanje intraperitonealne tolerancije glukoze. Dobiveni rezultati snižene razine inzulina u plazmi transgeničnih miševa u predsimptomatskom

stadiju fAB-a (Tablica 7) potvrdili su ključnu ulogu sistemskih metaboličkih promjena koje nastupaju prije pojave kognitivnog deficita, što upućuje na metaboličku pozadinu za progresiju kasnijeg kognitivnog deficita. Pogoršana tolerancija glukoze u transgeničnih miševa bila je vidljiva u transgeničnih miševa u dobi od 12 mjeseci s razvijenom kognitivnom disfunkcijom (Slika 53), a tretman oralnom galaktozom dodatno je pogoršao toleranciju glukoze u toj skupini. Razine inzulina u plazmi miševa u Pokusu 4 bile su u manjoj mjeri snižene u odnosu na Pokus 3 i nisu se značajno razlikovale od kontrolnih miševa, što može biti u skladu s literaturnim podacima o hiperinzulinemiji u miševa starijih od 13 mjeseci (217). Terapija oralnom galaktozom je u Pokusu 3 utjecala na povišenje i normalizaciju razina inzulina (Tablica 7), dok je u Pokusu 4 taj učinak izostao te je peroralna primjena galaktoze dodatno snizila plazmatske razine inzulina u transgeničnih životinja (Tablica 8). Ovi rezultati potvrđuju razlike u metaboličkoj pozadini transgeničnog modela fAB-a i ne-transgeničnog modela sAB-a dobivenog primjenom STZ-icv, budući da u Pokusima 1 i 2 peroralna primjena galaktoze nije dovela do promjena u razini inzulina u plazmi (Tablica 5; Tablica 6). Međutim, nužno je uzeti u obzir i moguće razlike između korištenih vrsta glodavaca (štakor vs. miš) koje mogu biti razlogom različitog metaboličkog odgovora u ovim pokusima.

U Pokusu 4 je peroralna primjena galaktoze utjecala na smanjenje ekspresije IR-a i povišenje aktivnosti GSK3 $\beta$  u hipokampusu (Slika 55) što može imati štetne učinke nizvodno signalne kaskade inzulinskog receptora i pridonijeti kognitivnom deficitu u patologiji fAB-a. Značajno galaktozom inducirano smanjenje aktivnosti GSK3 $\beta$  u Pokusu 3 može upućivati na potencijalno blagotvorni učinak peroralno primijenjene galaktoze na predoptomatsku fazu patologije fAB-a.

Periferni metabolizam glukoze i inzulina povezan je sa sustavom APP-a te je povećana ekspresija A $\beta$  u pozitivnoj korelaciji s inzulinskom rezistencijom (499,500). Rezultati Pokusa 3 pokazuju da se metabolička disfunkcija može povezati s ekspresijom A $\beta$  budući su razine topivog A1 $\beta$ -42 bile povišene u transgeničnih miševa u dobi od 7 mjeseci (Tablica 7). U toj dobi model Tg2576 još ne razvija amiloidne plakove u mozgu (208), dok se starenjem i povećanjem količine amiloidnih plakova smanjuje topiva frakcija amiloida, što je pokazano i u rezultatima Pokusa 4, gdje se razine topivog A $\beta$ 1-42 nisu razlikovale u transgeničnih i kontrolnih miševa (Tablica 8). Tretman oralnom galaktozom je u transgeničnih miševa u dobi od 12 mjeseci u Pokusu 4 doveo do povećanja razine topivog A $\beta$ 1-42 u hipokampusu te do pojačane astrocitoze (Slika 57), što može biti i jedan od razloga neuspjeha terapije oralnom galaktozom u poboljšanju kognitivnog deficita, budući je intraperitonealna primjena galaktoze

također dovela do povećanja razine A $\beta$  i ekspresije GFAP u galaktozom-induciranim modelima starenja (391,501). U Pokusima 3 i 4 nisu nađene ni promjene u ekspresiji enzima koji razgrađuje inzulin (IDE; Slika 54k, Slika 55k), čija se ekspresija značajno povećava u korelaciji s amiloidnim depozitima tek u dobi od 16 mjeseci u modelu Tg2576 (502).

Dok u Pokusima 1 i 2 peroralna primjena galaktoze nije utjecala na omjer fosforiliranog i ukupnog proteina tau u hipokampusu štakora, viđena je povećana ekspresija fosforiliranog proteina tau AT8 *in situ* u hipokampusu STZ-icv tretiranih štakora iz Pokusa 1 (Slika 33) te u svim ispitivanim regijama mozga STZ-icv tretiranih štakora u Pokusu 2 (Slika 34). U Pokusima 3 i 4 viđeno je pogoršanje omjera nakon tretmana oralnom galaktozom (značajna razlika u Pokusu 3, tendencija povećanja u Pokusu 4; Slika 54; Slika 55) u transgeničnim životinjama nakon peroralne primjene galaktoze, dok je ekspresija AT8 promatrana imunohistokemijski bila povećana u kontrolnih i smanjena u transgeničnih životinja u Pokusu 3 (Slika 60), a povećana u transgeničnih miševa iz Pokusa 4 (Slika 61). Sumarno bi se iz navedenih rezultata dalo zaključiti da tretman oralnom galaktozom djeluje nepovoljno na hiperfosforilaciju proteina tau. Jedan od razloga mogao bi biti povećana sklonost hiperfosforilaciji aberantno glikoziliranog oblika tog proteina; naime, literaturni podaci pokazuju da glikoziliranje proteina tau, glikanskim nastavcima u kojima je najzastupljeniji monosaharid galaktoza, omogućava i pospješuje patološku hiperfosforilaciju proteina tau u AB-u (503). Uz to, periferna hiperinzulinemija kakva je viđena u TG+GAL miševa u Pokusu 3, a kod kojih je i najznačajnija razlika u porastu omjera fosforiliranog i ukupnog proteina tau, također propagira fosforilaciju tau *in vivo* prema literaturnim podacima (504).

Kako bi se bihevioralno поближе opisao model Tg2576, u Pokusima 3 i 4 provedeni su dodatni testovi ponašanja. Za razliku od STZ-icv tretiranih životinja iz Pokusa 1 i 2, već u MWM testu plivanja u labirintu transgenični su miševi u predsimptomatskoj fazi fAB-a pokazali poremećaj u aktivnosti u bazenu, s tendencijom manje ukupno prijeđene udaljenosti i manje brzine plivanja u odnosu na divlji tip miševa iste dobi (Slika 40). U starijih miševa u dobi od 12 mjeseci u Pokusu 4 zabilježeno je isto ponašanje transgeničnih životinja uz dodatno pogoršanje kontrolnih životinja na terapiji oralnom galaktozom (Slika 46). Zanimljivo je da je u miševa u dobi u 9 mjeseci koji su bili podvrgnuti testu prisilnog plivanja (engl. *forced swim test*) zabilježena povećana lokomotorna aktivnost transgeničnih miševa u vodi (505). U istoj je studiji zabilježena i povećana lokomotorna aktivnost Tg2576 miševa u OF testu otvorenog polja mjerena povećanjem ukupno prijeđene udaljenosti. Rezultati OF-a u Pokusima 3 i 4 ovog istraživanja nisu pokazali povećanu lokomotornu aktivnost mjerenu vremenom provedenog u



središtu uređaja, brzinom kretanja i ukupno prijeđenom udaljenosti miševa, ali je izmjerena razlika u frekvenciji čišćenja i timarenja (engl. *grooming*) transgeničnih životinja, koja je bila smanjena u odnosu na kontrolne, i to u Pokusu 3 u većoj mjeri i statistički značajno kod galaktozom netretiranih (Slika 41), a u Pokusu 4 u većoj mjeri i statistički značajno kod galaktozom tretiranih životinja (Slika 47). *Grooming* je jedan od pokazatelja anksioznosti u životinja, obzirom da životinje koje su u stresu i anksiozne životinje reagiraju pojačanim *grooming* ponašanjem (411). Uz to, smanjeni interes za čišćenje i timarenje u miševa jedan je od pokazatelja depresivnih simptoma u glodavaca, koji kao i u bolesnika oboljelih od AB-a, gube interes za samoodržanje i svakodnevne dnevne aktivnosti (506). Sličan je pokazatelj i poremećaj svijanja gnijezda u *nesting* testu, koji služi kao pokazatelj pogoršanja mogućnosti obavljanja svakodnevnih aktivnosti. Rezultati Pokusa 3 i 4 upućuju na općenito lošiju izvedbu i veću heterogenost ocjena svijenih gnijezda u transgeničnih miševa, dodatno pogoršano peroralnom primjenom galaktoze u Pokusu 4 (Slika 42; Slika 48). Disfunkcija normalnog ponašanja svijanja gnijezda zabilježena je veću Tg2576 miševa, i to kao progresivno pogoršanje s dobi (mjereno do dobi od 20 mjeseci) i neovisno o drugim atmosferskim utjecajima poput temperature (507). Osim smanjenih razina frekvencije timarenja, još jedan pokazatelj anti-anksioznog ponašanja u miševa jest povećanje frekvencije ulazaka u otvorene krakove EPM testa uzdignutog križnog labirinta, te povećanje vremena provedenog u istima, kakvo je izmjereno u Pokusu 4 (Slika 49). Ovi su rezultati u skladu s literaturnim podacima o dezinhibiranom ponašanju Tg2576 miševa izmjerenom u EPM testu (505,508,509). Uloga kolinergičnog sustava u kontroli inhibicija nalaže da poremećaj normalne kolinergične funkcije, uz pojačanu produkciju amiloida, može biti odgovoran za takav obrazac ponašanja u Tg2576 miševa (510). Ovakvo ponašanje možemo i usporediti s bolesnicima oboljelih od AB-a kod kojih se javlja društveno neprihvatljivo ponašanje (511).

### **6.3. Usporedba patofiziologije i učinaka kronične peroralne primjene galaktoze u štakorskom modelu sAB-a i mišjem modelu fAB-a**

Tablica 9 predstavlja zbirni prikaz statistički značajnih razlika izmjerenih parametara u sva četiri pokusa, odnosno u ranom i uznapređovalom stadiju STZ-icv inducirano modela sAB-a u štakora, te u predsuptomatskom i blagom stadiju transgeničnog mišjeg modela fAB-a, kao i utjecaj dvomjesečne peroralne primjene galaktoze.

**Tablica 9 Usporedba izmjerenih parametara u dva stadija štakorskog modela sporadičnog oblika i mišjeg modela familijarnog oblika Alzheimerove bolesti te utjecaj peroralne galaktoze na mjerene parametre.**

POREMEĆAJ	Štakorski STZ-icv model sAB-a				Transgenični Tg2576 mišji model fAB-a			
	Rani stadij		Uznapredovali stadij		Pred-simptomatski stadij		Blagi stadij	
	sAB	+ GAL	sAB	+ GAL	fAB	+ GAL	fAB	+ GAL
<b>MOZAK</b>								
metabolizma glukoze	↓	0	↓	0	↑	0	↓	0
inzulinskog sustava*	-	=	-	0	-	0	+	X
hiperfosforilacije proteina tau	+	=	+	X	-	X	-	X
nakupljanja amiloida β	-	=	+	0	+	=	-	X
GLP-1 sustava	-	0	-	X	-	0	-	0
astrocitoze	+	0	+	0	-	=	-	X
<b>PLAZMA</b>								
metabolizma glukoze	-	=	-	=	-	=	-	=
metabolizma galaktoze	-	=	-	=	-	=	-	=
razine inzulina	-	=	-	=	+	0	-	=
GLP-1 sustava	+	0	-	=	-	=	-	=
<b>BIHEVIORALNO ISPITIVANJE</b>								
kognitivni deficit	+	0	+	=	-	=	+	=

Legenda oznaka: „+“ prisutnost poremećaja; „-“ odsutnost poremećaja; „0“ normalizacija, odnosno amplifikacija inducirana kroničnom peroralnom primjenom galaktoze; „X“ pogoršanje inducirano kroničnom peroralnom primjenom galaktoze; „=“ nema promjene nakon kronične peroralne primjene galaktoze; „↑“ hipermetabolizam; „↓“ hipometabolizam; „/“ nije mjereno. \*ekspresija inzulinskog receptora (IR), enzima koji razgrađuje inzulin (IDE) i aktivnost glikogen sintaza kinaze 3. STZ-icv – intracerebroventrikularno primijenjeni streptozotocin; sAB – sporadična Alzheimerova bolest; fAB – familijarna Alzheimerova bolest; +GAL – kronična peroralna primjena galaktoze; GLP-1 – glukagonu slični peptid 1.

U konačnici, iz prikazane zbirne tablice vidljivo je da se u ranom sAB-u manifestirao poremećaj u 5 sustava; metabolizmu glukoze u mozgu, hiperfosforilaciji proteina tau, aktivaciji astrocita, sistemskom GLP-1 te kognitivnoj funkciji, koje je tretman oralnom galaktozom uspješno normalizirao, te nije uzrokovao pogoršanja u nijednom od mjenjenih parametara. Slično je u modelu uznapredovalog sAB-a razvijen poremećaj u 5 sustava; metabolizmu glukoze u mozgu, hiperfosforilaciji proteina tau, aktivaciji astrocita, nakupljanju amiloida β te kognitivnoj

funkciji, kod kojih je galaktoza utjecala povoljno na hipometabolizam glukoze u mozgu, astrocitozu i povećanje A $\beta$ , nije imala utjecaja na kognitivni deficit, a nepovoljno je utjecala na hiperfosforilaciju proteina tau. Usto, iako nije viđena razlika između kontrolnih i STZ-icv životinja, tretman galaktozom je u STZ-icv štakora doveo do povećanja razina inzulina u plazmi i smanjenja ekspresije GLP-1R u mozgu. U predsimptomatskom modelu fAB-a zabilježeni su poremećaji u 3 sustava; metabolizmu glukoze u mozgu, nakupljanju A $\beta$  i sistemske razini inzulina, kod kojih je oralna galaktoza imala blagotvoran učinak, dok je u transgeničnih životinja, iako se one nisu razlikovale od kontrola, izazvala pogoršanje hiperfosforilacije proteina tau, a dovela je i do povećanja ekspresije receptora za GLP-1 i proteina inzulinske kaskade u mozgu. U kasnijem stadiju fAB-a transgenični miševi su pokazali poremećaj u 3 sustava; metabolizmu glukoze u mozgu, inzulinskom sustavu u mozgu i kognitivnoj funkciji, a peroralna primjena galaktoze djelovala je povoljno samo na korekciju hipometabolizma glukoze u mozgu, te je dovela do povećanja ekspresije GLP-1R. S druge strane, oralna galaktoza dovela je u ovom modelu do pogoršanja ekspresije proteina u inzulinskoj signalizaciji u mozgu, pogoršanja astrocitoze u mozgu te pojačane hiperfosforilacije proteina tau i nakupljanja amiloida beta. Obzirom da je iz navedenog vidljivo da kronična primjena oralne galaktoze normalizira poremećaj metabolizma glukoze u mozgu u oba stadija obaju eksperimentalnih modela AB-a, a uspješno korigira kognitivni deficit samo u modelu ranog sAB-a, evidentno je da ponovna uspostava normalnog metabolizma glukoze u mozgu nije dovoljna za učinak na kognitivnu funkciju.

Osim već navedenih čimbenika koji su mogli imati učinak na rezultate, važno je naglasiti da se pri razmatranju mogućeg uzroka različitog odgovora na peroralno primijenjenu galaktozu u dva ispitivana modela treba uzeti u obzir i razlika u starosti ispitivanih životinja te razlika u životinjskoj vrsti u kojoj je generiran pojedini model. Naime, štakor se može smatrati bojom odabirom glodavca za modeliranje AB-a i ispitivanje novih terapijskih mogućnosti. Osim što u manjoj mjeri pokazuju smetnje ponašanja, poput agresivnosti, anksioznosti i slabije društvene interakcije, zbog čega su bolji kandidati za kognitivna ispitivanja testovima ponašanja i pamćenja poput MWM-a, štakor pokazuje sličniju tau patologiju čovjekovoj (512) te pokazuje veću otpornost amiloidnoj patologiji od miša, odnosno, degeneracija se odvija u štakora sporije nego u miševa (513,514). Štakori i miševi mogu pokazati suprotne odgovore u istraživanjima kognitivne funkcije, impulzivnosti te socijalne interakcije, a mogu i manifestirati različit opseg neurodegeneracije (515). Štakor i miš različito reagiraju na sistemsku primjenu STZ-a; pokazana je intenzivnija toksičnost u štakora nego u miša (516), upalni odgovor je u miša slabiji

i protrahiran (517), a značajne su razlike i u oksidativnom stresu, obzirom da mišji mozak stvara 50% više ROS-a od štakorskog (518). S druge strane mozak štakora pokazao je manju osjetljivost na toksičnost STZ-icv od mišjeg mozga te bolje oponašanje promjene signalnog puta IR-a u ljudi sa sAB-om (519). Na posljetku, i metabolički sustavi u miševa i štakora se razlikuju; različit je odgovor sekrecije inzulina na glukozu (520), metabolizam lipida (521), a uočene su i razlike u sastavu crijevne mikrobiote (522). Iako se mogući utjecaj navedenih razlika između miša i štakora ne može isključiti kao moderator metaboličkog i kognitivnog odgovora na tretman oralnom galaktozom, on dodatno potvrđuje značaj odabira modela u interpretaciji rezultata pri ispitivanju novih terapijskih strategija u liječenju AB-a.

## 7. ZAKLJUČAK

- Kronična, dvomjesečna peroralna primjena galaktoze u dozi od 200 mg/kg/dan ima **blagotvoran učinak na kognitivni deficit** uzrokovan STZ-icv primjenom u **štakorskom modelu ranog sAB-a**.
  - Mehanizmi koji posreduju takvo djelovanje uključuju izravan učinak galaktoze na metabolizam glukoze u mozgu te neizravne učinke posredovane inkretinskim hormonom GLP-1.
  - Peroralna primjena galaktoze uzrokovala je korekciju hipometabolizma glukoze uzrokovanog središnjom primjenom streptozotocina i povećanje gustoće prijenosnika za glukozu GLUT3 u hipokampusu streptozotocinom tretiranih štakora, dok su razine prijenosnika GLUT4 bile snižene pod utjecajem peroralne primjene galaktoze, vjerojatno kao posljedica kompenzatornog odgovora mozga na promjenu izvora energije.
  - U STZ-icv tretiranih životinja plazmatske razine aktivnog oblika GLP-1 bile su snižene, a dvomjesečni tretman oralnom galaktozom uspješno je povratio razine aktivnog GLP-1 na razine kontrolnih životinja te je utjecao na povećanje ekspresije receptora za GLP-1 u hipokampusu i hipotalamusu STZ-icv tretiranih štakora.
  - Peroralno primijenjena galaktoza u modelu ranog sAB-a utjecala je i na smanjenje streptozotocinom inducirane astrocitoze, te je u STZ-icv životinja uzrokovala smanjenje plazmatskih razina glukoze, a povećanje razine glukoze u likvoru. Oralna galaktoza nije pokazala utjecaj na ostale ispitivane proteine od interesa poput topivog A $\beta$ , IDE-a, IR-a, omjera fosforiliranog i ukupnog GSK3 $\beta$  ili omjera fosforiliranog i ukupnog proteina tau u hipokampusu STZ-icv tretiranih životinja.
- Dvomjesečna peroralna primjena galaktoze **nije imala učinka na kognitivni deficit u uznapređovalom modelu sAB-a** induciranom STZ-icv primjenom.
  - Usprkos izostanku učinka na kognitivnu funkciju, peroralna primjena galaktoze pokazala je tendenciju uzrokovanja određenih povoljnih učinaka u STZ-icv tretiranih životinja, poput normalizacije hipometabolizma glukoze u mozgu izazvanog primjenom streptozotocina, povećanja ekspresije IDE-a, smanjenja razina topivog A $\beta$  povišenog u STZ-icv životinja u uznapređovalom stadiju

sAB-a, te smanjenja streptozotocinom uzrokovane astrocitoze. U ovom modelu uznapređovalog sAB-a tretman peroralnom galaktozom započeo je 4 mjeseca nakon STZ-icv primjene, kada je očito glavna streptozotocinom induciranih promjena ireverzibilna, zbog čega je izostao terapijski učinak oralne galaktoze.

- U **predsimptomatskom i blagom modelu fAB-a** galaktoza također **nije ispoljila blagotvorni učinak na kognitivnu funkciju** u Tg2576 miševa koji imaju prekomjernu ekspresiju humanog APP-a.
  - Usprkos uspješnoj normalizaciji metabolizma glukoze u mozgu, primjena oralne galaktoze dovela je do pogoršanja kognitivne funkcije u zdravih miševa u blagom modelu fAB-a, upućujući na potencijalnu štetnost peroralno primijenjene galaktoze u fiziološkim uvjetima gdje nema patološkog stanja, te je uzrokovala pogoršanje više mjerenih parametara u transgeničnih miševa, naročito u blagom modelu bolesti.
  - Oralna galaktoza nije utjecala na plazmatske razine aktivnog GLP-1, što je mogući razlog za izostanak njena blagotvornog učinka, iako je u oba modela izmjerena povećana ekspresija GLP-1R u mozgu.
  - Peroralna primjena galaktoze povećala je snižene razine inzulina u transgeničnih miševa u dobi od 7 mjeseci i smanjila aktivnost GSK3 $\beta$ , što zajedno s normalizacijom hipermetabolizma glukoze u mozgu upućuje na potencijalno blagotvoran učinak u predsimptomatskoj fazi fAB-a.
  - U miševa u dobi od 12 mjeseci peroralna primjena galaktoze pogoršala je već narušenu toleranciju glukoze, povećala razine topivog A $\beta$ , pogoršala astrocitozu, uzrokovala pojačanu fosforilaciju proteina tau, smanjila ekspresiju IR-a i povećala aktivnost GSK3 $\beta$ , što ukazuje na mogući štetni utjecaj na signalnu kaskadu IR-a i posljedično pogoršanje kognitivnog deficita.
  - Transgenični miševi Tg2576 pokazuju anti-anksiozno, dezinhbirano ponašanje na koje tretman galaktozom nije imao utjecaja ili ga je dodatno pogoršalo.
- Navedeni rezultati ukazuju na **važne razlike u metaboličkoj pozadini transgeničnog modela fAB-a i ne-transgeničnog modela sAB-a dobivenog primjenom STZ-icv** te posljedično, na važnost tih razlika prilikom ispitivanja pojedinih terapijskih rješenja u AB-u.

## 8. KRATKI SADRŽAJ

Alzheimerova bolest (AB) je neurodegenerativna bolest povezana s inzulinskom rezistencijom i hipometabolizmom glukoze u mozgu. Za razliku od štetnog učinka parenteralne, peroralno primijenjena galaktoza, uspješno sprječava nastanak kognitivnog deficita u modelu sporadičnog AB-a (sAB) dobivenog intracerebroventrikularnom primjenom streptozotocina (STZ-icv). Temeljem tih rezultata, u ovom istraživanju ispitan je utjecaj oralne galaktoze u dvije faze dvaju eksperimentalnih modela AB-a; ranoj i uznapredovaloj fazi STZ-icv-induciranog štakorskog modela sAB-a te pre-simptomatskom i blagom stadiju Tg2576 mišjeg modela familijarnog AB-a (fAB). Rezultati istraživanja pokazali su da dvomjesečna primjena oralne galaktoze uspješno normalizira kognitivni deficit u ranom stadiju sAB-a, posredovano poboljšanjem metabolizma glukoze u mozgu i stimulacijom učinaka posredovanih glukagonu sličnim peptidom 1 (GLP-1). Usprkos normalizaciji metabolizma glukoze u mozgu i pojedinih drugih mjerenih parametara, oralna galaktoza nije imala blagotvoran učinak na kogniciju i homeostazu sistemskog GLP-1 u modelu uznapredovalog sAB-a, kao ni u pre-simptomatskom i blagom fAB-u. Dobiveni rezultati daju nove smjernice potencijalnom terapijskom učinku oralne galaktoze upućujući da bi on mogao biti ograničen na sporadični oblik AB-a (nasuprot neučinkovitosti u fAB-u) i to samo u njegovom ranom stadiju (nasuprot uznapredovalom stadiju s ireverzibilnim promjenama). Ove spoznaje također govore u prilog postojanja metaboličkih razlika u patofiziologiji eksperimentalnog sAB i fAB te potvrđuju značaj odabira modela i stadija AB-a u interpretaciji rezultata nekliničkih ispitivanja novih terapijskih strategija u liječenju AB-a.

## 9. SUMMARY

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder associated with brain insulin resistance and glucose hypometabolism. Unlike its deleterious parenteral effect, chronic oral administration of galactose prevents cognitive impairment in a streptozotocin-induced model (STZ-icv) of sporadic AD (sAD). Based on this result, the present research investigated the effect of chronic oral galactose administration in two stages of two experimental models of AD; early and moderate STZ-icv-induced sAD in rats, and presymptomatic and mild familial AD (fAD) in Tg2576-transgenic mice. The research results showed that 2-month oral galactose treatment normalised previously developed cognitive deficits in early-stage sAD, associated with galactose-induced improvements in brain glucose metabolism and stimulation of glucagon-like peptide-1 (GLP-1)-mediated effects. Despite normalising brain glucose metabolism and other parameters in moderate sAD, presymptomatic and mild fAD, oral galactose did not improve cognition or systemic GLP-1 homeostasis. These results provide new insights into the therapeutic potential of oral galactose and indicate that the observed effect might be confined to sAD (compared to its ineffectiveness in fAD), and only in its early stage (in contrast to moderate sAD irreversible changes). These findings advocate the importance of metabolic differences in sAD/fAD pathophysiology and confirm the significance of the choice of the model and stage of AD when interpreting results from preclinical studies of new therapeutic strategies in AD.

**Therapeutic potential of orally administered galactose on cognitive and metabolic changes in two experimental models of Alzheimer's disease**

**Ana Babić Perhoč**

**2021**



## 10. POPIS LITERATURE

1. Selkoe DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science*. 2002;298(5594):789–91.
2. Keene C, Montine T, Kuller LH. Epidemiology, pathology, and pathogenesis of Alzheimer disease - UpToDate [Internet]. [pristupljeno 13.12.2019.]. Dostupno na: <https://www.uptodate.com/contents/epidemiology-pathology-and-pathogenesis-of-alzheimer-disease>
3. Winblad B, Amouyel P, Andrieu S, Ballard C, Brayne C, Brodaty H, i sur. Defeating Alzheimer's disease and other dementias: A priority for European science and society. *Lancet Neurol*. 2016;15(5):455–532.
4. Susac J, Todoric Laidlaw I, Herceg M, Jambrosic Sakoman A, Puljic K, Mimica N. Difficulties of Caregivers of Individuals Suffering from Alzheimer's Disease. *Soc Psihijatr*. 2019;47(3):405–11.
5. Patterson C. World Alzheimer Report 2018 The state of the art of dementia research: New frontiers [Internet]. Alzheimer's Disease International (ADI). 2018. Dostupno na: <https://www.alz.co.uk/research/world-report-2018>
6. Mimica N, Presečki P. Current treatment options for people with Alzheimer's disease in Croatia. *Chem Biol Interact*. 2010;187(1–3):409–10.
7. Du X, Wang X, Geng M. Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. Vol. 7, *Translational Neurodegeneration*. BioMed Central Ltd.; 2018.
8. Wang J, Gu BJ, Masters CL, Wang YJ. A systemic view of Alzheimer disease - Insights from amyloid- $\beta$  metabolism beyond the brain. *Nat Rev Neurol*. 2017;13(10):612–23.
9. Strassnig M, Ganguli M. About a peculiar disease of the cerebral cortex: Alzheimer's original case revisited. *Psychiatry (Edgmont)*. 2005;2(9):30–3.
10. Barage SH, Sonawane KD. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides*. 2015;52:1–18.
11. Šalković-Petrišić M. Amyloid cascade hypothesis: is it true for sporadic Alzheimer's disease. *Period Biol*. 2008;110(1).
12. Chen Y, Deng Y, Zhang B, Gong CX. Deregulation of brain insulin signaling in

- Alzheimer's disease. *Neurosci Bull.* 2014;30:282–94.
13. Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci.* 1991;12(C):383–8.
  14. Reitz C. Alzheimer's disease and the amyloid cascade hypothesis: a critical review. *Int J Alzheimers Dis.* 2012;2012:369808.
  15. Karasek M. *Aging and Age-related Diseases: The Basics.* Nova Publishers; 2006. 315–315 p.
  16. Musiek ES, Holtzman DM. Three dimensions of the amyloid hypothesis: Time, space and “wingmen.” *Nat Neurosci.* 2015;18(6):800–6.
  17. Vardy ERLC, Catto AJ, Hooper NM. Proteolytic mechanisms in amyloid- $\beta$  metabolism: Therapeutic implications for Alzheimer's disease. *Trends Mol Med.* 2005;11(10):464–72.
  18. Nunan J, Small DH. Regulation of APP cleavage by  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretases. *FEBS Lett.* 2000;483(1):6–10.
  19. Postina R, Schroeder A, Dewachter I, Bohl J, Schmitt U, Kojro E, i sur. A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest.* 2004;113(10):1456–64.
  20. Fan L, Mao C, Hu X, Zhang S, Yang Z, Hu Z, i sur. New Insights Into the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Front Neurol.* 2020;10:1312.
  21. Small DH, Nurcombe V, Reed G, Clarris H, Moir R, Beyreuther K, i sur. A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth. *J Neurosci.* 1994;14(4):2117–27.
  22. Furukawa K, Sopher BL, Rydel RE, Begley JG, Pham DG, Martin GM, i sur. Increased Activity-Regulating and Neuroprotective Efficacy of  $\alpha$ -Secretase-Derived Secreted Amyloid Precursor Protein Conferred by a C-Terminal Heparin-Binding Domain. *J Neurochem.* 2002;67(5):1882–96.
  23. Lannfelt L, Basun H, Wahlund LO, Rowe BA, Wagner SL. Decreased  $\alpha$ -secretase-cleaved amyloid precursor protein as a diagnostic marker for Alzheimer's disease. *Nat Med.* 1995;1(8):829–32.

24. Sennvik K, Fastbom J, Blomberg M, Wahlund LO, Winblad B, Benedikz E. Levels of  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretase cleaved amyloid precursor protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett*. 2000;278(3):169–72.
25. Gowing E, Roher AE, Woods AS, Cotter RJ, Chaney M, Little SP, i sur. Chemical characterization of A $\beta$  17-42 peptide, a component of diffuse amyloid deposits of Alzheimer disease. *J Biol Chem*. 1994;269(15):10987–90.
26. Näslund J, Schierhorn A, Hellman U, Lannfelt L, Roses AD, Tjernberg LO, i sur. Relative abundance of Alzheimer A $\beta$  amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(18):8378–82.
27. Di Carlo M, Giacomazza D, San Biagio PL. Alzheimer's disease: biological aspects, therapeutic perspectives and diagnostic tools. *J Phys Condens Matter*. 2012;24(24):244102.
28. Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, i sur. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med*. 1996;2(8):864–70.
29. Perl DP. Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med*. 2010;77(1):32–42.
30. Walsh DM, Selkoe DJ. A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem*. 2007;101(5):1172–84.
31. Eikelenboom P, Zhan SS, van Gool WA, Allsop D. Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci*. 1994;15(12):447–50.
32. Rogers J, Webster S, Lue LF, Brachova L, Civin WH, Emmerling M, i sur. Inflammation and Alzheimer's disease pathogenesis. *Neurobiol Aging*. 1996;17(5):681–6.
33. McGeer PL, McGeer EG. The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev*. 1995;21(2):195–218.
34. Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, i sur. 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.

35. Terry RD, Peck A, DeTeresa R, Schechter R, Horoupian DS. Some morphometric aspects of the brain in senile dementia of the alzheimer type. *Ann Neurol.* 1981;10(2):184–92.
36. Braak H, Braak E. Morphological criteria for the recognition of Alzheimer's disease and the distribution pattern of cortical changes related to this disorder. *Neurobiol Aging.* 1994;15(3):355–6.
37. Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(2):101–12.
38. Evin G, Weidemann A. Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease A $\beta$  amyloid peptides. *Peptides.* 2002;23(7):1285–97.
39. Dorey E, Bamji-Mirza M, Najem D, Li Y, Liu H, Callaghan D, i sur. Apolipoprotein E Isoforms Differentially Regulate Alzheimer's Disease and Amyloid- $\beta$ -Induced Inflammatory Response in vivo and in vitro. *J Alzheimer's Dis.* 2017;57(4):1265–79.
40. Tucker RP. The roles of microtubule-associated proteins in brain morphogenesis: a review. *Brain Res Rev.* 1990;15(2):101–20.
41. Neve RL, Harris P, Kosik KS, Kurnit DM, Donlon TA. Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Mol Brain Res.* 1986;1(3):271–80.
42. Andreadis A, Brown WM, Kosik KS. Structure and Novel Exons of the Human  $\tau$  Gene. *Biochemistry.* 1992;31(43):10626–33.
43. Lee G, Neve RL, Kosik KS. The microtubule binding domain of tau protein. *Neuron.* 1989;2(6):1615–24.
44. Butler M, Shelanski ML. Microheterogeneity of Micro tubule-Associated Tau Proteins Is Due to Differences in Phosphorylation. *J Neurochem.* 1986;47(5):1517–22.
45. Ksiezak-Reding H, Liu WK, Yen SH. Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments. *Brain Res.* 1992;597(2):209–19.
46. Šimić G, Babić Leko M, Wray S, Harrington C, Delalle I, Jovanov-Milošević N, i sur. Tau protein hyperphosphorylation and aggregation in alzheimer's disease and other tauopathies, and possible neuroprotective strategies. *Biomolecules.* 2016;6(1):2–28.

47. Mazanetz MP, Fischer PM. Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(6):464–79.
48. Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's Disease. *N Engl J Med.* 2010;362(4):329–44.
49. Khlistunova I, Biernat J, Wang Y, Pickhardt M, von Bergen M, Gazova Z, i sur. Inducible expression of Tau repeat domain in cell models of tauopathy: aggregation is toxic to cells but can be reversed by inhibitor drugs. *J Biol Chem.* 2006;281(2):1205–14.
50. Santacruz K, Lewis J, Spires T, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M, i sur. Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science.* 2005;309(5733):476–81.
51. Oddo S, Vasilevko V, Caccamo A, Kitazawa M, Cribbs DH, LaFerla FM. Reduction of soluble Abeta and tau, but not soluble Abeta alone, ameliorates cognitive decline in transgenic mice with plaques and tangles. *J Biol Chem.* 2006;281(51):39413–23.
52. Roy S, Zhang B, Lee VMY, Trojanowski JQ. Axonal transport defects: A common theme in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol.* 2005;109(1):5–13.
53. Wallin AK, Blennow K, Andreasen N, Minthon L. CSF biomarkers for Alzheimer's Disease: levels of beta-amyloid, tau, phosphorylated tau relate to clinical symptoms and survival. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2006;21(3):131–8.
54. Mattsson N, Zetterberg H, Hansson O, Andreasen N, Parnetti L, Jonsson M, i sur. CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. *JAMA.* 2009;302(4):385–93.
55. Kidemet-Piskač S, Babić Leko M, Blažeković A, Langer Horvat L, Klepac N, Sonicki Z, i sur. Evaluation of cerebrospinal fluid phosphorylated tau 231 as a biomarker in the differential diagnosis of Alzheimer's disease and vascular dementia. *CNS Neurosci Ther.* 2018;24(8):734–40.
56. Babić M, Štrac DŠ, Mück-Šeler D, Pivac N, Stanić G, Hof PR, i sur. Update on the core and developing cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer disease. *Croat Med J.* 2014;55(4):347–65.
57. Götz J, Chen F, van Dorpe J, Nitsch RM. Formation of neurofibrillary tangles in P3011 tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science.* 2001;293(5534):1491–5.

58. Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, et al. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron*. 2003;39(3):409–21.
59. Lewis J, Dickson DW, Lin WL, Chisholm L, Corral A, Jones G, et al. Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science*. 2001;293(5534):1487–91.
60. Roberson ED, Scarce-Levie K, Palop JJ, Yan F, Cheng IH, Wu T, et al. Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science*. 2007;316(5825):750–4.
61. Rapoport M, Dawson HN, Binder LI, Vitek MP, Ferreira A. Tau is essential to beta - amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(9):6364–9.
62. Hasselmo ME, Anderson BP, Bower JM. Cholinergic modulation of cortical associative memory function. *J Neurophysiol*. 1992;67(5):1230–46.
63. Haam J, Yakel JL. Cholinergic modulation of the hippocampal region and memory function. *J Neurochem*. 2017;142(Suppl 2):111–21.
64. Fine A, Hoyle C, Maclean CJ, LeVatte TL, Baker HF, Ridley RM. Learning impairments following injection of a selective cholinergic immunotoxin, ME20.4 IgG-saporin, into the basal nucleus of Meynert in monkeys. *Neuroscience*. 1997;81(2):331–43.
65. Miranda MI, Bermúdez-Rattoni F. Reversible inactivation of the nucleus basalis magnocellularis induces disruption of cortical acetylcholine release and acquisition, but not retrieval, of aversive memories. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(11):6478–82.
66. Sarter M, Bruno JP. Cognitive functions of cortical acetylcholine: Toward a unifying hypothesis. *Brain Res Rev*. 1997;23(1–2):28–46.
67. Tagliavini F, Pilleri G. Neuronal Counts in Basal Nucleus of Meynert in Alzheimer Disease and in Simple Senile Dementia. *Lancet*. 1983;321(8322):469–70.
68. Davies P, Maloney AJF. Selective Loss of Central Cholinergic Neurons in Alzheimer's Disease. *Lancet*. 1976;308(8000):1403.
69. Liu P-P, Xie Y, Meng X-Y, Kang J-S. History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. *Signal Transduct Target Ther*. 2019;4(1):1–22.

70. Brinkman SD, Gershon S. Measurement of cholinergic drug effects on memory in alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 1983;4(2):139–45.
71. Hölscher C. Diabetes as a risk factor for Alzheimer's disease: Insulin signalling impairment in the brain as an alternative model of Alzheimer's disease. In: *Biochemical Society Transactions*. Portland Press; 2011. p. 891–7.
72. Hoyer S. Causes and consequences of disturbances of cerebral glucose metabolism in sporadic Alzheimer disease: therapeutic implications. *Adv Exp Med Biol*. 2004;541:135–52.
73. Hoyer S. Is sporadic Alzheimer disease the brain type of non-insulin dependent diabetes mellitus? A challenging hypothesis. *J Neural Transm*. 1998;105(4–5):415–22.
74. De La Monte SM, Wands JR. Alzheimer's disease is type 3 diabetes-evidence reviewed. *J Diabetes Sci Technol*. 2008;2(6):1101–13.
75. Steen E, Terry BM, Rivera EJ, Cannon JL, Neely TR, Tavares R, i sur. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? *J Alzheimers Dis*. 2005;7(1):63–80.
76. Pugazhenti S, Qin L, Reddy PH. Common neurodegenerative pathways in obesity, diabetes, and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys acta Mol basis Dis*. 2017;1863(5):1037–45.
77. Biessels GJ, Strachan MWJ, Visseren FLJ, Kappelle LJ, Whitmer RA. Dementia and cognitive decline in type 2 diabetes and prediabetic stages: towards targeted interventions. *lancet Diabetes Endocrinol*. 2014;2(3):246–55.
78. Tumminia A, Vinciguerra F, Parisi M, Frittitta L. Type 2 diabetes mellitus and alzheimer's disease: Role of insulin signalling and therapeutic implications. *Int J Mol Sci*. 2018;19(11).
79. Yang Y, Song W. Molecular links between Alzheimer's disease and diabetes mellitus. *Neuroscience*. 2013;250:140–50.
80. Kleinridders A, Ferris HA, Cai W, Kahn CR. Insulin action in brain regulates systemic metabolism and brain function. *Diabetes*. 2014;63(7):2232–43.
81. Rad SK, Arya A, Karimian H, Madhavan P, Rizwan F, Koshy S, i sur. Mechanism

- involved in insulin resistance via accumulation of  $\beta$ -amyloid and neurofibrillary tangles: Link between type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Drug Des Devel Ther.* 2018;12:3999–4021.
82. Biessels GJ, De Leeuw FE, Lindeboom J, Barkhof F, Scheltens P. Increased cortical atrophy in patients with Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2006;77(3):304–7.
  83. Hoyer S. Models of Alzheimer's disease: Cellular and molecular aspects. *J Neural Transm Suppl.* 1997;(49):11–21.
  84. Kurochkin I V. Insulin-degrading enzyme: Embarking on amyloid destruction. *Trends Biochem Sci.* 2001;26(7):421–5.
  85. Son SM, Song H, Byun J, Park KS, Jang HC, Park YJ, i sur. Altered APP processing in insulin-resistant conditions is mediated by autophagosome accumulation via the inhibition of mammalian target of rapamycin pathway. *Diabetes.* 2012;61(12):3126–38.
  86. Zhao AZ, Shinohara MM, Huang D, Shimizu M, Eldar-Finkelman H, Krebs EG, i sur. Leptin induces insulin-like signaling that antagonizes cAMP elevation by glucagon in hepatocytes. *J Biol Chem.* 2000;275(15):11348–54.
  87. Hölscher C. Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: Its role in synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 1997;20(7):298–303.
  88. Li L, Hölscher C. Common pathological processes in Alzheimer disease and type 2 diabetes: a review. *Brain Res Rev.* 2007;56(2):384–402.
  89. Schubert M, Brazil DP, Burks DJ, Kushner JA, Ye J, Flint CL, i sur. Insulin receptor substrate-2 deficiency impairs brain growth and promotes tau phosphorylation. *J Neurosci.* 2003;23(18):7084–92.
  90. Cole AR, Astell A, Green C, Sutherland C. Molecular connexions between dementia and diabetes. *Neurosci Biobehav Rev.* 2007;31(7):1046–63.
  91. Ishiguro K, Shiratsuchi A, Sato S, Omori A, Arioka M, Kobayashi S, i sur. Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments. *FEBS Lett.* 1993;325(3):167–72.
  92. 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.
93. Ledesma MD, Bonay P, Colaço C, Avila J. Analysis of microtubule-associated protein tau glycation in paired helical filaments. *J Biol Chem*. 1994;269(34):21614–9.
  94. Vlassara H, Uribarri J. Advanced glycation end products (AGE) and diabetes: cause, effect, or both? *Curr Diab Rep*. 2014;14(1):453.
  95. Ansari MA, Scheff SW. Oxidative stress in the progression of Alzheimer disease in the frontal cortex. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2010;69(2):155–67.
  96. Wang X, Wang W, Li L, Perry G, Lee H, Zhu X. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1842(8):1240–7.
  97. S Roriz-Filho J, Sá-Roriz TM, Rosset I, Camozzato AL, Santos AC, Chaves MLF, i sur. (Pre)diabetes, brain aging, and cognition. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1792(5):432–43.
  98. Tuppo EE, Arias HR. The role of inflammation in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37(2):289–305.
  99. Heneka MT, Rodríguez JJ, Verkhratsky A. Neuroglia in neurodegeneration. *Brain Res Rev*. 2010;63(1–2):189–211.
  100. Heneka MT, O'Banion MK, Terwel D, Kummer MP. Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neural Transm*. 2010;117(8):919–47.
  101. Markesbery WR, Carney JM. Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathol*. 1999;9(1):133–46.
  102. Yin F, Sancheti H, Patil I, Cadenas E. Energy metabolism and inflammation in brain aging and Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med*. 2016;100:108–22.
  103. Munoz L, Ammit AJ. Targeting p38 MAPK pathway for the treatment of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*. 2010;58(3):561–8.
  104. Mistur R, Mosconi L, de Santi S, Guzman M, Li Y, Tsui W, i sur. Current challenges for the early detection of alzheimer's disease: Brain imaging and CSF studies. *J Clin Neurol*. 2009;5(4):153–66.
  105. Mosconi L, Pupi A, De Leon MJ. Brain glucose hypometabolism and oxidative stress in preclinical Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1147:180–95.

106. Reiman EM, Chen K, Alexander GE, Caselli RJ, Bandy D, Osborne D, i sur. Functional brain abnormalities in young adults at genetic risk for late-onset Alzheimer's dementia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(1):284–9.
107. Chen K, Langbaum JBS, Fleisher AS, Ayutyanont N, Reschke C, Lee W, i sur. Twelve-month metabolic declines in probable Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment assessed using an empirically pre-defined statistical region-of-interest: findings from the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. *Neuroimage*. 2010;51(2):654–64.
108. Langbaum JBS, Chen K, Caselli RJ, Lee W, Reschke C, Bandy D, i sur. Hypometabolism in Alzheimer-affected brain regions in cognitively healthy Latino individuals carrying the apolipoprotein E epsilon4 allele. *Arch Neurol*. 2010;67(4):462—468.
109. Mosconi L, Berti V, Glodzik L, Pupi A, De Santi S, de Leon MJ. Pre-clinical detection of Alzheimer's disease using FDG-PET, with or without amyloid imaging. *J Alzheimers Dis*. 2010;20(3):843–54.
110. Kidd PM. Alzheimer's disease, amnesic mild cognitive impairment, and age-associated memory impairment: current understanding and progress toward integrative prevention. *Altern Med Rev*. 2008;13(2):85–115.
111. Hyman BT, Phelps CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Carrillo MC, i sur. National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement*. 2012;8(1):1–13.
112. Anor CJ, O'Connor S, Saund A, Tang-Wai DF, Keren R, Tartaglia MC. Neuropsychiatric Symptoms in Alzheimer Disease, Vascular Dementia, and Mixed Dementia. *Neurodegener Dis*. 2017;17(4–5):127–34.
113. Borovečki F. Rana dijagnoza Alzheimerove bolesti / Early Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Medicus*. 2019;28(1 (Neurologija)):23–6.
114. MSD priručnik dijagnostike i terapije: Alzheimerova bolest [Internet]. [pristupljeno 01.06.2020 .]. Dostupno na: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/neurologija/delirij-i-demencija/alzheimerova-bolest>
115. Laurijssens B, Aujard F, Rahman A. Animal models of Alzheimer's disease and drug

- development. *Drug Discov Today Technol.* 2013;10(3):e319-27.
116. Elder GA, Gama Sosa MA, De Gasperi R. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med.* 2010;77(1):69–81.
  117. Tayebati SK. Animal models of cognitive dysfunction. *Mech Ageing Dev.* 2006;127(2):100–8.
  118. Götz J, Ittner LM. Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurosci.* 2008;9(7):532–44.
  119. Lee S-E, Hyun H, Park M-R, Choi Y, Son Y-J, Park Y-G, i sur. Production of transgenic pig as an Alzheimer's disease model using a multi-cistronic vector system. *PLoS One.* 2017;12(6):e0177933.
  120. Van Dam D, De Deyn PP. Non human primate models for Alzheimer's disease-related research and drug discovery. *Expert Opin Drug Discov.* 2017;12(2):187–200.
  121. Neha, Sodhi RK, Jaggi AS, Singh N. Animal models of dementia and cognitive dysfunction. *Life Sci.* 2014;109(2):73–86.
  122. Erickson CA, Barnes CA. The neurobiology of memory changes in normal aging. *Exp Gerontol.* 2003;38(1–2):61–9.
  123. Gupta VK, Scheunemann L, Eisenberg T, Mertel S, Bhukel A, Koemans TS, i sur. Restoring polyamines protects from age-induced memory impairment in an autophagy-dependent manner. *Nat Neurosci.* 2013;16(10):1453–60.
  124. Takeda T, Hosokawa M, Takeshita S, Irino M, Higuchi K, Matsushita T, i sur. A new murine model of accelerated senescence. *Mech Ageing Dev.* 1981;17(2):183–94.
  125. Chen Y, Wei G, Nie H, Lin Y, Tian H, Liu Y, i sur.  $\beta$ -Asarone prevents autophagy and synaptic loss by reducing ROCK expression in asenescence-accelerated prone 8 mice. *Brain Res.* 2014;1552:41–54.
  126. Chen C, Li X-H, Zhang S, Tu Y, Wang Y-M, Sun H-T. 7,8-dihydroxyflavone ameliorates scopolamine-induced Alzheimer-like pathologic dysfunction. *Rejuvenation Res.* 2014;17(3):249–54.
  127. Depoortere RY, Auclair AL, Newman-Tancredi A. NLX-101, a cortical 5-HT<sub>1A</sub> receptor biased agonist, reverses scopolamine-induced deficit in the delayed non-

- matching to position model of cognition. *Brain Res.* 2021;1765:147493.
128. da Silva DS, Soares MSP, Teixeira FC, de Mello JE, de Souza AA, Luduvico KP, i sur. Multitarget Effect of 2-(4-(Methylthio)phenyl)-3-(3-(piperidin-1-yl)propyl)thiazolidin-4-one in a Scopolamine-Induced Amnesic Rat Model. *Neurochem Res.* 2021;46(6).
  129. Berté TE, Dalmagro AP, Zimath PL, Gonçalves AE, Meyre-Silva C, Bürger C, i sur. Taraxerol as a possible therapeutic agent on memory impairments and Alzheimer's disease: Effects against scopolamine and streptozotocin-induced cognitive dysfunctions. *Steroids.* 2018;132:5–11.
  130. Nazarinia E, Rezayof A, Sardari M, Yazdanbakhsh N. Contribution of the basolateral amygdala NMDA and muscarinic receptors in rat's memory retrieval. *Neurobiol Learn Mem.* 2017;139:28–36.
  131. Woolley ML, Waters KA, Gartlon JE, Lacroix LP, Jennings C, Shaughnessy F, i sur. Evaluation of the pro-cognitive effects of the AMPA receptor positive modulator, 5-(1-piperidinylcarbonyl)-2,1,3-benzoxadiazole (CX691), in the rat. *Psychopharmacology (Berl).* 2009;202(1–3):343–54.
  132. 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;112:1199–208.
  133. Plaschke K, Kopitz J, Siegelin M, Schliebs R, Salkovic-Petrisic M, Riederer P, i sur. 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.
  134. Knezovic A, Osmanovic-Barilar J, Curlin M, Hof PR, Simic G, Riederer P, i sur. Staging of cognitive deficits and neuropathological and ultrastructural changes in streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease. *J Neural Transm.* 2015;122:577–92.
  135. Salkovic-Petrisic M, Hoyer S. Central insulin resistance as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: An experimental approach. *J Neural Transm Suppl.* 2007;217–33.
  136. Hashemi Nosrat Abadi T, Vaghef L, Babri S, Mahmood-Alilo M, Beirami M. Effects of different exercise protocols on ethanol-induced spatial memory impairment in adult male

- rats. *Alcohol*. 2013;47(4):309–16.
137. Lopatynska-Mazurek M, Pankowska A, Gibula-Tarłowska E, Pietura R, Kotłinska JH. Rapamycin improves recognition memory and normalizes amino-acids and amines levels in the hippocampal dentate gyrus in adult rats exposed to ethanol during the neonatal period. *Biomolecules*. 2021;11(3):1–17.
  138. Yamada K, Ren X, Nabeshima T. Perspectives of pharmacotherapy in Alzheimer's disease. *Jpn J Pharmacol*. 1999;80(1):9–14.
  139. Meng QH, Lou FL, Hou WX, Liu M, Guo H, Zhang XM. Acetylpuerarin reduces inflammation and improves memory function in a rat model of Alzheimer's disease induced by Aβ<sub>1-42</sub>. *Pharmazie*. 2013;68(11):904–8.
  140. Rehman IU, Ahmad R, Khan I, Lee HJ, Park J, Ullah R, i sur. Nicotinamide Ameliorates Amyloid Beta-Induced Oxidative Stress-Mediated Neuroinflammation and Neurodegeneration in Adult Mouse Brain. *Biomedicines*. 2021;9(4):408.
  141. Lasagna-Reeves CA, Castillo-Carranza DL, Sengupta U, Clos AL, Jackson GR, Kaye R. Tau oligomers impair memory and induce synaptic and mitochondrial dysfunction in wild-type mice. *Mol Neurodegener*. 2011;6(1).
  142. Koladiya RU, Jaggi AS, Singh N, Sharma BK. Ameliorative role of Atorvastatin and Pitavastatin in L-Methionine induced vascular dementia in rats. *BMC Pharmacol*. 2008;8:14.
  143. Sain H, Sharma B, Jaggi AS, Singh N. Pharmacological investigations on potential of peroxisome proliferator-activated receptor-γ agonists in hyperhomocysteinemia-induced vascular dementia in rats. *Neuroscience*. 2011;192:322–33.
  144. Kumar A, Seghal N, Padi SV, Naidu PS. Differential effects of cyclooxygenase inhibitors on intracerebroventricular colchicine-induced dysfunction and oxidative stress in rats. *Eur J Pharmacol*. 2006;551(1–3):58–66.
  145. Raghavendra M, Maiti R, Kumar S, Acharya S. Role of aqueous extract of *Azadirachta indica* leaves in an experimental model of Alzheimer's disease in rats. *Int J Appl basic Med Res*. 2013;3(1):37–47.
  146. Zhang Z, Simpkins JW. An okadaic acid-induced model of tauopathy and cognitive deficiency. *Brain Res*. 2010;1359:233–46.

147. Kamat PK, Rai S, Nath C. Okadaic acid induced neurotoxicity: an emerging tool to study Alzheimer's disease pathology. *Neurotoxicology*. 2013;37:163–72.
148. dos Santos Tramontin N, da Silva S, Arruda R, Ugioni KS, Canteiro PB, de Bem Silveira G, i sur. Gold Nanoparticles Treatment Reverses Brain Damage in Alzheimer's Disease Model. *Mol Neurobiol*. 2020;57(2):926–36.
149. Yamada K, Nabeshima T, Kameyama T. Impairment of active avoidance response in rats with continuous infusion of quinolinic acid into the lateral ventricle. *J Pharmacobiodyn*. 1991;14(6):351–5.
150. Ramirez C, Tercero I, Pineda A, Burgos JS. Simvastatin is the statin that most efficiently protects against kainate-induced excitotoxicity and memory impairment. *J Alzheimers Dis*. 2011;24(1):161–74.
151. Wang Y, Xia J, Shen M, Zhou Y, Wu Z, Shi Y, i sur. Effects of Bis-MEP on reversing amyloid plaque deposition and spatial learning and memory impairments in a mouse model of  $\beta$ -amyloid peptide- And ibotenic acid-induced Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci*. 2019;11(JAN).
152. Goshadrou F, Sadeghi B. Nucleus basalis of Meynert modulates signal processing in rat layer 5 somatosensory cortex but leads to memory impairment and tactile discrimination deficits following lesion. *Behav Brain Res*. 2020;386.
153. Dhingra D, Parle M, Kulkarni SK. Memory enhancing activity of Glycyrrhiza glabra in mice. *J Ethnopharmacol*. 2004;91(2–3):361–5.
154. Mani V, Ramasamy K, Ahmad A, Parle M, Shah SAA, Majeed ABA. Protective effects of total alkaloidal extract from *Murraya koenigii* leaves on experimentally induced dementia. *Food Chem Toxicol*. 2012;50(3–4):1036–44.
155. Bonda DJ, Lee H, Blair JA, Zhu X, Perry G, Smith MA. Role of metal dyshomeostasis in Alzheimer's disease. *Metallomics*. 2011;3(3):267–70.
156. Jellinger KA. The relevance of metals in the pathophysiology of neurodegeneration, pathological considerations. *Int Rev Neurobiol*. 2013;110:1–47.
157. Sripetchwandee J, Khamsekaew J, Svasti S, Srichairatanakool S, Fucharoen S, Chattipakorn N, i sur. Deferiprone and efonidipine mitigated iron-overload induced neurotoxicity in wild-type and thalassemic mice. *Life Sci*. 2019;239.

158. Kaur G, Prakash A. Involvement of the nitric oxide signaling in modulation of naringin against intranasal manganese and intracerebroventricular  $\beta$ -amyloid induced neurotoxicity in rats. *J Nutr Biochem.* 2020;76.
159. Henriques AG, Domingues SCTS, Fardilha M, da Cruz e Silva EF, da Cruz e Silva OAB. Sodium azide and 2-deoxy-D-glucose-induced cellular stress affects phosphorylation-dependent AbetaPP processing. *J Alzheimers Dis.* 2005;7(3):201–62.
160. Luques L, Shoham S, Weinstock M. Chronic brain cytochrome oxidase inhibition selectively alters hippocampal cholinergic innervation and impairs memory: prevention by ladostigil. *Exp Neurol.* 2007;206(2):209–19.
161. Zhang R yi, Zhang L, Zhang L, Wang Y lan, Li L. Anti-amyloidgenic and neurotrophic effects of tetrahydroxystilbene glucoside on a chronic mitochondrial dysfunction rat model induced by sodium azide. *J Nat Med.* 2018;72(3):596–606.
162. Megyeri K, Albert M, Kompagne H, Hársing LG, Gacsályi I, Lévay G. A new treatment regime for sodium azide to evoke experimental Alzheimer’s disease for pharmacological screening. *Proc Meas Behav.* 2008;2008:296–7.
163. Singh N, Sharma A, Singh M. Effects of BN-50730 (PAF receptor antagonist) and physostigmine (AChE inhibitor) on learning and memory in mice. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 1997;19(9):585–8.
164. Yamada K, Noda Y, Nakayama S, Komori Y, Sugihara H, Hasegawa T, i sur. Role of nitric oxide in learning and memory and in monoamine metabolism in the rat brain. *Br J Pharmacol.* 1995;115(5):852–8.
165. Zou LB, Yamada K, Tanaka T, Kameyama T, Nabeshima T. Nitric oxide synthase inhibitors impair reference memory formation in a radial arm maze task in rats. *Neuropharmacology.* 1998;37(3):323–30.
166. Bojanova E, Genkova-Papazova M, Petkova B, Lazarova-Bakarova M. Effects of verapamil on electroconvulsive shock- and clonidine-induced amnesia. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 1997;19(2):93–7.
167. Torkaman-Boutorabi A, Sheidadoust H, Hashemi-Hezaveh SM, Zarrindast MR. Influence of morphine on medial prefrontal cortex alpha2 adrenergic system in passive avoidance learning in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2015;133:92–8.

168. Ortega-Alvaro A, Gibert-Rahola J, Micó JA. Influence of chronic treatment with olanzapine, clozapine and scopolamine on performance of a learned 8-arm radial maze task in rats. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry*. 2006;30(1):104–11.
169. Pan S-Y, Zhang Y, Guo B-F, Han Y-F, Ko K-M. Tacrine and bis(7)-tacrine attenuate cycloheximide-induced amnesia in mice, with attention to acute toxicity. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2011;109(4):261–5.
170. Vohora D, Pal SN, Pillai KK. Protection from phenytoin-induced cognitive deficit by *Bacopa monniera*, a reputed Indian nootropic plant. *J Ethnopharmacol*. 2000;71(3):383–90.
171. Nagib MM, Tadros MG, Rahmo RM, Sabri NA, Khalifa AE, Masoud SI. Ameliorative Effects of  $\alpha$ -Tocopherol and/or Coenzyme Q10 on Phenytoin-Induced Cognitive Impairment in Rats: Role of VEGF and BDNF-TrkB-CREB Pathway. *Neurotox Res*. 2019;35(2):451–62.
172. Bilkei-Gorzo A. Genetic mouse models of brain ageing and Alzheimer's disease. *Pharmacol Ther*. 2014;142(2):244–57.
173. Balducci C, Forloni G. APP transgenic mice: their use and limitations. *Neuromolecular Med*. 2011;13(2):117–37.
174. Umeda T, Maekawa S, Kimura T, Takashima A, Tomiyama T, Mori H. Neurofibrillary tangle formation by introducing wild-type human tau into APP transgenic mice. *Acta Neuropathol*. 2014;127(5):685–98.
175. Do Carmo S, Cuellar AC. Modeling Alzheimer's disease in transgenic rats. *Mol Neurodegener*. 2013;8:37.
176. Mahley RW, Huang Y. Alzheimer disease: multiple causes, multiple effects of apolipoprotein E4, and multiple therapeutic approaches. Vol. 65, *Annals of neurology*. United States; 2009. p. 623–5.
177. Youmans KL, Tai LM, Nwabuisi-Heath E, Jungbauer L, Kanekiyo T, Gan M, et al. APOE4-specific changes in A $\beta$  accumulation in a new transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem*. 2012;287(50):41774–86.
178. Willem M, Dewachter I, Smyth N, Van Dooren T, Borghgraef P, Haass C, et al. Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 increases amyloid deposition in brain



- parenchyma but reduces cerebrovascular amyloid angiopathy in aging BACE x APP[V717I] double-transgenic mice. *Am J Pathol.* 2004;165(5):1621–31.
179. Citron M, Westaway D, Xia W, Carlson G, Diehl T, Levesque G, et al. Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med.* 1997;3(1):67–72.
  180. Parent AT, Thinakaran G. Modeling presenilin-dependent familial Alzheimer's disease: emphasis on presenilin substrate-mediated signaling and synaptic function. *Int J Alzheimers Dis.* 2010;2010.
  181. Stokin GB, Lillo C, Falzone TL, Brusch RG, Rockenstein E, Mount SL, et al. Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Science.* 2005;307(5713):1282–8.
  182. Reddy PH. Abnormal tau, mitochondrial dysfunction, impaired axonal transport of mitochondria, and synaptic deprivation in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 2011;1415:136–48.
  183. LaFerla FM, Green KN. Animal models of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(11).
  184. van der Putten H, Wiederhold KH, Probst A, Barbieri S, Mistl C, Danner S, et al. Neuropathology in mice expressing human alpha-synuclein. *J Neurosci.* 2000;20(16):6021–9.
  185. Andreasson KI, Savonenko A, Vidensky S, Goellner JJ, Zhang Y, Shaffer A, et al. Age-dependent cognitive deficits and neuronal apoptosis in cyclooxygenase-2 transgenic mice. *J Neurosci.* 2001;21(20):8198–209.
  186. Capsoni S, Ugolini G, Comparini A, Ruberti F, Berardi N, Cattaneo A. Alzheimer-like neurodegeneration in aged antinerve growth factor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(12):6826–31.
  187. Sodhi RK, Singh N, Jaggi AS. Neuroprotective mechanisms of peroxisome proliferator-activated receptor agonists in Alzheimer's disease. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2011;384(2):115–24.
  188. Santo-Yamada Y, Yamada K, Wada K. Posttraining administration of gastrin-releasing peptide improves memory loss in scopolamine- and hypoxia-induced amnesic mice.

- Physiol Behav. 2001;74(1–2):139–43.
189. Chandler MJ, DeLeo J, Carney JM. An unanesthetized-gerbil model of cerebral ischemia-induced behavioral changes. *J Pharmacol Methods*. 1985;14(2):137–46.
  190. Yasuda N, Ishii T, Oyama D, Fukuta T, Agato Y, Sato A, i sur. Neuroprotective effect of nobiletin on cerebral ischemia-reperfusion injury in transient middle cerebral artery-occluded rats. *Brain Res*. 2014;1559:46–54.
  191. Palmer AM, Gershon S. Is the neuronal basis of Alzheimer’s disease cholinergic or glutamatergic? *FASEB J*. 1990;4(10):2745–52.
  192. Myhrer T. Animal models of Alzheimer’s disease: glutamatergic denervation as an alternative approach to cholinergic denervation. *Neurosci Biobehav Rev*. 1993;17(2):195–202.
  193. Tang YP, Noda Y, Hasegawa T, Nabeshima T. A concussive-like brain injury model in mice (II): selective neuronal loss in the cortex and hippocampus. *J Neurotrauma*. 1997;14(11):863–73.
  194. Tang YP, Noda Y, Hasegawa T, Nabeshima T. A concussive-like brain injury model in mice (I): impairment in learning and memory. *J Neurotrauma*. 1997;14(11):851–62.
  195. Turgeon SM, Kegel G, Davis MM. Electrolytic lesions of the medial septum enhance latent inhibition in a conditioned taste aversion paradigm. *Brain Res*. 2001;890(2):333–7.
  196. Sumanth M, Sowmya H, Nagaraj S V., Narasimharaju K. Efficacy of Donepezil and Galantamine in retrograde amnesia. *Asian J Pharm Clin Res*. 2010;3(4):23–5.
  197. Zhao N, Zhong C, Wang Y, Zhao Y, Gong N, Zhou G, i sur. Impaired hippocampal neurogenesis is involved in cognitive dysfunction induced by thiamine deficiency at early pre-pathological lesion stage. *Neurobiol Dis*. 2008;29(2):176–85.
  198. Lu’o’ng K vinh quoc, Nguyen LTH. Role of thiamine in Alzheimer’s disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen*. 2011;26(8):588–98.
  199. Butterworth RF, Héroux M. Effect of pyriithiamine treatment and subsequent thiamine rehabilitation on regional cerebral amino acids and thiamine-dependent enzymes. *J Neurochem*. 1989;52(4):1079–84.

200. Savage LM, Hall JM, Resende LS. Translational rodent models of Korsakoff syndrome reveal the critical neuroanatomical substrates of memory dysfunction and recovery. *Neuropsychol Rev.* 2012;22(2):195–209.
201. Benedikz E, Kloskowska E, Winblad B. The rat as an animal model of Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med.* 2009;13(6):1034–42.
202. Do Carmo S, Cuellar AC. Modeling Alzheimer's disease in transgenic rats. *Mol Neurodegener.* 2013;8(1):37.
203. Götz J, Streffer JR, David D, Schild A, Hoernli F, Pennanen L, i sur. Transgenic animal models of Alzheimer's disease and related disorders: Histopathology, behavior and therapy. *Mol Psychiatry.* 2004;9(7):664–83.
204. Spires TL, Hyman BT. Transgenic models of Alzheimer's disease: learning from animals. *NeuroRx.* 2005;2(3):423–37.
205. German DC, Eisch AJ. Mouse models of Alzheimer's disease: insight into treatment. *Rev Neurosci.* 2004;15(5):353–69.
206. Braidy N, Muñoz P, Palacios AG, Castellano-Gonzalez G, Inestrosa NC, Chung RS, i sur. Recent rodent models for Alzheimer's disease: Clinical implications and basic research. *J Neural Transm.* 2012;119(2):173–95.
207. Myers A, McGonigle P. Overview of Transgenic Mouse Models for Alzheimer's Disease. *Curr Protoc Neurosci.* 2019;89(1).
208. Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, i sur. Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science.* 1996;274(5284):99–102.
209. Tg2576 | ALZFORUM [Internet]. [pristupljeno 23.04.2018.]. Dostupno na: <https://www.alzforum.org/research-models/tg2576>
210. Westerman MA, Cooper-Blacketer D, Mariash A, Kotilinek L, Kawarabayashi T, Younkin LH, i sur. The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2002;22(5):1858–67.
211. Irizarry MC, McNamara M, Fedorchak K, Hsiao K, Hyman BT. APPSw transgenic mice develop age-related A beta deposits and neuropil abnormalities, but no neuronal loss in

- CA1. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1997;56(9):965–73.
212. Lanz TA, Carter DB, Merchant KM. Dendritic spine loss in the hippocampus of young PDAPP and Tg2576 mice and its prevention by the ApoE2 genotype. *Neurobiol Dis.* 2003;13(3):246–53.
213. Jacobsen JS, Wu C-C, Redwine JM, Comery TA, Arias R, Bowlby M, et al. Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer’s disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(13):5161–6.
214. Chapman PF, White GL, Jones MW, Cooper-Blacketer D, Marshall VJ, Irizarry M, et al. Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat Neurosci.* 1999;2(3):271–6.
215. Kam K, Duffy ÁM, Moretto J, LaFrancois JJ, Scharfman HE. Interictal spikes during sleep are an early defect in the Tg2576 mouse model of  $\beta$ -amyloid neuropathology. *Sci Rep.* 2016;6:20119.
216. Frautschy SA, Yang F, Irizarry M, Hyman B, Saido TC, Hsiao K, et al. Microglial response to amyloid plaques in APPsw transgenic mice. *Am J Pathol.* 1998;152(1):307–17.
217. Pedersen W, Flynn E. Insulin resistance contributes to aberrant stress responses in the Tg2576 mouse model of Alzheimer’s disease. *Neurobiol Dis.* 2004;17(3):500–6.
218. Bigl M, Apelt J, Eschrich K, Schliebs R. Cortical glucose metabolism is altered in aged transgenic Tg2576 mice that demonstrate Alzheimer plaque pathology. *J Neural Transm.* 2003;110(1):77–94.
219. Pedersen WA, Culmsee C, Ziegler D, Herman JP, Mattson MP. Aberrant stress response associated with severe hypoglycemia in a transgenic mouse model of Alzheimer’s disease. *J Mol Neurosci.* 1999;13(1–2):159–65.
220. Ho L, Qin W, Pompl PN, Xiang Z, Wang J, Zhao Z, et al. Diet-induced insulin resistance promotes amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer’s disease. *FASEB J.* 2004;18(7):902–4.
221. Götz J, Bodea LG, Goedert M. Rodent models for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci.* 2018;19(10):583–98.

222. Li X, Bao X, Wang R. Experimental models of Alzheimer's disease for deciphering the pathogenesis and therapeutic screening (Review). *Int J Mol Med*. 2016;37(2):271–83.
223. Myers A, McGonigle P. Overview of Transgenic Mouse Models for Alzheimer's Disease. *Curr Protoc Neurosci*. 2019;89(1).
224. Alzheimer's Disease Research Models | ALZFORUM [Internet]. [pristupljeno 05.06.2020.]. Dostupno na: <https://www.alzforum.org/research-models/alzheimers-disease>
225. Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, i sur. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature*. 1995;373(6514):523–7.
226. Rockenstein EM, McConlogue L, Tan H, Power M, Masliah E, Mucke L. Levels and alternative splicing of amyloid beta protein precursor (APP) transcripts in brains of APP transgenic mice and humans with Alzheimer's disease. *J Biol Chem*. 1995;270(47):28257–67.
227. Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, i sur. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(24):13287–92.
228. Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, i sur. High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci*. 2000;20(11):4050–8.
229. Chishti MA, Yang DS, Janus C, Phinney AL, Horne P, Pearson J, i sur. Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695. *J Biol Chem*. 2001;276(24):21562–70.
230. Saito T, Matsuba Y, Mihira N, Takano J, Nilsson P, Itohara S, i sur. Single App knock-in mouse models of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci*. 2014;17(5):661–3.
231. Davis J, Xu F, Deane R, Romanov G, Previti M Lou, Zeigler K, i sur. Early-onset and robust cerebral microvascular accumulation of amyloid beta-protein in transgenic mice expressing low levels of a vasculotropic Dutch/Iowa mutant form of amyloid beta-protein precursor. *J Biol Chem*. 2004;279(19):20296–306.

232. Tomiyama T, Nagata T, Shimada H, Teraoka R, Fukushima A, Kanemitsu H, i sur. A new amyloid beta variant favoring oligomerization in Alzheimer's-type dementia. *Ann Neurol*. 2008;63(3):377–87.
233. Andorfer C, Kress Y, Espinoza M, de Silva R, Tucker KL, Barde Y-A, i sur. Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms. *J Neurochem*. 2003;86(3):582–90.
234. Ramsden M, Kotilinek L, Forster C, Paulson J, McGowan E, SantaCruz K, i sur. Age-dependent neurofibrillary tangle formation, neuron loss, and memory impairment in a mouse model of human tauopathy (P301L). *J Neurosci*. 2005;25(46):10637–47.
235. Yoshiyama Y, Higuchi M, Zhang B, Huang S-M, Iwata N, Saito TC, i sur. Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron*. 2007;53(3):337–51.
236. Radde R, Bolmont T, Kaeser SA, Coomaraswamy J, Lindau D, Stoltze L, i sur. Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Rep*. 2006;7(9):940–6.
237. Jankowsky JL, Fadale DJ, Anderson J, Xu GM, Gonzales V, Jenkins NA, i sur. Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. *Hum Mol Genet*. 2004;13(2):159–70.
238. Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, i sur. Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci*. 2006;26(40):10129–40.
239. Rosol TJ, DeLellis RA, Harvey PW, Sutcliffe C. Endocrine System. In: Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology. Elsevier Inc.; 2013. p. 2391–492.
240. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res*. 2001;50:537–46.
241. Blondel O, Portha B. Early appearance of in vivo insulin resistance in adult streptozotocin-injected rats. *Diabete Metab*. 1989;15:382–7.
242. Nitsch R, Hoyer S. Local action of the diabetogenic drug, streptozotocin, on glucose and

- energy metabolism in rat brain cortex. *Neurosci Lett.* 1991;128:199–202.
243. 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.
244. Arluison M, Quignon M, Nguyen P, Thorens B, Leloup C, Penicaud L. Distribution and anatomical localization of the glucose transporter 2 (GLUT2) in the adult rat brain--an immunohistochemical study. *J Chem Neuroanat.* 2004;28(3):117–36.
245. Homolak J, Perhoc AB, Knezovic A, Osmanovic Barilar J, Salkovic-Petrisic M. Additional methodological considerations regarding optimization of the dose of intracerebroventricular streptozotocin A response to: “Optimization of intracerebroventricular streptozotocin dose for the induction of neuroinflammation and memory impairments in rats” by Ghosh i sur., *Metab Brain Dis* 2020 July 21. *Metab Brain Dis.* 2021;36(1):97–102.
246. Mayer G, Nitsch R, Hoyer S. Effects of changes in peripheral and cerebral glucose metabolism on locomotor activity, learning and memory in adult male rats. *Brain Res.* 1990;532(1–2):95–100.
247. 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.
248. Sharma M, Gupta YK. Intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats produces both oxidative stress in the brain and cognitive impairment. *Life Sci.* 2001;68:1021–9.
249. 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.
250. 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;96:1005–15.
251. 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;118:765–72.
252. 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.
  253. Blokland A, Jolles J. Spatial-Learning Deficit and Reduced Hippocampal Chat Activity in Rats after an Icv Injection of Streptozotocin. *Pharmacol Biochem Behav.* 1993;44:491–4.
  254. Pinton S, da Rocha JT, Gai BM, Nogueira CW. Sporadic dementia of Alzheimer's type induced by streptozotocin promotes anxiogenic behavior in mice. *Behav Brain Res.* 2011;223(1):1–6.
  255. Qi CC, Chen XX, Gao XR, Xu JX, Liu S, Ge JF. Impaired Learning and Memory Ability Induced by a Bilaterally Hippocampal Injection of Streptozotocin in Mice: Involved With the Adaptive Changes of Synaptic Plasticity. *Front Aging Neurosci.* 2021;13:633495.
  256. Pathan AR, Viswanad B, Sonkusare SK, Ramarao P. Chronic administration of pioglitazone attenuates intracerebroventricular streptozotocin induced-memory impairment in rats. *Life Sci.* 2006;79:2209–16.
  257. 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;11:477–83.
  258. Chen Y, Guo Z, Mao YF, Zheng T, Zhang B. Intranasal Insulin Ameliorates Cerebral Hypometabolism, Neuronal Loss, and Astroglia in Streptozotocin-Induced Alzheimer's Rat Model. *Neurotox Res.* 2018;33(4):716–24.
  259. Babic Perhoc A, Osmanovic Barilar J, Knezovic A, Farkas V, Bagaric R, Svarc A, i sur. Cognitive, behavioral and metabolic effects of oral galactose treatment in the transgenic Tg2576 mice. *Neuropharmacology.* 2019;148:50–67.
  260. Knezovic A, Osmanovic Barilar J, Babic A, Bagaric R, Farkas V, Riederer P, i sur. Glucagon-like peptide-1 mediates effects of oral galactose in streptozotocin-induced rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Neuropharmacology.* 2018;135:48–62.
  261. Heo J-H, Lee S-R, Lee S-T, Lee K-M, Oh J-H, Jang D-P, i sur. Spatial Distribution of



- Glucose Hypometabolism Induced by Intracerebroventricular Streptozotocin in Monkeys. *J Alzheimer's Dis.* 2011;25:517–23.
262. Shingo AS, Kanabayashi T, Murase T, Kito S. Cognitive decline in STZ-3V rats is largely due to dysfunctional insulin signalling through the dentate gyrus. *Behav Brain Res.* 2012;229(2):378–83.
263. Salkovic-Petrisic M, Osmanovic-Barilar J, Knezovic A, Hoyer S, Mosetter K, Reutter W. Long-term oral galactose treatment prevents cognitive deficits in male Wistar rats treated intracerebroventricularly with streptozotocin. *Neuropharmacology.* 2014;77:68–80.
264. Hoyer S, Lannert H. Long-term abnormalities in brain glucose/energy metabolism after inhibition of the neuronal insulin receptor: implication of tau-protein. *J Neural Transm Suppl.* 2007;(72):195–202.
265. 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;21:261–73.
266. Grünblatt E, Salkovic-Petrisic M, Osmanovic J, Riederer P, Hoyer S. Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. *J Neurochem.* 2007;101:757–70.
267. 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.
268. 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.
269. 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;122:565–76.
270. 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;9:13–33.
271. Plum L, Schubert M, Brüning JC. The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends Endocrinol Metab.* 2005;16(2):59–65.
272. Knezovic A, Loncar A, Homolak J, Smailovic U, Osmanovic Barilar J, Ganoci L, i sur. Rat brain glucose transporter-2, insulin receptor and glial expression are acute targets of intracerebroventricular streptozotocin: risk factors for sporadic Alzheimer's disease? *J Neural Transm.* 2017;124:695–708.
273. Bolzán AD, Bianchi MS. Genotoxicity of Streptozotocin. *Mutat Res - Rev Mutat Res.* 2002;512(2–3):121–34.
274. Amiri S, Haj-Mirzaiaian A, Momeny M, Amini-Khoei H, Rahimi-Balaei M, Poursaman S, i sur. Streptozotocin induced oxidative stress, innate immune system responses and behavioral abnormalities in male mice. *Neuroscience.* 2017;340:373–83.
275. C. Correia S, X. Santos R, S. Santos M, Casadesus G, C. LaManna J, Perry G, i sur. Mitochondrial Abnormalities in a Streptozotocin-Induced Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res.* 2013;10(4):406–19.
276. Biswas J, Gupta S, Verma DK, Singh S. Streptozotocin alters glucose transport, connexin expression and endoplasmic reticulum functions in neurons and astrocytes. *Neuroscience.* 2017;356:151–66.
277. Lacković Z, Šalković M. Streptozotocin and alloxan produce alterations in rat brain monoamines independently of pancreatic beta cells destruction. *Life Sci.* 1990;46:49–54.
278. Salković-Petrisić M, Lacković Z. Intracerebroventricular administration of betacytotoxics alters expression of brain monoamine transporter genes. *J Neural Transm.* 2003;110(1):15–29.
279. Shonesy BC, Thiruchelvam K, Parameshwaran K, Rahman EA, Karuppagounder SS, Huggins KW, i sur. Central insulin resistance and synaptic dysfunction in intracerebroventricular-streptozotocin injected rodents. *Neurobiol Aging.* 2012;33(2):430.e5-18.
280. 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.
281. Frölich L, Blum-Degen D, Bernstein HG, Engelsberger S, Humrich J, Laufer S, i sur. Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *J Neural Transm.* 1998;105(4–5):423–38.
  282. Graham WV, Bonito-Oliva A, Sakmar TP. Update on Alzheimer's Disease Therapy and Prevention Strategies. *Annu Rev Med.* 2017;68:413–30.
  283. Hrvatski zavod za zdravstveno osiguranje » Tražilica za lijekove [Internet]. [pristupljeno 08.06.2020.]. Dostupno na: <https://www.hzzo.hr/trazilica-za-lijekove/>
  284. Tražilica .: HALMED [Internet]. [pristupljeno 08.06.2020.]. Dostupno na: <http://www.halmed.hr/Trazilica/>
  285. Lilienfeld S. Galantamine--a novel cholinergic drug with a unique dual mode of action for the treatment of patients with Alzheimer's disease. *CNS Drug Rev.* 2002;8(2):159–76.
  286. Parsons CG, Danysz W, Quack G. Memantine is a clinically well tolerated N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist--a review of preclinical data. *Neuropharmacology.* 1999;38(6):735–67.
  287. Devi L, Ohno M. A combination Alzheimer's therapy targeting BACE1 and neprilysin in 5XFAD transgenic mice. *Mol Brain.* 2015;8:19.
  288. Bullain S, Doody R. What works and what does not work in Alzheimer's disease? From interventions on risk factors to anti-amyloid trials. *J Neurochem.* 2020;jnc.15023.
  289. Huang LK, Chao SP, Hu CJ. Clinical trials of new drugs for Alzheimer disease. *J Biomed Sci.* 2020;27(1):18.
  290. Search of: Recruiting, Not yet recruiting, Active, not recruiting, Enrolling by invitation Studies | Interventional Studies | Alzheimer Disease | Phase 3 - List Results - ClinicalTrials.gov [Internet]. [pristupljeno 07.05.2021.]. Dostupno na: [https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Alzheimer+Disease&flds=aby&recrs=b&recrs=a&recrs=f&recrs=d&age\\_v=&gndr=&type=Intr&rslt=&phase=2&Search=Apply](https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Alzheimer+Disease&flds=aby&recrs=b&recrs=a&recrs=f&recrs=d&age_v=&gndr=&type=Intr&rslt=&phase=2&Search=Apply)
  291. Wium-Andersen IK, Osler M, Jørgensen MB, Rungby J, Wium-Andersen MK. Antidiabetic medication and risk of dementia in patients with type 2 diabetes: a nested

- case-control study. *Eur J Endocrinol*. 2019;181(5):499–507.
292. Wu JH, Haan MN, Liang J, Ghosh D, Gonzalez HM, Herman WH. Impact of antidiabetic medications on physical and cognitive functioning of older Mexican Americans with diabetes mellitus: a population-based cohort study. *Ann Epidemiol*. 2003;13(5):369–76.
293. Imfeld P, Bodmer M, Jick SS, Meier CR. Metformin, other antidiabetic drugs, and risk of Alzheimer’s disease: a population-based case-control study. *J Am Geriatr Soc*. 2012;60(5):916–21.
294. Ott A, Stolk RP, van Harskamp F, Pols HA, Hofman A, Breteler MM. Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. *Neurology*. 1999;53(9):1937–42.
295. Huang C-C, Chung C-M, Leu H-B, Lin L-Y, Chiu C-C, Hsu C-Y, i sur. Diabetes mellitus and the risk of Alzheimer’s disease: a nationwide population-based study. *PLoS One*. 2014;9(1):e87095.
296. Infante-Garcia C, Ramos-Rodriguez JJ, Hierro-Bujalance C, Ortegon E, Pickett E, Jackson R, i sur. Antidiabetic Polypill Improves Central Pathology and Cognitive Impairment in a Mixed Model of Alzheimer’s Disease and Type 2 Diabetes. *Mol Neurobiol*. 2018;55(7):6130–44.
297. Ou Z, Kong X, Sun X, He X, Zhang L, Gong Z, i sur. Metformin treatment prevents amyloid plaque deposition and memory impairment in APP/PS1 mice. *Brain Behav Immun*. 2018;69:351–63.
298. Ma D-L, Chen F-Q, Xu W-J, Yue W-Z, Yuan G, Yang Y. Early intervention with glucagon-like peptide 1 analog liraglutide prevents tau hyperphosphorylation in diabetic db/db mice. *J Neurochem*. 2015;135(2):301–8.
299. Kickstein E, Krauss S, Thornhill P, Rutschow D, Zeller R, Sharkey J, i sur. Biguanide metformin acts on tau phosphorylation via mTOR/protein phosphatase 2A (PP2A) signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(50):21830–5.
300. Pathak NM, Pathak V, Gault VA, McClean S, Irwin N, Flatt PR. Novel dual incretin agonist peptide with antidiabetic and neuroprotective potential. *Biochem Pharmacol*. 2018;155:264–74.
301. McClean PL, Hölscher C. Lixisenatide, a drug developed to treat type 2 diabetes, shows neuroprotective effects in a mouse model of Alzheimer’s disease. *Neuropharmacology*.

- 2014;86:241–58.
302. Hölscher C. The incretin hormones glucagonlike peptide 1 and glucose-dependent insulinotropic polypeptide are neuroprotective in mouse models of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement*. 2014;10(1):S47–54.
  303. Wang J, Gallagher D, DeVito LM, Cancino GI, Tsui D, He L, i sur. Metformin activates an atypical PKC-CBP pathway to promote neurogenesis and enhance spatial memory formation. *Cell Stem Cell*. 2012;11(1):23–35.
  304. Heneka MT, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, Hanke A, Dewachter I, Kuiperi C, i sur. Acute treatment with the PPAR $\gamma$  agonist pioglitazone and ibuprofen reduces glial inflammation and Abeta1-42 levels in APPV717I transgenic mice. *Brain*. 2005;128(Pt 6):1442–53.
  305. Bomfim TR, Forny-Germano L, Sathler LB, Brito-Moreira J, Houzel JC, Decker H, i sur. An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease-associated A $\beta$  oligomers. *J Clin Invest*. 2012;
  306. Batista AF, Forny-Germano L, Clarke JR, Lyra E Silva NM, Brito-Moreira J, Boehnke SE, i sur. The diabetes drug liraglutide reverses cognitive impairment in mice and attenuates insulin receptor and synaptic pathology in a non-human primate model of Alzheimer's disease. *J Pathol*. 2018;245(1):85–100.
  307. Fernandez-Martos CM, Atkinson RAK, Chuah MI, King AE, Vickers JC. Combination treatment with leptin and pioglitazone in a mouse model of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement (New York, N Y)*. 2017;3(1):92–106.
  308. Luchsinger JA, Perez T, Chang H, Mehta P, Steffener J, Pradabhan G, i sur. Metformin in Amnestic Mild Cognitive Impairment: Results of a Pilot Randomized Placebo Controlled Clinical Trial. *J Alzheimers Dis*. 2016;51(2):501–14.
  309. Koenig AM, Mechanic-Hamilton D, Xie SX, Combs MF, Cappola AR, Xie L, i sur. Effects of the Insulin Sensitizer Metformin in Alzheimer Disease: Pilot Data From a Randomized Placebo-controlled Crossover Study. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2017;31(2):107–13.
  310. Sato T, Hanyu H, Hirao K, Kanetaka H, Sakurai H, Iwamoto T. Efficacy of PPAR- $\gamma$  agonist pioglitazone in mild Alzheimer disease. *Neurobiol Aging*. 2011;32(9):1626–33.

311. Watson GS, Cholerton BA, Reger MA, Baker LD, Plymate SR, Asthana S, i sur. Preserved cognition in patients with early Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment during treatment with rosiglitazone: a preliminary study. *Am J Geriatr psychiatry Off J Am Assoc Geriatr Psychiatry*. 2005;13(11):950–8.
312. Cardoso S, Moreira PI. Antidiabetic drugs for Alzheimer’s and Parkinson’s diseases: Repurposing insulin, metformin, and thiazolidinediones. In: *International Review of Neurobiology*. Academic Press Inc.; 2020. p. 37–64.
313. Lv H, Tang L, Guo C, Jiang Y, Gao C, Wang Y, i sur. Intranasal insulin administration may be highly effective in improving cognitive function in mice with cognitive dysfunction by reversing brain insulin resistance. *Cogn Neurodyn*. 2020;14(3):323–38.
314. Kioussis B, Tuttle CSL, Heard DS, Kennedy BK, Lautenschlager NT, Maier AB. Targeting impaired nutrient sensing with repurposed therapeutics to prevent or treat age-related cognitive decline and dementia: A systematic review. *Ageing Res Rev*. 2021;67.
315. Wang YL, Zhao JH, Guo FL, Gao XH, Xie X, Liu SQ, i sur. Metformin Ameliorates Synaptic Defects in a Mouse Model of AD by Inhibiting Cdk5 Activity. *Front Cell Neurosci*. 2020;14.
316. Craig A, Parvez F, Issberner J. A systematic literature review of the effect of insulin sensitizers on the cognitive symptoms of Alzheimer’s Disease in transgenic mice. *Behav Brain Res*. 2019;372.
317. Pilipenko V, Narbutė K, Pupure J, Langrate IK, Muceniece R, Kluša V. Neuroprotective potential of antihyperglycemic drug metformin in streptozocin-induced rat model of sporadic Alzheimer’s disease. *Eur J Pharmacol*. 2020;881.
318. Nassar SZ, Badae NM, Issa YA. Effect of amylin on memory and central insulin resistance in a rat model of Alzheimer’s disease. *Arch Physiol Biochem*. 2020;126(4):326–34.
319. Markowicz-Piasecka M, Sikora J, Szydłowska A, Skupień A, Mikiciuk-Olasik E, Huttunen KM. Metformin – a Future Therapy for Neurodegenerative Diseases: Theme: Drug Discovery, Development and Delivery in Alzheimer’s Disease Guest Editor: Davide Brambilla. *Pharm Res*. 2017;34(12):2614–27.
320. Tzimopoulou S, Cunningham VJ, Nichols TE, Searle G, Bird NP, Mistry P, i sur. A

- multi-center randomized proof-of-concept clinical trial applying [ <sup>18</sup>F]FDG-PET for evaluation of metabolic therapy with rosiglitazone XR in mild to moderate Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis.* 2010;22(4):1241–56.
321. Rodriguez-Rivera J, Denner L, Dineley KT. Rosiglitazone reversal of Tg2576 cognitive deficits is independent of peripheral gluco-regulatory status. *Behav Brain Res.* 2011;216(1):255–61.
322. Pedersen WA, McMillan PJ, Kulstad JJ, Leverenz JB, Craft S, Haynatzki GR. Rosiglitazone attenuates learning and memory deficits in Tg2576 Alzheimer mice. *Exp Neurol.* 2006;199(2):265–73.
323. Nakaoku Y, Saito S, Yamamoto Y, Maki T, Takahashi R, Ihara M. The dipeptidyl peptidase-4 inhibitor linagliptin ameliorates high-fat induced cognitive decline in tauopathy model mice. *Int J Mol Sci.* 2019;20(10).
324. Khalaf SS, Hafez MM, Mehanna ET, Mesbah NM, Abo-Elmatty DM. Combined vildagliptin and memantine treatment downregulates expression of amyloid precursor protein, and total and phosphorylated tau in a rat model of combined Alzheimer's disease and type 2 diabetes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2019;392(6):685–95.
325. Kosaraju J, Holsinger RMD, Guo L, Tam KY. Linagliptin, a Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor, Mitigates Cognitive Deficits and Pathology in the 3xTg-AD Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol.* 2017;54(8):6074–84.
326. Sakr HF. Effect of sitagliptin on the working memory and reference memory in type 2 diabetic sprague-dawley rats: Possible role of adiponectin receptors 1. *J Physiol Pharmacol.* 2013;64(5):613–23.
327. Abd el-Rady NM, Ahmed A, Abdel-Rady MM, Ismail OI. Glucagon-like peptide-1 analog improves neuronal and behavioral impairment and promotes neuroprotection in a rat model of aluminum-induced dementia. *Physiol Rep.* 2021;8(24).
328. Chen S, Sun J, Zhao G, Guo A, Chen Y, Fu R, i sur. Liraglutide Improves Water Maze Learning and Memory Performance While Reduces Hyperphosphorylation of Tau and Neurofilaments in APP/PS1/Tau Triple Transgenic Mice. *Neurochem Res.* 2017;42(8):2326–35.
329. Kosaraju J, Gali CC, Khatwal RB, Dubala A, Chinni S, Holsinger RMD, i sur.

- Saxagliptin: A dipeptidyl peptidase-4 inhibitor ameliorates streptozotocin induced Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*. 2013;72:291–300.
330. Pintana H, Apaijai N, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. DPP-4 inhibitors improve cognition and brain mitochondrial function of insulin-resistant rats. *J Endocrinol*. 2013;218:1–11.
331. Chen S, Zhou M, Sun J, Guo A, Fernando RL, Chen Y, i sur. DPP-4 inhibitor improves learning and memory deficits and AD-like neurodegeneration by modulating the GLP-1 signaling. *Neuropharmacology*. 2019;157.
332. Angelopoulou E, Piperi C. DPP-4 inhibitors: a promising therapeutic approach against Alzheimer's disease. *Ann Transl Med*. 2018;6(12):255.
333. Heneka MT, Fink A, Doblhammer G. Effect of pioglitazone medication on the incidence of dementia. *Ann Neurol*. 2015;78(2):284–94.
334. Lin B, Koibuchi N, Hasegawa Y, Sueta D, Toyama K, Uekawa K, i sur. Glycemic control with empagliflozin, a novel selective SGLT2 inhibitor, ameliorates cardiovascular injury and cognitive dysfunction in obese and type 2 diabetic mice. *Cardiovasc Diabetol*. 2014;13(1).
335. Millar P, Pathak N, Parthasarathy V, Bjourson AJ, O'Kane M, Pathak V, i sur. Metabolic and neuroprotective effects of dapagliflozin and liraglutide in diabetic mice. *J Endocrinol*. 2017;234(3):255–67.
336. Sa-Nguanmoo P, Tanajak P, Kerdphoo S, Jaiwongkam T, Pratchayasakul W, Chattipakorn N, i sur. SGLT2-inhibitor and DPP-4 inhibitor improve brain function via attenuating mitochondrial dysfunction, insulin resistance, inflammation, and apoptosis in HFD-induced obese rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2017;333:43–50.
337. Esmaili MH, Enayati M, Khabbaz Abkenar F, Ebrahimian F, Salari AA. Glibenclamide mitigates cognitive impairment and hippocampal neuroinflammation in rats with type 2 diabetes and sporadic Alzheimer-like disease. *Behav Brain Res*. 2020;379.
338. Muñoz-Jiménez M, Zaarki A, García-Arnés JA, García-Casares N. Antidiabetic Drugs in Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment: A Systematic Review. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2021;49(5):423–34.
339. Stein MS, Scherer SC, Ladd KS, Harrison LC. A randomized controlled trial of high-



- dose vitamin D2 followed by intranasal insulin in Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis.* 2011;26(3):477–84.
340. Hildreth KL, Van Pelt RE, Moreau KL, Grigsby J, Hoth KF, Pelak V, et al. Effects of pioglitazone or exercise in older adults with mild cognitive impairment and insulin resistance: A pilot study. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra.* 2015;5(1):51–63.
341. Gold M, Alderton C, Zvartau-Hind M, Egginton S, Saunders AM, Irizarry M, et al. Rosiglitazone monotherapy in mild-to-moderate Alzheimer's disease: Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2010;30(2):131–46.
342. Craft S, Raman R, Chow TW, Rafii MS, Sun CK, Rissman RA, et al. Safety, Efficacy, and Feasibility of Intranasal Insulin for the Treatment of Mild Cognitive Impairment and Alzheimer Disease Dementia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol.* 2020;77(9):1099–109.
343. Rosenbloom M, Barclay TR, Kashyap B, Hage L, O'Keefe LR, Svitak A, et al. A Phase II, Single-Center, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of the Safety and Therapeutic Efficacy of Intranasal Glulisine in Amnesic Mild Cognitive Impairment and Probable Mild Alzheimer's Disease. *Drugs and Aging.* 2021;38(5).
344. Reger MA, Watson GS, Green PS, Baker LD, Cholerton B, Fishel MA, et al. Intranasal insulin administration dose-dependently modulates verbal memory and plasma amyloid- $\beta$  in memory-impaired older adults. *J Alzheimer's Dis.* 2008;13(3):323–31.
345. Morris MC. The role of nutrition in Alzheimer's disease: epidemiological evidence. *Eur J Neurol.* 2009;16 Suppl 1(Suppl 1):1–7.
346. Mitchell DC, Gawrisch K, Litman BJ, Salem NJ. Why is docosahexaenoic acid essential for nervous system function? *Biochem Soc Trans.* 1998;26(3):365–70.
347. Kalmijn S, Launer LJ, Ott A, Witteman JC, Hofman A, Breteler MM. Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study. *Ann Neurol.* 1997;42(5):776–82.
348. Schaefer EJ, Bongard V, Beiser AS, Lamon-Fava S, Robins SJ, Au R, et al. Plasma phosphatidylcholine docosahexaenoic acid content and risk of dementia and Alzheimer disease: the Framingham Heart Study. *Arch Neurol.* 2006;63(11):1545–50.

349. van Gelder BM, Tijhuis M, Kalmijn S, Kromhout D. Fish consumption, n-3 fatty acids, and subsequent 5-y cognitive decline in elderly men: the Zutphen Elderly Study. *Am J Clin Nutr.* 2007;85(4):1142–7.
350. Heude B, Ducimetière P, Berr C. Cognitive decline and fatty acid composition of erythrocyte membranes--The EVA Study. *Am J Clin Nutr.* 2003;77(4):803–8.
351. van de Rest O, Geleijnse JM, Kok FJ, van Staveren WA, Dullemeijer C, Oudekerk MGM, i sur. Effect of fish oil on cognitive performance in older subjects: a randomized, controlled trial. *Neurology.* 2008;71(6):430–8.
352. Morris MC, Evans DA, Bienias JL, Tangney CC, Bennett DA, Aggarwal N, i sur. Dietary intake of antioxidant nutrients and the risk of incident Alzheimer disease in a biracial community study. *JAMA.* 2002;287(24):3230–7.
353. Engelhart MJ, Geerlings MI, Ruitenberg A, van Swieten JC, Hofman A, Witteman JCM, i sur. Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease. *JAMA.* 2002;287(24):3223–9.
354. Zandi PP, Anthony JC, Khachaturian AS, Stone S V, Gustafson D, Tschanz JT, i sur. Reduced risk of Alzheimer disease in users of antioxidant vitamin supplements: the Cache County Study. *Arch Neurol.* 2004;61(1):82–8.
355. Galasko DR, Peskind E, Clark CM, Quinn JF, Ringman JM, Jicha GA, i sur. Antioxidants for Alzheimer disease: a randomized clinical trial with cerebrospinal fluid biomarker measures. *Arch Neurol.* 2012;69(7):836–41.
356. Pasinetti GM, Wang J, Ho L, Zhao W, Dubner L. Roles of resveratrol and other grape-derived polyphenols in Alzheimer's disease prevention and treatment. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1852(6):1202–8.
357. Sawda C, Moussa C, Turner RS. Resveratrol for alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2017;1403(1):142–9.
358. Bastianetto S, Ménard C, Quirion R. Neuroprotective action of resveratrol. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1852(6):1195–201.
359. Botchway BOA, Moore MK, Akinleye FO, Iyer IC, Fang M. Nutrition: Review on the Possible Treatment for Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2018;61(3):867–83.

360. Ano Y, Nakayama H. Preventive effects of dairy products on dementia and the underlying mechanisms. *Int J Mol Sci.* 2018;19(7).
361. Coelho AI, Berry GT, Rubio-Gozalbo ME. Galactose metabolism and health. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2015;18(4):422–7.
362. Yu RK, Itokazu Y. *Glycobiology of the Nervous System* | SpringerLink. Yu RK, Schengrund C-L, editors. Vol. 9. New York: Springer, New York, NY; 2014. 185–190 p.
363. Schwartz NB, Domowicz MS. Proteoglycans in brain development and pathogenesis. *FEBS Lett.* 2018;592(23):3791–805.
364. Sasaoka N, Imamura H, Kakizuka A. A Trace Amount of Galactose, a Major Component of Milk Sugar, Allows Maturation of Glycoproteins during Sugar Starvation. *iScience.* 2018;10:211–21.
365. Lai K, Elsas LJ, Wierenga KJ. Galactose toxicity in animals. *IUBMB Life.* 2009;61(11):1063–74.
366. Williams C. GALACTOSE. In: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*. Academic Press; 2003. p. 2843–6.
367. Koren D, Palladino A. Chapter 3 – Hypoglycemia. In: *Genetic Diagnosis of Endocrine Disorders*. Academic Press; 2016. p. 31–75.
368. Pelley JW. Gluconeogenesis and Glycogen Metabolism. In: *Elsevier’s Integrated Review Biochemistry*. Elsevier; 2012. p. 67–73.
369. Galactosemia - Genetics Home Reference - NIH [Internet]. [pristupljeno 19.06.2020.]. Dostupno na: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/galactosemia>
370. Lai K, Langlely SD, Khwaja FW, Schmitt EW, Elsas LJ. GALT deficiency causes UDP-hexose deficit in human galactosemic cells. *Glycobiology.* 2003;13(4):285–94.
371. Knerr I, Coss KP, Kratzsch J, Crushell E, Clark A, Doran P, i sur. Effects of temporary low-dose galactose supplements in children aged 5-12 y with classical galactosemia: a pilot study. *Pediatr Res.* 2015;78(3):272–9.
372. *Diabetes Nutrition Algorithms - Sugars: Galactose- and Fiber-induced Metabolic Improvement in the Dietetic Treatment of Type 2 Diabetes - Full Text View -*

- ClinicalTrials.gov [Internet]. [pristupljeno 15.03.2019.]. Dostupno na: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01776099?term=galactose>
373. Using D-Galactose as a Food Supplement in Congenital Disorders of Glycosylation - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [pristupljeno 19.06.2020.]. Dostupno na: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02955264>
374. Study of ORL-1G (D-galactose) in Patients With Glycogen Storage Disease Type 14 - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [pristupljeno 19.06.2020.]. Dostupno na: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03404856?cond=galactose&draw=2&rank=9>
375. Esins J, Schultz J, Bühlhoff I, Kennerknecht I. Galactose uncovers face recognition and mental images in congenital prosopagnosia: the first case report. *Nutr Neurosci.* 2014;17:239–40.
376. Panfoli I, Ravera S, Calzia D, Santi C. Missed evolution of demyelinating brain lesions during supplementation with natural compounds: A Case Report. *Med Res Arch.* 2016;4:1–12.
377. Xu F. Sub-acute toxicity of D-galactose. In: *Proceedings of the Second National Conference on Aging Research*, Herbin, China. 1985.
378. Zhang X, Li W, Zhang B. Biochemical changes in D-galactose induced subacute toxicity and mimetic aging in mice. *Chin J Pharmacol Toxicol.* 1990;4:309–10.
379. Cui X, Wang L, Zuo P, Han Z, Fang Z, Li W, i sur. D-galactose-caused life shortening in *Drosophila melanogaster* and *Musca domestica* is associated with oxidative stress. *Biogerontology.* 2004;5(5):317–25.
380. Cui X, Li W, Zhang B. Studies on cell senescence induced by D-galactose in cultured neurons and fibroblasts. *Chinese J Appl Physiol.* 1997;13(2):131–3.
381. Shen Y-X, Xu S-Y, Wei W, Sun X-X, Yang J, Liu L-H, i sur. Melatonin reduces memory changes and neural oxidative damage in mice treated with D-galactose. *J Pineal Res.* 2002;32(3):173–8.
382. Sun Y, Wang D, Zhu J, Zhang H. Effects of *cistanche desertica* polysaccharides on the constitution of protein and anti-oxidative capacity of liver in aging mice. *Chinese Pharmacol Bull.* 2001;17(1):101–3.

383. Xu X-H, Zhao T-Q. Effects of puerarin on D-galactose-induced memory deficits in mice. *Acta Pharmacol Sin.* 2002;23(7):587–90.
384. Zhang X, Zhang B, Yang X, Zhang W, Li L. Behavior and memory changes in D-galactose-induced aging rat model. *Chin J Gerontol.* 1996;
385. Song X, Bao M, Li D, Li YM. Advanced glycation in D-galactose induced mouse aging model. *Mech Ageing Dev.* 1999;108(3):239–51.
386. Shang YZ, Gong MY, Zhou XX, Li ST, Wang BY. Improving effects of SSF on memory deficits and pathological changes of neural and immunological systems in senescent mice. *Acta Pharmacol Sin.* 2001;22(12):1078–83.
387. Gong G, Xu F. Study of aging model in mice. *J China Pharm Univ.* 1991;
388. Wei H, Li L, Song Q, Ai H, Chu J, Li W. Behavioural study of the D-galactose induced aging model in C57BL/6J mice. *Behav Brain Res.* 2005;157(2):245–51.
389. Ho SC, Liu JH, Wu RY. Establishment of the mimetic aging effect in mice caused by D-galactose. *Biogerontology.* 2003;4:15–8.
390. Azman KF, Zakaria R. d-Galactose-induced accelerated aging model: an overview. *Biogerontology.* 2019;20(6):763–82.
391. Shwe T, Pratchayasakul W, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. Role of D-galactose-induced brain aging and its potential used for therapeutic interventions. *Exp Gerontol.* 2018;101:13–36.
392. Cardoso A, Magano S, Marrana F, Andrade JP. D-Galactose High-Dose Administration Failed to Induce Accelerated Aging Changes in Neurogenesis, Anxiety, and Spatial Memory on Young Male Wistar Rats. *Rejuvenation Res.* 2015;18:497–507.
393. Budni J, Pacheco R, da Silva S, Garcez ML, Mina F, Bellettini-Santos T, i sur. Oral administration of D-galactose induces cognitive impairments and oxidative damage in rats. *Behav Brain Res.* 2016;302:35–43.
394. Budni J, Garcez ML, Mina F, Bellettini-Santos T, da Silva S, Luz AP da, i sur. The oral administration of D-galactose induces abnormalities within the mitochondrial respiratory chain in the brain of rats. *Metab Brain Dis.* 2017;32(3):811–7.
395. Kumar A, Dogra S, Prakash A. Effect of carvedilol on behavioral, mitochondrial

- dysfunction, and oxidative damage against D-galactose induced senescence in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2009;380(5):431–41.
396. Kumar A, Prakash A, Dogra S. Naringin alleviates cognitive impairment, mitochondrial dysfunction and oxidative stress induced by D-galactose in mice. *Food Chem Toxicol an Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc*. 2010;48(2):626–32.
397. Krzysztoforska K, Piechal A, Blecharz-Klin K, Pyrzanowska J, Joniec-Maciejak I, Mirowska-Guzel D, i sur. Administration of protocatechuic acid affects memory and restores hippocampal and cortical serotonin turnover in rat model of oral D-galactose-induced memory impairment. *Behav Brain Res*. 2019;368:111896.
398. Chogtu B, Avinash A, Kunder SK, Tilak A, Sori R, Tripathy A. Evaluation of acute and chronic effects of D-galactose on memory and learning in Wistar rats. *Clin Psychopharmacol Neurosci*. 2017;March 2017.
399. Salkovic-Petrisic M. Oral Galactose Provides a Different Approach to Incretin-Based Therapy of Alzheimer's Disease. *J Neurol Neuromedicine*. 2018;3(4):101–7.
400. Roser M, Josic D, Kontou M, Mosetter K, Maurer P, Reutter W. Metabolism of galactose in the brain and liver of rats and its conversion into glutamate and other amino acids. *J Neural Transm*. 2009;116:131–9.
401. Gould GW, Thomas HM, Jess TJ, Bell GI. Expression of human glucose transporters in *Xenopus* oocytes: kinetic characterization and substrate specificities of the erythrocyte, liver, and brain isoforms. *Biochemistry*. 1991;30:5139–45.
402. Seatter MJ, Kane S, Porter LM, Arbuckle MI, Melvin DR, Gould GW. Structure-function studies of the brain-type glucose transporter, GLUT3: Alanine-scanning mutagenesis of putative transmembrane helix VIII and an investigation of the role of proline residues in transport catalysis. *Biochemistry*. 1997;36:6401–7.
403. Li L, Zhang Z-F, Holscher C, Gao C, Jiang Y-H, Liu Y-Z. (Val8) glucagon-like peptide-1 prevents tau hyperphosphorylation, impairment of spatial learning and ultra-structural cellular damage induced by streptozotocin in rat brains. *Eur J Pharmacol*. 2012;674(2–3):280–6.
404. McClean PL, Parthasarathy V, Faivre E, Holscher C. The Diabetes Drug Liraglutide Prevents Degenerative Processes in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Neurosci*.

- 2011;31(17):6587–94.
405. Noble EP, Wurtman RJ, Axelrod J. A simple and rapid method for injecting H<sup>3</sup>-norepinephrine into the lateral ventricle of the rat brain. *Life Sci.* 1967;6:281–91.
  406. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods.* 1984;11(1):47–60.
  407. Vorhees C V, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc.* 2006;1:848–58.
  408. Ögren SO, Stiedl O. Passive Avoidance. In: *Encyclopedia of Psychopharmacology.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013. p. 1–10.
  409. Walters GC, Abel EL. Passive avoidance learning in rats, mice, gerbils, and hamsters. *Psychon Sci.* 1971;22(5):269–70.
  410. Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp.* 2015;(96):e52434.
  411. Daniels WMU, Uys J de K, van Vuuren P, Stein DJ. The development of behavioral and endocrine abnormalities in rats after repeated exposure to direct and indirect stress. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2008;4(2):451–64.
  412. Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc.* 2007;2(2):322–8.
  413. Carobrez AP, Bertoglio LJ. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. In: *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* 2005. p. 1193–205.
  414. Deacon RM. Assessing nest building in mice. *Nat Protoc.* 2006;1(3):1117–9.
  415. Samaey C, Schreurs A, Stroobants S, Balschun D. Early Cognitive and Behavioral Deficits in Mouse Models for Tauopathy and Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci.* 2019;11.
  416. Sempere Roldan P, Chereul E, Dietzel O, Magnier L, Pautrot C, Rbah L, i sur. Raytest ClearPET<sup>TM</sup>, a new generation small animal PET scanner. *Nucl Instruments Methods Phys Res Sect A Accel Spectrometers, Detect Assoc Equip.* 2007;571:498–501.
  417. Ayala JE, Samuel VT, Morton GJ, Obici S, Croniger CM, Shulman GI, i sur. Standard

- operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. *Dis Model Mech.* 2010;3(9–10):525–34.
418. Dinger K, Mohr J, Vohlen C, Hirani D, Hucklenbruch-Rother E, Ensenaer R, i sur. Intraperitoneal Glucose Tolerance Test, Measurement of Lung Function, and Fixation of the Lung to Study the Impact of Obesity and Impaired Metabolism on Pulmonary Outcomes. *J Vis Exp.* 2018;(133).
  419. Lowry O, Rosenbrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265–75.
  420. Trinder P. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J Clin Pathol.* 1969;22:158–61.
  421. Amplex<sup>TM</sup> Red Galactose/Galactose Oxidase Assay Kit [Internet]. [pristupljeno 24.02.2020.]. Dostupno na: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A22179#/A22179>
  422. Rat/Mouse Insulin ELISA | EZRMI-13K [Internet]. [pristupljeno 25.02.2020.]. Dostupno na: [https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Rat-Mouse-Insulin-ELISA,MM\\_NF-EZRMI-13K#anchor\\_PR](https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Rat-Mouse-Insulin-ELISA,MM_NF-EZRMI-13K#anchor_PR)
  423. Multi Species GLP-1 Total ELISA, EZGLP1T-36K | EZGLP1T-36K [Internet]. [25.02.2020.]. Dostupno na: [https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Multi-Species-GLP-1-Total-ELISA-EZGLP1T-36K,MM\\_NF-EZGLP1T-36K#documentation](https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Multi-Species-GLP-1-Total-ELISA-EZGLP1T-36K,MM_NF-EZGLP1T-36K#documentation)
  424. Glucagon Like Peptide-1 (Active) ELISA | EGLP-35K [Internet]. [pristupljeno 25.02.2020.]. Dostupno na: [https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Glucagon-Like-Peptide-1-Active-ELISA,MM\\_NF-EGLP-35K](https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Glucagon-Like-Peptide-1-Active-ELISA,MM_NF-EGLP-35K)
  425. Amyloid beta 42 (Abeta42) ELISA Kit | Abbexa Ltd [Internet]. [pristupljeno 25.02.2020.]. Dostupno na: <https://www.abbexa.com/amyloid-beta-peptide-1-42-ab1-42-elisa-kit>
  426. Zhang XL, Jiang B, Li ZB, Hao S, An LJ. Catalpol ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative damage in the brain of senescent mice induced by d-galactose. *Pharmacol Biochem Behav.* 2007;88:64–72.



427. Koepsell H. Glucose transporters in brain in health and disease. *Pflugers Arch Eur J Physiol.* 2020;472(9):1299–343.
428. Kellett GL, Brot-Laroche E, Mace OJ, Leturque A. Sugar absorption in the intestine: the role of GLUT2. *Annu Rev Nutr.* 2008;28:35–54.
429. Sharpe MA, Ijare OB, Baskin DS, Baskin AM, Baskin BN, Pichumani K. The leloir cycle in glioblastoma: Galactose scavenging and metabolic remodeling. *Cancers (Basel).* 2021;13(8).
430. Głuchowska K, Pliszka M, Szablewski L. Expression of glucose transporters in human neurodegenerative diseases. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021;540:8–15.
431. Cohn RM, Segal S. Galactose metabolism and its regulation. *Metabolism.* 1973;22:627–42.
432. Apelt J, Mehlhorn G, Schliebs R. Insulin-sensitive GLUT4 glucose transporters are colocalized with GLUT3- expressing cells and demonstrate a chemically distinct neuron-specific localization in rat brain. *J Neurosci Res.* 1999;57:693–705.
433. Pearson-Leary J ME. Intrahippocampal administration of amyloid- $\beta$ (1-42) oligomers acutely impairs spatial working memory, insulin signaling, and hippocampal metabolism. *J Alzheimer's Dis.* 2012;30:413–22.
434. Chiu C-S, Chiu Y-J, Wu L-Y, Lu T-C, Huang T-H, Hsieh M-T, i sur. Diosgenin ameliorates cognition deficit and attenuates oxidative damage in senescent mice induced by D-galactose. *Am J Chin Med.* 2011;39:551–63.
435. Knezovic A, Osmanovic Barilar J, Babic A, Bagaric R, Farkas V, Riederer P, i sur. Glucagon-like peptide-1 mediates effects of oral galactose in streptozotocin-induced rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Neuropharmacology.* 2018;135:48–62.
436. Ritzel U, Fromme A, Oettleben M, Leonhardt U, Ramadori G. Release of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) by carbohydrates in the perfused rat ileum. *Acta Diabetol.* 1997;34:18–21.
437. Figueiredo CP, Pamplona FA, Mazzuco TL, Aguiar AS, Walz R, Prediger RDS. Role of the glucose-dependent insulinotropic polypeptide and its receptor in the central nervous system: therapeutic potential in neurological diseases. *Behav Pharmacol.* 2010;21(5–6):394–408.

438. Hölscher C. Central effects of GLP-1: new opportunities for treatments of neurodegenerative diseases. *J Endocrinol.* 2014;221(1):T31-41.
439. Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev.* 2007;87:1409–39.
440. Candeias EM, Sebastião IC, Cardoso SM, Correia SC, Carvalho CI, Plácido AI, i sur. Gut-brain connection: The neuroprotective effects of the anti-diabetic drug liraglutide. *World J Diabetes.* 2015;6:807–27.
441. Mortensen K, Christensen LL, Holst JJ, Orskov C. GLP-1 and GIP are colocalized in a subset of endocrine cells in the small intestine. *Regul Pept.* 2003;114:189–96.
442. Cho YM, Kieffer TJ. K-cells and Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide in Health and Disease. *Vitam Horm.* 2010;84:111–50.
443. Laffitte A, Neiers F, Briand L. Functional roles of the sweet taste receptor in oral and extraoral tissues. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2014;17:379–85.
444. Lee A, Owyang C. Sugars, Sweet Taste Receptors, and Brain Responses. *Nutrients.* 2017;9:653.
445. Kojima I, Nakagawa Y. The Role of the Sweet Taste Receptor in Enteroendocrine Cells and Pancreatic  $\beta$ -Cells. *Diabetes Metab J.* 2011;35:451–7.
446. Feng XH, Liu XM, Zhou LH, Wang J, Liu GD. Expression of glucagon-like peptide-1 in the taste buds of rat circumvallate papillae. *Acta Histochem.* 2008;110:151–4.
447. Hansen L, Deacon C, Ørskov C, Holst J. Glucagon-like peptide-1-(7–36) amide is transformed to glucagon-like peptide-1-(9–36) amide by dipeptidyl peptidase IV in the capillaries supplying the L cells of the. *Endocrinology.* 1999;140:5356–63.
448. D’Amico M, Di Filippo C, Marfella R, Abbatecola AM, Ferraraccio F, Rossi F, i sur. Long-term inhibition of dipeptidyl peptidase-4 in Alzheimer’s prone mice. *Exp Gerontol.* 2010;45:202–7.
449. Isik AT, Soysal P, Yay A, Usarel C. The effects of sitagliptin, a DPP-4 inhibitor, on cognitive functions in elderly diabetic patients with or without Alzheimer’s disease. *Diabetes Res Clin Pract.* 2017;123:192–8.
450. Kastin AJ, Akerstrom V, Pan W. Interactions of Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) with the Blood-Brain Barrier. *J Mol Neurosci.* 2002;18:7–14.

451. Alvarez E, Martínez MD, Roncero I, Chowen JA, García-Cuartero B, Gispert JD, i sur. The expression of GLP-1 receptor mRNA and protein allows the effect of GLP-1 on glucose metabolism in the human hypothalamus and brainstem. *J Neurochem.* 2005;92:798–806.
452. Renner E, Puskás N, Dobolyi A, Palkovits M. Glucagon-like peptide-1 of brainstem origin activates dorsomedial hypothalamic neurons in satiated rats. *Peptides.* 2012;35:14–22.
453. Merchenthaler I, Lane M, Shughrue P. Distribution of pre-pro-glucagon and glucagon-like peptide-1 receptor messenger RNAs in the rat central nervous system. *J Comp Neurol.* 1999;403(2):261–80.
454. Montrose-Rafizadeh C, Avdonin P, Garant MJ, Rodgers BD, Kole S, Yang H, i sur. Pancreatic glucagon-like peptide-1 receptor couples to multiple G proteins and activates mitogen-activated protein kinase pathways in Chinese hamster ovary cells. *Endocrinology.* 1999;140(3):1132–40.
455. Wheeler MB, Lu M, Dillon JS, Leng XH, Chen C, Boyd AE 3rd. Functional expression of the rat glucagon-like peptide-I receptor, evidence for coupling to both adenylyl cyclase and phospholipase-C. *Endocrinology.* 1993;133(1):57–62.
456. During MJ, Cao L, Zuzga DS, Francis JS, Fitzsimons HL, Jiao X, i sur. Glucagon-like peptide-1 receptor is involved in learning and neuroprotection. *Nat Med.* 2003;9:1173–9.
457. Hsu TM, Hahn JD, Konanur VR, Lam A, Kanoski SE. Hippocampal GLP-1 Receptors Influence Food Intake, Meal Size, and Effort-Based Responding for Food through Volume Transmission. *Neuropsychopharmacology.* 2014;40:327–37.
458. Alhadeff AL, Rupprecht LE, Hayes MR. GLP-1 neurons in the nucleus of the solitary tract project directly to the ventral tegmental area and nucleus accumbens to control for food intake. *Endocrinology.* 2012;153:647–58.
459. Gu G, Roland B, Tomaselli K, Dolman CS, Lowe C, Heilig JS. Glucagon-like peptide-1 in the rat brain: distribution of expression and functional implication. *J Comp Neurol.* 2013;521:2235–61.
460. Harkavyi A, Whitton PS. Glucagon-like peptide 1 receptor stimulation as a means of

- neuroprotection. *Br J Pharmacol.* 2010;159(3):495–501.
461. Salcedo I, Tweedie D, Li Y, Greig NH. Neuroprotective and neurotrophic actions of glucagon-like peptide-1: An emerging opportunity to treat neurodegenerative and cerebrovascular disorders. *Br J Pharmacol.* 2012;166:1586–99.
  462. Perry TA, Greig NH. The glucagon-like peptides: A new genre in therapeutic targets for intervention in Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis.* 2002;4(6):487–96.
  463. Schick RR, Zimmermann JP, vom Walde T, Schusdziarra V. Peptides that regulate food intake: glucagon-like peptide 1-(7-36) amide acts at lateral and medial hypothalamic sites to suppress feeding in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003;284:R1427–35.
  464. Davidson TL, Kanoski SE, Schier LA, Clegg DJ, Benoit SC. A potential role for the hippocampus in energy intake and body weight regulation. *Curr Opin Pharmacol.* 2007;7:613–6.
  465. Baker LD, Cross DJ, Minoshima S, Belongia D, Watson GS, Craft S. Insulin resistance and Alzheimer-like reductions in regional cerebral glucose metabolism for cognitively normal adults with prediabetes or early type 2 diabetes. *Arch Neurol.* 2011;68:51–7.
  466. Roser M, Josic D, Kontou M, Mosetter K, Maurer P, Reutter W. Metabolism of galactose in the brain and liver of rats and its conversion into glutamate and other amino acids. *J Neural Transm.* 2009;116(2):131–9.
  467. Seiler N. Ammonia and Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* 2002;41(2–3):189–207.
  468. Fayed N, Modrego PJ, Rojas-Salinas G, Aguilar K. Brain glutamate levels are decreased in alzheimer's disease: A magnetic resonance spectroscopy study. *Am J Alzheimers Dis Other Demen.* 2011;26(6):450–6.
  469. Homolak J, Babic Perhoc A, Knezovic A, Kodvanj I, Virag D, Osmanovic BJ, i sur. Is galactose a hormetic sugar? Evidence from rat hippocampal redox regulatory network. *bioRxiv.* 2021;2021.03.08.434370.
  470. Jiang C, Li G, Huang P, Liu Z, Zhao B. The Gut Microbiota and Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis.* 2017;58:1–15.
  471. Köhler CA, Maes M, Slyepchenko A, Berk M, Solmi M, Lanctôt KL, i sur. The gut-

- brain axis, including the microbiome, leaky gut and bacterial translocation: mechanisms and pathophysiological role in Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des.* 2016;22:6152–66.
472. Zhang Y-J, Li S, Gan R-Y, Zhou T, Xu D-P, Li H-B. Impacts of Gut Bacteria on Human Health and Diseases. *Int J Mol Sci.* 2015;16:7493–519.
473. Shen L, Liu L, Ji H-F. Alzheimer's Disease Histological and Behavioral Manifestations in Transgenic Mice Correlate with Specific Gut Microbiome State. *J Alzheimer's Dis.* 2017;56:385–90.
474. Akbari E, Asemi Z, Kakhaki RD, Bahmani F, Kouchaki E, Tamtaji OR, i sur. Effect of probiotic supplementation on cognitive function and metabolic status in Alzheimer's disease: A randomized, double-blind and controlled trial. *Front Aging Neurosci.* 2016;8(NOV).
475. Distrutti E, O'Reilly JA, McDonald C, Cipriani S, Renga B, Lynch MA, i sur. Modulation of intestinal microbiota by the probiotic VSL#3 resets brain gene expression and ameliorates the age-related deficit in LTP. *PLoS One.* 2014;9.
476. Blood Microbiota Signature of Alzheimer's Disease - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [pristupljeno 24.05.2021.]. Dostupno na: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04841135?term=microbiota&cond=Alzheimer+Disease&draw=2&rank=3>
477. Bonfili L, Cecarini V, Gogoi O, Gong C, Cuccioloni M, Angeletti M, i sur. Microbiota modulation as preventative and therapeutic approach in Alzheimer's disease. *FEBS J.* 2020;288(9):2836–55.
478. Forsythe P, Bienenstock J, Kunze WA. Vagal pathways for microbiome-brain-gut axis communication. *Adv Exp Med Biol.* 2014;817:115–33.
479. Stahel P, Kim JJ, Xiao C, Cant JP. Of the milk sugars, galactose, but not prebiotic galacto-oligosaccharide, improves insulin sensitivity in male Sprague-Dawley rats. *PLoS One.* 2017;12:e0172260.
480. Moreno CL, Guardia L Della, Shnyder V, Ortiz-Virumbrales M, Kruglikov I, Zhang B, i sur. iPSC-derived familial Alzheimer's PSEN2N141I cholinergic neurons exhibit mutation-dependent molecular pathology corrected by insulin signaling. *Mol Neurodegener.* 2018;13(1):1–10.

481. Chen Y, Tian Z, Liang Z, Sun S, Dai C, Lee MH, i sur. Brain Gene Expression of a Sporadic (icv-STZ Mouse) and a Familial Mouse Model (3xTg-AD Mouse) of Alzheimer's Disease. Planel E, editor. PLoS One. 2012;7(12):e51432.
482. Park JS, Kam TI, Lee S, Park H, Oh Y, Kwon SH, i sur. Blocking microglial activation of reactive astrocytes is neuroprotective in models of Alzheimer's disease. Acta Neuropathol Commun. 2021;9(1).
483. Liu Y, Xu Y, Li M, Pan D, Li Y, Wang Y, i sur. Multi-target PET evaluation in APP/PS1/tau mouse model of Alzheimer's disease. Neurosci Lett. 2020;728.
484. Sun J, Liu S, Ling Z, Wang F, Ling Y, Gong T, i sur. Fructooligosaccharides Ameliorating Cognitive Deficits and Neurodegeneration in APP/PS1 Transgenic Mice through Modulating Gut Microbiota. J Agric Food Chem. 2019;67(10):3006–17.
485. Denver P, English A, McClean PL. Inflammation, insulin signaling and cognitive function in aged APP/PS1 mice. Brain Behav Immun. 2018;70:423–34.
486. Cai H-Y, Yang J-T, Wang Z-J, Zhang J, Yang W, Wu M-N, i sur. Lixisenatide reduces amyloid plaques, neurofibrillary tangles and neuroinflammation in an APP/PS1/tau mouse model of Alzheimer's disease. Biochem Biophys Res Commun. 2018;495(1):1034–40.
487. Cao Y, Hölscher C, Hu M-M, Wang T, Zhao F, Bai Y, i sur. DA5-CH, a novel GLP-1/GIP dual agonist, effectively ameliorates the cognitive impairments and pathology in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. Eur J Pharmacol. 2018;827:215–26.
488. Chen S, Sun J, Zhao G, Guo A, Chen Y, Fu R, i sur. Liraglutide Improves Water Maze Learning and Memory Performance While Reduces Hyperphosphorylation of Tau and Neurofilaments in APP/PS1/Tau Triple Transgenic Mice. Neurochem Res. 2017;42(8):2326–35.
489. Long-Smith CM, Manning S, McClean PL, Coakley MF, O'Halloran DJ, Holscher C, i sur. The Diabetes Drug Liraglutide Ameliorates Aberrant Insulin Receptor Localisation and Signalling in Parallel with Decreasing Both Amyloid- $\beta$  Plaque and Glial Pathology in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. NeuroMolecular Med. 2013;15(1):102–14.
490. McClean PL, Jalewa J, Hölscher C. Prophylactic liraglutide treatment prevents amyloid plaque deposition, chronic inflammation and memory impairment in APP/PS1 mice.

- Behav Brain Res. 2015;293:96–106.
491. McClean PL, Holscher C. Liraglutide can reverse memory impairment, synaptic loss and reduce plaque load in aged APP/PS1 mice, a model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*. 2014;76:57–67.
  492. Tai J, Liu W, Li Y, Li L, Hölscher C. Neuroprotective effects of a triple GLP-1/GIP/glucagon receptor agonist in the APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Res*. 2018;1678:64–74.
  493. Hansen HH, Fabricius K, Barkholt P, Kongsbak-Wismann P, Schlumberger C, Jelsing J, i sur. Long-Term Treatment with Liraglutide, a Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) Receptor Agonist, Has No Effect on  $\beta$ -Amyloid Plaque Load in Two Transgenic APP/PS1 Mouse Models of Alzheimer's Disease. Padmanabhan J, editor. *PLoS One*. 2016;11(7):e0158205.
  494. Bomba M, Ciavardelli D, Silvestri E, Canzoniero LM, Lattanzio R, Chiappini P, i sur. Exenatide promotes cognitive enhancement and positive brain metabolic changes in PS1-KI mice but has no effects in 3xTg-AD animals. *Cell Death Dis*. 2013;4(5):e612–e612.
  495. Gao C, Liu Y, Li L, Hölscher C. New animal models of Alzheimer's disease that display insulin desensitization in the brain. *Rev Neurosci*. 2013;24(6):607–15.
  496. Luo F, Rustay NR, Ebert U, Hradil VP, Cole TB, Llano DA, i sur. Characterization of 7- and 19-month-old Tg2576 mice using multimodal in vivo imaging: limitations as a translatable model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2012;33(5):933–44.
  497. Apostolova I, Lange C, Mäurer A, Suppa P, Spies L, Grothe MJ, i sur. Hypermetabolism in the hippocampal formation of cognitively impaired patients indicates detrimental maladaptation. *Neurobiol Aging*. 2018;65:41–50.
  498. Coleman RA, Liang C, Patel R, Ali S, Mukherjee J. Brain and Brown Adipose Tissue Metabolism in Transgenic Tg2576 Mice Models of Alzheimer Disease Assessed Using  $^{18}$ F-FDG PET Imaging. *Mol Imaging*. 2017;16:153601211770455.
  499. Lee Y-H, Tharp WG, Maple RL, Nair S, Permana PA, Pratley RE. Amyloid Precursor Protein Expression Is Upregulated in Adipocytes in Obesity. *Obesity*. 2008;16(7):1493–500.

500. Tharp WG, Gupta D, Smith J, Jones KP, Jones AM, Pratley RE. Effects of glucose and insulin on secretion of amyloid- $\beta$  by human adipose tissue cells. *Obesity (Silver Spring)*. 2016;24(7):1471–9.
501. Kenawy S, Hegazy R, Hassan A, El-Shenawy S, Gomaa N, Zaki H, i sur. Involvement of insulin resistance in D-galactose-induced age-related dementia in rats: Protective role of metformin and saxagliptin. *PLoS One*. 2017;12(8):e0183565.
502. Leal MC, Dorfman VB, Gamba AF, Frangione B, Wisniewski T, Castaño EM, i sur. Plaque-associated overexpression of insulin-degrading enzyme in the cerebral cortex of aged transgenic Tg2576 mice with Alzheimer pathology. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006;65(10):976–87.
503. Liu F, Zaidi T, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Merkle RK, Gong CX. Role of glycosylation in hyperphosphorylation of tau in Alzheimer's disease. *FEBS Lett*. 2002;512(1–3):101–6.
504. Freude S, Plum L, Schnitker J, Leeser U, Udelhoven M, Krone W, i sur. Peripheral hyperinsulinemia promotes tau phosphorylation in vivo. *Diabetes*. 2005;54(12):3343–8.
505. Gil-Bea FJ, Aisa B, Schliebs R, Ramírez MJ. Increase of Locomotor Activity Underlying the Behavioral Disinhibition in Tg2576 Mice. *Behav Neurosci*. 2007;121(2):340–4.
506. Kalueff A V., Stewart AM, Song C, Berridge KC, Graybiel AM, Fentress JC. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. *Nat Rev Neurosci*. 2016;17(1):45–59.
507. Wesson DW, Wilson DA. Age and gene overexpression interact to abolish nesting behavior in Tg2576 amyloid precursor protein (APP) mice. *Behav Brain Res*. 2011;216(1):408–13.
508. Lalonde R, Lewis TL, Strazielle C, Kim H, Fukuchi K. Transgenic mice expressing the  $\beta$ APP695SWE mutation: Effects on exploratory activity, anxiety, and motor coordination. *Brain Res*. 2003;977(1):38–45.
509. Tabuchi M, Yamaguchi T, Iizuka S, Imamura S, Ikarashi Y, Kase Y. Ameliorative effects of yokukansan, a traditional Japanese medicine, on learning and non-cognitive disturbances in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Ethnopharmacol*. 2009;122(1):157–62.



510. Ognibene E, Middei S, Daniele S, Adriani W, Ghirardi O, Caprioli A, i sur. Aspects of spatial memory and behavioral disinhibition in Tg2576 transgenic mice as a model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res.* 2005;156(2):225–32.
511. Chung JA, Cummings JL. Neurobehavioral and neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: Characteristics and treatment. *Neurol Clin.* 2000;18(4):829–46.
512. 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.
513. Mosconi L, Mistur R, Switalski R, Tsui WH, Glodzik L, Li Y, i sur. 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.
514. Poon CH, Wang Y, Fung ML, Zhang C, Lim LW. Rodent models of amyloid-beta feature of alzheimer's disease: Development and potential treatment implications. *Aging Dis.* 2020;11(5):1235–59.
515. Ellenbroek B, Youn J. Rodent models in neuroscience research: Is it a rat race? *DMM Dis Model Mech.* 2016;9(10):1079–87.
516. 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.
517. 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.
518. 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).
519. Lončar A. Rane promjene u mozgu izazvane središnjom primjenom streptozotocina u eksperimentalnom modelu sporadične Alzheimerove bolesti [disertacija]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 2020.
520. Ma YH, Wang J, Rodd GG, Bolaffi JL, Grodsky GM. Differences in insulin secretion between the rat and mouse: Role of cAMP. *Eur J Endocrinol.* 1995;132(3):370–6.

521. Bergen WG, Mersmann HJ. Comparative aspects of lipid metabolism: Impact on contemporary research and use of animal models. *J Nutr.* 2005;135(11):2499–502.
522. Kararli TT. Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharm Drug Dispos.* 1995;16(5):351–80.

## 11. KRATKA BIOGRAFIJA

Ana Babić Perhoč rođena je 22.8.1988. u Puli. Odrasla je u Poreču, gdje je pohađala osnovnu školu i jezičnu gimnaziju SŠ Mate Balote. 2007. godine upisala je Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, na kojem 2012. godine stječe diplomu magistre farmacije. Po završetku studija, odrađuje ljekarnički staž u Ljekarnama Joukhadar, nakon kojeg polaže stručni ispit za ljekarnike pri Ministarstvu zdravlja i stječe licencu za samostalni rad. Od 2014. do 2017. godine radila je u Plivi Hrvatska d.o.o. kao stručnjak za farmakovigilanciju u Tevinom centru za periodička izvješća i upravljanje rizicima. Od 2017. godine zaposlena je kao doktorand/asistent na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u sklopu istraživačkog projekta HRZZ-a „Terapijski potencijal oralne galaktoze u eksperimentalnoj Alzheimerovoj bolesti“ voditeljice prof. dr. sc. Melite Šalković-Petrišić. Kao autor i ko-autor objavila je 10 međunarodno recenziranih znanstvenih radova indeksiranih u WoS-u, od kojih 2 iz rezultata disertacije. Aktivno je sudjelovala na brojnim domaćim i međunarodnim kongresima, radionicama i ljetnim školama iz područja farmakologije i neuroznanosti. Kao suradnik sudjeluje u HRZZ-ovom projektu „Mehanizmi nutrijentom posredovanih učinaka endogenog GLP-1 na kognitivne i metaboličke poremećaje u eksperimentalnim modelima neurodegenerativnih bolesti“ te u Znanstvenom centru izvrsnosti ZCI-Neuro Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. 2020. godine postala je majka kćeri Evi.