

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

Bruno Buljan

**Intranazalna primjena inzulina kao terapijski pristup  
u liječenju Alzheimerove bolesti**

*Diplomski rad*



Zagreb, 2021.

*Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Melite Šalković-Petrišić i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2020./2021.*

POPIS I OBJAŠNENJE KRATICA:

AC	adenilat ciklaza	IRBS	moždana inzulinska rezistencija
AB	Alzheimerova bolest	IRS-1/2	IR supstrat-1/2
sAB	sporadični tip AB	JNK	c-Jun N-terminus kinaza
fAB	familijalni tip AB	KO	eng. <i>knock-out</i>
AGE	produkti neenzimatske glikacije	LBD	demencija Lewyijevih tjelešaca
AgRP	eng. agouti-related protein	MAPK	mitogenom aktivirane protein kinaze
Akt	protein kinaza B (PKB)	MCH	eng. <i>melanin concentrating hormone</i>
APP	amiloidni prekursori protein	MCI	eng. <i>mild cognitive impairment</i>
ATP	adenozin trifosfat	MMSE	eng. <i>mini mental state examination</i>
$\beta A_{40/42}$	$\beta$ -amiloid s 40/42 aa.	MR	magnetska rezonancija
BBB	krvnomoždana barijera	mTORC1/2	eng. <i>mammalian target of rapamycin complex 1/2</i>
cAMP	ciklički adenozin monofosfat	mtRNA	mitohondrijska RNA
CREB	eng. <i>cAMP response element binding protein</i>	NFT	neurofibrilarni snopići
CSF	cerebrospinalni likvor	NMDAR	N-metil-D-aspartat receptor
DMT1	dijabetes melitus tipa 1	PD	Parkinsonova bolest
DMT2	dijabetes melitus tipa 2	PDK1	o fosfoinozitudu ovisna kinaza 1
ER	endoplazmatski retikulum	PI3K	fosfoinozitud 3-kinaza
ERK	eng. <i>extracellular signal regulated kinase</i>	aPKC	atipična protein kinaza C
FOXO1	eng. <i>forkhead box protein O1</i>	POMC	proopiomelanokortin
FTD	frontotemporalna demencija	PPAR $\alpha/\beta/\gamma/\delta$	eng. <i>peroxisome proliferator activator receptor <math>\alpha/\beta/\gamma/\delta</math></i>
GA	Golgijev aparat	RAGE	receptor za AGE
GF	eng. growth factor	Ras	eng. <i>rat sarcoma oncogene</i>
Glc	glukoza	ROS	eng. <i>reactive oxygen species</i>
GlcNAc	N-acetil-glukozamin	SH2/3	eng. <i>Src homology domain 2/3</i>
Glu	glutamat	Shc	SH3 sadržeći protein
GLUT1-8	glukozni transporter 1-8	TFX	transkripcijski faktor X
Grb	eng. <i>GF receptor bound protein</i>		
GSK-3 $\alpha/\beta$	glikogen sintaza kinaza 3 $\alpha/\beta$		
icv-STZ	intracerebroventrikularni streptozotocin		
IGF-1	inzulinu-slični faktor rasta 1		
IGF-1R	IGF-1 receptor		
IN	intranazalno		
Inz	inzulin		
IR	inzulinski receptor		
pIR	fosforilirani IR		



# Sadržaj

1 Uvod	1
2 Alzheimerova bolest	3
2.1 Epidemiologija	3
2.2 Klinička slika Alzheimerove bolesti	4
2.2.2 Psihometrija Alzheimerove bolesti	6
2.3 Patologija i dijagnostika Alzheimerove bolesti	8
2.2.1 Makroskopska i mikroskopska patologija Alzheimerove bolesti	8
2.2.2 Humoralna patologija Alzheimerove bolesti	11
2.2.1 Stanična patologija Alzheimerove bolesti	12
2.4 Patogeneza i liječenje Alzheimerove bolesti	16
2.4.1 Kolinergička hipoteza Alzheimerove bolesti i antikolinesterazni lijekovi	17
2.4.2 Glutamatna ekscitotoksičnost i antagonist NMDA receptora (memantin)	17
2.4.3 Amiloidna hipoteza i metabolizam amiloidnog prekursornog proteina	18
2.4.4 Ostali terapijski pristupi u liječenju Alzheimerove bolesti	22
2.4.5 Simptomatsko liječenje Alzheimerove bolesti	23
3 Inzulinska signalizacija u Alzheimerovoj bolesti	24
3.1 Životinjski modeli za Alzheimerovu bolest i procjena njihovih kognitivnih sposobnosti	24
3.1.1 Ekvivalenti kognitivne psihometrije u životinjskim modelima Alzheimerove bolesti	27
3.2 Osnovne komponente puta inzulinske signalizacije	28
3.2.1 Inzulin i inzulinski receptor	28
3.2.2 Metabolička grana inzulinske signalizacijske kaskade	31

3.2.3 Mitogena grana inzulinske signalizacijske kaskade	33
3.2.4 GLUT nosači za glukozu	34
3.3 Inzulinska signalizacija u moždanome tkivu	35
3.4 Inzulinska rezistencija moždanog tkiva kao osnova patogeneze Alzheimerove bolesti	37
3.4.1 Mehanizmi periferne inzulinske rezistencije	38
3.4.2 Molekularna osnova centralne inzulinske rezistencije	40
4 Intranazalni inzulini u Alzheimerovoj bolesti	42
4.1 Intranazalna primjena lijekova	42
4.2 Pretkliničke studije intranazalne primjene inzulina	45
4.3 Kliničke studije intranazalne primjene inzulina	52
5 Zaključak	59
Literatura	61
Curriculum vitae	64

# Intranazalna primjena inzulina kao terapijski pristup u liječenju Alzheimerove bolesti

Bruno Buljan

## SAŽETAK

Alzheimerova bolest je neurodegenerativna bolest sa značajnim ekonomskim i socijalnim učinkom na društvo. Do danas ne postoji sigurna teorija nastanka Alzheimerove bolesti niti značajno učinkovita terapija za Alzheimerovu bolest. Ovaj diplomski rad obrađuje mogućnosti intranazalne primjene inzulina kao potencijalnog budućeg terapijskog rješenja kroz tri dijela. U prvome dijelu je prikazana epidemiologija, klinička slika, patologija, patogeneza i odobrena terapija Alzheimerove bolesti; u drugome dijelu centralna inzulinska rezistencija kao moguća osnova patogeneze Alzheimerove bolesti i mehanicistički susprat učinka intranazalno primjenjenog inzulina na razvoj i progresiju Alzheimerove bolesti; a u trećem dijelu pretklinička i klinička istraživanja intranazalne primjene inzulina s porukom o učinkovitosti, sigurnosti i ograničenjima predložene terapije za Alzheimerovu bolest.

ključne riječi: Alzheimerova bolest, inzulinska signalizacija, intranazalni inzulin, pretkliničke studije, kliničke studije.

# Intranasal insulin as a therapeutic strategy in the treatment of Alzheimer disease

Bruno Buljan

## SUMMARY

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disease with a significant economic and social impact on society. To date, there is no reliable theory of Alzheimer's disease pathogenesis or significantly effective therapy for Alzheimer's disease. This thesis deals with the possibilities of intranasal administration of insulin as a potential future therapeutic solution through three parts. The first part presents the epidemiology, clinical picture, pathology, pathogenesis and approved therapy of Alzheimer's disease; in the second part, central insulin resistance as a possible basis for the pathogenesis of Alzheimer's disease and a mechanistic substrate of the effect of intranasally administered insulin on the development and progression of Alzheimer's disease is elaborated; and in the third part, preclinical and clinical studies of intranasal insulin administration are listed with a message about the efficacy, safety, and limitations of the proposed therapy for Alzheimer's disease.

key words: Alzheimer's disease, insulin signalisation, intranasal insulin, preclinical studies, clinical studies.



*Zahvaljujem se profesorici Meliti Šalković-Petrišić na pruženoj prilici da se okušam u ovako zanimljivoj i suvremenoj temi te podršci u pisanju ovog diplomskog rada. Zahvaljujem se mojoj majci Nedjeljki, ocu Sekulu i posebice bratu Mislavu na svakoj vrsti potpore koju su mi pružali tijekom pisanja ovog rada i studiranja medicine i fizike na Zagrebačkom Sveučilištu.*



# 1 Uvod

Alzheimerova bolest (AB) je progresivna neurološka bolest koja se klinički prezentira demencijom. To je najčešći tip demencije i prvenstveno zahvaća populaciju stariju od 65 godina. Kako je prosječno trajanje života u Europi oko 80 godina i ima tendenciju produljenja, AB predstavlja sve značajniji socioekonomski teret za društvo. Procjenjuje se da će u Americi cjelokupni godišnji trošak te bolesti prijeći 600 milijuna dolara do 2050. godine. Shodno tome, Svjetska zdravstvena organizacija uvrstila je AB na popis globalnih javnozdravstvenih prioriteta. [1, 2]

Doktor Alois Alzheimer 1907.g. prepoznao je Alzheimerovu demenciju kao zasebni entitet temeljem specifičnog patološkog nalaza amiloidnih naslaga i neurofibrilarnih snopića u moždanom tkivu. Od tog otkrića do danas, unatoč više od 100 godina istraživanja, nema registriranih lijekova za koje je dokazano da mijenjaju tijek te bolesti, ali otkrivene su mnoge spoznaje o patogenezi tog stanja i istraženi brojeni terapijski pristupi za njeno liječenje. O istraživačkom naporu i intenziviranju tog napora govori i činjenica da je u online bazi medicinskih članka PubMed na temu Alzheimerove bolesti do danas objavljeno oko 174 000 radova, a polovina njih unutar posljednjih 10 godina.

Prava etiologija bolesti još nije utvrđena, ali postoje značajne indikacije da bi metabolički poremećaji u mozgu, primarno smanjeni metabolizam glukoze i poremećaji inzulinskog sustava, desenzitacija inzulinskog receptora i smanjena inzulinska signalizacija u neuronima mogli biti uključeni u nastanak i/ili razvoj AB.[3] Indirektnu potporu tome daje činjenica da je jedan od često korištenih animalnih modela AB štakor kojem je intracerebroventrikularno primijenjen streptozotocin (icv-STZ model), citotoksična tvar koja pri parenteralnoj primjeni, ovisno o dozi i načinu primjene, izaziva dijabetes melitus tipa 1 (DMT1) ili tipa 2 (DMT2) sa sistemskom inzulinskom rezistencijom, a pri icv primjeni dovodi do inzulinske rezistencije u mozgu. Obzirom na navedeno, novija istraživanja usmjerena su na ispitivanja terapijskog potencijala lijekova odobrenih za liječenje dijabetesa u liječenju AB.

Cilj ovog diplomskog rada je, uz pregled epidemiologije, patologije, kliničke slike, dijagnostike i liječenja AB, s posebnim osvrtom na hipotezu da bi inzulinska rezistencija u mozgu mogla biti uzrokom i/ili pridonijeti razvoju AB, prikazati rezultate pretkliničkih i kliničkih istraživanja utjecaja

intranazalne primjene inzulina na tijek bolesti u životinja i ljudi te dati osvrt na terapijski potencijal ovog pristupa u liječenju AB.

## 2 Alzheimerova bolest

Alzheimerova bolest je progresivna neurodegenerativna bolest s kroničnim tijekom koja ima svoj pretklinički asimptomatski stadij sa specifičnim promjena u moždanom tkivu i likvoru i klinički simptomatski stadij prvenstveno karakteriziran demencijom, tj. gubitkom epizodnog pamćenja. To je bolest mahom starije populacije. Pretklinički stadij započinje i do 20 godina prije kliničkih simptoma. Klinički stadij traje 6-12 godina i kako bolest napreduje pojavljuje se sve izraženiji kognitivni deficit u vidu amnezije, disfazije i dispraksije, promjena osnovnog raspoloženja i ponašanja osobe, gubitka motorike, nepokretnosti i inkontinencije. Alzheimerova bolest sama po sebi ne uzrokuje smrtni ishod ali pogoduje razvoju stanja koji vode u njega poput aspiracijskih pneumonija, dekubitusa, septičnih stanja i sl.

### 2.1 Epidemiologija

Alzheimerova bolest se pojavljuje u dva oblika (fAB i sAB) različitog uzroka i dobi u kojoj se pojavljuju klinički simptomi. Familijalni oblik je genetski uzrokovan i čini svega oko 5% slučajeva AB. Dob kada simptomi nastupaju je od 30-50 godina, a geni koji su implicirani u nastajanje bolesti uključuju gen za amiloidni prekursori protein (APP) na 21. kromosomu, i presenilin 1 i 2 (PSEN1 i PSEN2), gene na 1. i 14. kromosomu uključene u katabolizam APP. Zajedničko obilježje mutantnih alela tih gena je povećana proizvodnja specifičnog A $\beta$ <sub>42</sub> proteina čije se patološko izvanstanično nakupljanje u obliku fibrila, oligomera i plakova, smatra glavnim izravnim uzročnikom bolesti. Sporadičan oblik bolesti prisutan je u 95% ostalih slučajeva i za sada nije poznat izravan uzrok ovog oblika bolesti već samo rizični čimbenici. Incidencija sAB je 3% u dobnoj skupini od 65 -75 godina, 19% u dobnoj skupini 75-85 godina i oko 47% u dobnoj skupini starijih od 85 godina. Pretpostavlja se da danas od AB boluje oko 44 milijuna ljudi diljem svijeta, a kako populacija stari, pretpostavlja se da će se ta brojka utrostručiti do 2050. godine. AB je najčešći uzročnik demencije u svijetu obzirom da je 50-75% svih demencija uzrokovano upravo ovom bolesti.

Rizični čimbenici za razvoj sAB su genetski i okolišni. Smatra se da se oko 70% rizika za razvoj AB može pripisati genetskim čimbenicima, među kojima se ističe apolipoprotein (APOE) gen i njegova tri alela 2, 3 i 4. Alel APOE 2 ima protektivno djelovanje na razvoj AB, alel APOE 3 je

najčešća varijanta u populaciji i nema utjecaja na incidenciju AB, dok alel APOE 4 u heterozigota daje omjer šansi (OR) za razvoj AB 3, a u homozigota 12. [1, 2, 6]

Ostali značajni genetski rizični čimbenici odnose se na organizacije upalnog odgovora (neuropale i mikroglioze), metabolizma kolesterola i regulacije staničnog procesa reciklaže receptora i djelova stanične stijenke procesom endocitoze. Pojedinačno svaki od navedenih čimbenika nema veliki doprinos razvoju AB, ali kako su frekvencije tih nepoželjnih alela u prirodi relativno česte, združeno mogu doprinijeti povećanju incidencije za 100% u takvim populacijskim skupinama. GWAS studijama identificirane su rijetke mutacije koje doprinose ili koče razvoj AB, te takve studije doprinose prepoznavanju patogenetskih procesa nastanka AB. Za istaknuti je polimorfizam u genu koji kodira 11 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenazu, enzim koji podiže razine kortizola u krvotoku, koji doprinosi razvoju AB (OR ~ 6) [4] i protektivnu mutaciju u APP genu, A673T, koja u in vitro istraživanjima reducira formiranje A $\beta$  plakova za 40%. [5]

Od okolišnih čimbenika, povećana fizička aktivnost i stupanj obrazovanja koreliraju s smanjenom incidencijom AD, dok neliječena hipertenzija i dijabetes povećavaju incidenciju AB. Pretilost se također smatrala nepovoljnim čimbenikom za razvoj AB ali ima i nekih novijih istraživanja koja ne podupiru ovu pretpostavku. Posebno treba istaknuti činjenicu da dijabetes je rizični čimbenik za razvoj AB sa OR ~1.5 - 2.5[7].

## 2.2 Klinička slika Alzheimerove bolesti

Nakon višegodišnjeg (10-20) godina pretkliničkog stadija, uočljivog samo uz pomoć specifičnih laboratorijskih testova, slijedi simptomatski, klinički stadij AB. U početku se najčešće prezentira kao perzistirajući i progresivni poremećaj epizodnog pamćenja u starijih osoba, što bi se klasificiralo kao blagi kognitivni poremećaj (MCI, *engl. mild cognitive impairment*). Epizodno pamćenje vrsta je dugoročnog, deklarativnog pamćenja, koje se u suporedbi sa semantičkim pamćenjem odnosi na prisjećanje svakodnevnih događaja. Pad mogućnosti memoriranja veći je nego što je očekivan za dob pacijenta, ali ga najčešće mogu uočiti samo bliski članovi obitelji ili poznanici te osobe. Pojedini bolesnici mogu se žaliti na promjene u pamćenju koje su primjetljive samo njima - to se naziva subjektivnim poremećajem kognicije (*engl. subjective cognitive decline*) i najčešće predstavlja predstadij MCI. U približno trećine bolesnika s dijagnozom MCI u narednih se 5 godina dijagnosticira razvije klinička slika demencije i dijagnosticira AB. [1,2,6]

Progresija AB nastavlja se s topografskim problemima - bolesnici se teško orijentiraju u prostoru, otežan im je multi-tasking i doživljavaju gubitak samopouzdanja. Poremećaji pamćenja postaju izraženiji i ometaju svakodnevni život. Kasniji stadiji, od srednje teškog do teškog stadija AB, praćeni su promjenama karaktera i ponašanja, otežanom komunikacijom, ovisnošću o tuđoj pomoći i nepokretnošću. Bolesnik može postajati zbunjen, sumnjičav (paranoidna deluzija) i agitiran (delirij) ili apatičan i depresivan. Razvija se motorički deficit često po tipu parkinsonizma. S vremenom bolesnik gubi reflekse poput refleksa gutanja te postaje inkontinentan. Mogu se pojaviti halucinacije i konvulzije. Smrt od AB slijedi u prosjeku 8,5 godina nakon postavljanja dijagnoze ove bolesti.

Moguća je također i atipična klinička slika s tri prepoznata entiteta: posteriorna kortikalna atrofija (PCA), logopenična afazija (LPA) i frontalni tip AB (FAB). PCA patohistološki karakteriziraju rasprostranjeni  $\beta$ -amiloidni plakovi, ali je  $\tau$ -proteinska patologija lokalizirana u parijeto-temporalnom korteksu pa se pacijent prezentira sa vizuospacijalnim, vizuoperceptivnim i dispraktčnim tegobama. U LPA pacijent ima problem s pronalaskom riječi; ne može imenovati objekte (anomia) i radi pauze prilikom izražavanja misli da bi se prisjetio odgovarajuće riječi. Takvi pacijenti imaju problem s kratkoročnom radnom memorijom. FAB nalikuje na bihevioralni oblik frontotemporalne demencije (FTD).

Familijalni oblik AB (fAB) može se prezentirati i tipično i atipično, ali najčešće u ranijoj dobi. Neke mutacije PSEN1 gena (presenilin 1) povezane su s pojavom izraženih mioklonusa, konvulzija i spastične parapareze.

Diferencijalna dijagnoza AB je široka. Kliničke slike slične početnom stadiju AB mogu biti samo subjektivni opažaj (ranije navedeno), uzrokovane afektivnim poremećajima (depresija) ili posljedica alkoholne ovisnosti ili djelovanja različitih droga i lijekova. Također, neke infektivne, metaboličke i reumatološke bolesti poput HIV (virus humane imunodeficijencije) infekcije, HSV infekcije (herpes simpleks virus), terciarnog sifilisa, hipo/hipertireoze i paraneoplastičnih sindroma mogu izazvati poremećaje pamćenja.

U stadiju demencije, uža diferencijalna dijagnoza uključuje cerebrovaskularnu demenciju, demenciju Lewyjevih tjelešaca (LBD), frontotemporalnu demenciju (FTD) i Parkinsonovu bolest (PB). Razlike među tim demencijama su u početnoj kliničkoj prezentaciji, povezanim simptomima i patohistološkim nalazima. Moguće je da pacijent ima dva tipa demencije istovremeno.

U cerebrovaskularnoj demenciji koja nastaje zbog oštećenja mikrovaskulature i posljedično mikroinzulta moždanog tkiva, inicijalni simptomi su teškoće s planiranjem i organizacijom te slaba ravnoteža i spori hod. Cerebrovaskularna demencija najčešće dolazi u kombinaciji s AB.

Demencija Lewyijevih tjelešaca (LBD) patološki je karakterizirana kortikalnim inkluzijama  $\alpha$ -sinnukleina i početni simptomi uključuju poremećaj spavanja, pojavu vizualnih halucinacija, otežanu ravnotežu i spori hod u testu hodanja. Samo 5-10% pacijenata imaju izoliranu LBD, a ostatak i konkomitantnu AB.

Frontotemporalna demencija (FTD) ima više kliničkih podtipova: bihevioralni oblik FTD, primarnu progresivnu afaziju, Pickovu bolest, kortikobazalnu degeneraciju i progresivnu supranuklearnu parezu (eng. palsy). Patohistološki ju karakterizira frontotemporalna atrofija i spongioza s regionalnim inkluzijama  $\tau$ -proteina ili *transactive response DNA-binding proteina*. Od AB se klinički razlikuje jer obično počinje ranije, sa 45-60 godina i prvi simptomi su promjene karaktera i ponašanja te poteškoće shvaćanja i izvođenje govora (disfazije).

Parkinsonova bolest (PB) obično počinje s motornim simptomima: bradikinezijom, spastičnošću po tipu olovne cijevi i tremorom. Test hoda pokazuje probleme s započinjanjem i završavanjem pokreta te festinaciju. Demencija se ravija kasnije u kliničkoj slici kada inkluzije  $\alpha$ -sinnukleina i A $\beta$  zahvate korteks.

Miješani tip demencije (npr. AB + cerebrovaskularna demencije/LBD) nije rijetka pojava. Oko 50% demencija imaju mješanu patološku pozadinu i taj se postotak povećava s dobi, osobito iznad 85 godina starosti. Osim toga, mnoge neurodegenerativne bolesti dijele patohistološku i patofiziološku pozadinu na subcelularnom nivou, a s njihovom progresijom i kliničku sliku. Najbolji primjer za to predstavljaju AB i PB, ali i HB (Huntingtonova bolest). U kasnijim stadijima bolesnici s AB mogu razviti parkinsonizam, a oni s PB kognitivnu disfunkciju. Detaljnija usporedba na razini patohistoloških nalaza i patofizioloških mehanizama u AB i PB može se naći u preglednim radovima ove problematike [17].

### 2.2.2 Psihometrija Alzheimerove bolesti

Praćenje i objektivno dokumentiranje progresije i težine bolesti predstavlja izazov te su u tu svrhu razvijeni različiti upitnici, tzv. psihometrijski instrumenti, kako bi se kvantificiralo (pa i dijagnosticiralo) kognitivno stanje u bolesnika s AB. Pomoću njih omogućeno je objektivno definirati obrazac i kvantificirati težinu kognitivnog deficita u odnosu na dobno usporedive

Tablica 1. Komponente različitih skali koje mjere stadij i težinu Alzheimerove bolesti.

MMSE	MoCA	ADAS-Cog	ADCS-ADL	CDR-SB
vremenska orijentacija	prisjećanje riječi (odmah i nakon 5 min)	prisjećanje riječi	hranjenje	memorija
prostorna orijentacija	test crtanja sata	imenovanje objekata i prstiju	pokretljivost	orijentacija
ponavljanje riječi (registriranje)	test precrtavanja 3D kocke	slijeđenje naredbi	kupanje, nužda, uređivanje, oblačenje	prosudba i rješavanje problema (eng. judgment)
test oduzimanja sedmica (pozornost i kalkulija)	test povezivanja, B dio (eng. TMT-B)	upravljanje prostorom (eng. constructional praxis)	korištenje telefona i televizije	aktivnosti u zajednici
dugoročna memorija	riječi na "F" (eng. phonemic fluency task)	formiranje plana (eng. ideation praxis)	prisustvovanje u <i>eng. small-talk</i>	kuća i hobiji
imenovanje	test oduzimanja sedmica	orijentacija	priprema pića, kuhanje	briga za izgled
ponavljanje rečenice	ponavljanje niza brojeva unaprijed i unatrag	prepoznavanje riječi	pospremanje stola, rješavanje smeća	
izvršenje kompleksne naredbe	brzo prepoznavanje "A" u nizu govorenih fonema	izvršavanje naredbe	lako pronalazi svoje stvari, samostalnost, održavanje dogovora	
pisanje rečenice	imenovanje	prisjećanje uputstava	kupovina, putovanje izvan kuće	
čitanje naredbe i izvršavanje	ponavljanje rečenice	govor	čitanje, pisanje, hobiji, rukovanje kućnim aparatima	
crtanje dijagrama	istakni sličnost 2 ideje	razumijevanje	razgovor o suvremenim temama	
	orijentacija	traženje pravih riječi		

Podatci su prikupljeni iz [18-23]. Skraćenice: MMSE (eng. mini mental state examination), MoCA (eng. Montreal cognitive assesment), ADAS-Cog (eng. AD Aessment Scale - Cognitive section), ADCS-ADLi (eng. AD Cooperative Study - activities of daily living inventory), CDR-SB (eng. Clinical dementia rating - sum of boxes).

standarde. Takvi instrumenti osobito su korisni u praćenju stanja bolesnika u kliničkim istraživanjima i definiranju efikasnosti terapijskih pristupa. [18-23]

Najpoznatiji su MMSE (eng. *Mini mental state examination*), MoCA (eng. *Montreal cognitive assesment*), ADAS-Cog (eng. *AD Aessment Scale - Cognitive section*); ADCS-ADLi (eng. *AD Cooperative Study - activities of daily living inventory*) i CDR-SB (eng. *Clinical dementia rating - sum of boxes*). Sažeti pregled komponente koje testira svaka od navedenih ocjenskih ljestvica prikazan je u Tablici 1.

Ocjenske ljestvice MMSE, MoCA i ADAS-Cog orjentirane na neuropsihijatrijski pregled i ispituju klasične kognitivne funkcije po komponentama: pamćenje, vizuospacijalne sposobnosti,



Tablica 2. Podatci potrebni za provedbu i interpretaciju rezultata psihometrijskih instrumenata spomenutih u tekstu.

	MMSE	MoCA	ADAS-Cog	ADCS-ADL	CDR-SB
<b>tip testa</b>	zadatci/upitnik	zadatci/upitnik	zadatci/upitnik	upitnik	strukturirani intervju
<b>trajanje testiranja</b>	10 min	15 min	30 min	15 min	20 min
<b>max bodovi</b>	30	30	70	78	18
<b>AD prag</b>	24-20	≤25	≥12	71	2.0-4.5
<b>korelacija s stadijem AD</b>	negativna	negativna	pozitivna	negativna	pozitivna
<b>senzitivnost*</b>	79 %	94 %	88 %	97 %	87 %
<b>specifičnost*</b>	90 %	60 %	89 %	70 %	94 %

\*Senzitivnost i specifičnost se odnose na sposobnost testova da dijagnosticiraju nespecificiranu demenciju. Obe varijable variraju s obrazovanošću testirane populacije i odabranim dijagnostičkim pragom. Dani postotci su samo okvirni pokazatelji kvalitete testova. Podatci su sakupljeni iz [18-23]. Skraćenice: MMSE (eng. mini mental state examination), MoCA (eng. Montreal cognitive assesment), ADAS-Cog (eng. AD Asessment Scale - Cognitive section), ADCS-ADLi (eng. AD Cooperative Study - activities of daily living inventory), CDR-SB (eng. Clinical dementia rating - sum of boxes).

egzekutivne sposobnosti, pozornost, koncentracija i radna memorija, jezične sposobnosti, mogućnost apstraktnog razmišljanja i orijentacija u svim smjerovima. Ocjenske ljestvice ADCS-ADL i CDR-SB evaluiraju kompozitne funkcionalne sposobnosti bolesnika u stvarnom životu i više su u formi upitnika nego niza zadataka ili testova. Mogu ih ispuniti bolesnici ali i njihovi životni partneri ili skrbnici. Tehnički podatci provedbe testiranja i podatci potrebni za interpretaciju rezultata navedni su u Tablici 2. U progresiji AB, MMSE rezultat će pasti s početnih 25 na 5. Na sličan način progresiju kliničke slike prate i druge ocjenske ljestvice.

## 2.3 Patologija i dijagnostika Alzheimerove bolesti

Alzheimerova bolest je dugo mogla biti potvrđena isključivo post mortem, patohistološkom analizom moždanog tkiva. Danas, postoje i drugi pristupi, ali patohistološka analiza moždanog tkiva ostaje zlatni standard dijagnostike AB.

### 2.2.1 Makroskopska i mikroskopska patologija Alzheimerove bolesti

Za AB su mikroskopski karakteristični amiloidni plakovi smješteni izvanstanično i neurofibrilarni snopići (NFT) hiperfosforiliranog  $\tau$ -proteina unutarstanično. Obzirom na broj

aminokiselina postoji nekoliko vrsta A $\beta$  koje su smještene perisinaptično (A $\beta$ <sub>42</sub>) ili perivaskularno (A $\beta$ <sub>40</sub>). Perivaskularno nakupljeni A $\beta$  uzrokuje takozvanu kongofilnu amiloidnu angiopatiju.  $\tau$ -protein (*engl. microtubule associated protein*) stabilizira mikrotubularne strukture u neuronima. Može biti fosforiliran na pet aminokiselinskih ostataka, a u slučaju prekomjerne fosforilacije dolazi do izražene promjene njegove native konformacije i agregacije u netopljive NFTove. U uznapredovalim stadijima bolesti vidljivi su znakovi astroglioze i aktivacije mikroglije, neuropilne niti, distrofični neuriti, gubitak sinaptičke gustoće i gubitak sinapsi, što dovodi do smrti neurona, neurodegeneracije i makroskopski atrofije moždanog tkiva i ventrikulomegalije. Ultramikroskopski se u neuronima nalazi deorganizirani mikrotubularni sustav s posljedicama za aksonalni transport nutrijenata, neurotransmitera i ostalih proteina. U tzv. miješanim oblicima demencije, osim patološkog supstrata karakterističnog za AB, mogu se naći i Lewyijeva tjelešca koja su unutarstanični agregati  $\alpha$ -sinnukleina ili supstrati vaskularne bolesti (ateroskleroza i sl.). Lewyijeva tjelešca su karakteristična za LBD demenciju, a endotelne promjene na vaskulaturi za vaskularnu demenciju.

Topološki, A $\beta$  naslage nalazimo u izokorteksu, entorinalnom korteksu i hipokampalnoj formaciji, ali u posljednje dvije regije u manjoj količini nego NFT. NFT nalazimo u medijalnom temporalnom režnju (entorinalni korteks i hipokampus), a kasnije i u asocijativnom izokorteksu. Makroskopski Alzheimerova demencija stoga rezultira smanjenjem hipokampalnog volumena. Cerebralna amiloidna vaskulopatija povezana je sa subkortikalnim lobarnim mikrokrvarenjima koji se mogu in vivo dokazati s MRI i upućuju na dijagnozu AB.

Tijekom progresije bolesti amiloidna i tau patologije pojačavaju se i šire u mozgu. Amiloidne naslage počinju u pretkliničkoj fazi i dostižu plato s prvom pojavom simptoma, a NFTovi daju bolji patološko-klinički korelat u simptomatskoj fazi bolesti. Za staging i post-mortem dijagnostiku AD razvijeno je više ljestvica i kriterija. Najpoznatije su Braak ljestvica (procjena stadija bolesti temeljena na osnovu A $\beta$  patologije), Thal kriteriji i kriteriji Konzorcija za ustanovljenje registra Alzheimerove bolesti (CERAD, procjena stadija bolesti temeljena na osnovu NFT). Izolirana uporaba pojedinih ljestvica/kriterija suočava se s malom senzitivnosti ili niskom specifičnosti za uspješnu dijagnozu AB, tako da se danas te ljestvice kombiniraju zajedno s kliničkom slikom kako bi se došlo do što točnije dijagnoze AB (prema smjernicama NIA-AA). Za spomenuti je da postoje pojedinci s izraženom moždanom patologijom po tipu AB, a koji klinički nemaju Alzheimerovu demenciju.

Amiloidne naslage i NFT šire se per continuitatem, tj. uzduž neuronalnih puteva. Naime, primjećeno je da abnormalno konformirani A $\beta$  i  $\tau$  imaju mogućnost izmijeniti konformaciju proteina s kojima su u kontaktu (npr. normalnim A $\beta$  i  $\tau$ ). Pretpostavlja se da transsinaptički prijenos loše konformiranih proteina oštećuje susjedni neuron i tako širi patologiju slično kao u prionskim bolestima. Na taj način, može se objasniti fenotipska varijacija bolesti. Slučajna pojava primarne lezije u mozgu različita je od pojedinca do pojedinca i daljnja propagacija ne može biti identična što daje različite kliničke slike u bolesti s pretpostavljeno dijeljenom patogenetskom osnovom.

Amiloidne naslage,  $\tau$ -NFT i neuroupala mogu se snimati pomoću uređaja za magnetsku rezonanciju i pozitronsku emisijsku tomografiju (MRI/PET) te tako vidjeti rasprostranjenost i intenzitet tih promjena u mozgu in vivo. MRI za snimanje amiloidnih naslaga dostupan je u kliničkom okruženju, ali zdravstvena osiguranja najčešće ne pokrivaju troškove te pretrage.  $\tau$ -PET i scan neuroupale koriste se samo u istraživačke svrhe. Pretrage funkcioniraju na način da se željeni patološki entiteti ciljaju posebno označenim biološkim tvarima koji se potom snimaju u uređaju za slikovni prikaz posebnom sekvencom. Za amiloidni MRI koriste se spojevi florbetapir, flutemetamol ili florbetaben, za  $\tau$ -PET AV1451 i za neuroupalu posebno označeni limfociti. Uz pomoć takvih pretraga, zajedno s molekularnim biomarkerima AB u krvi i likvoru, može se postaviti dijagnoza pretkliničke AB u tri kategorije: niska vjerojatnost, srednja vjerojatnost i visoka vjerojatnost razvoja AB. [1, 2].

Osim morfoloških pretraga, u AB promijenjen je i funkcionalni nalaz mozga na razini staničnog iskorištenja glukoze. Fluorodeoksiglukoza (FDG)-PET je medicinska pretraga snimanja moždane funkcije koristeći radioaktivno obilježenu glukozu izotopom  $^{18}\text{F}$  koja pokazuje smanjeni metabolizam glukoze u različitim područjima mozga koji korelira s razvojem simptoma demencije. U fAB te promjene su lokalizirane frontotemporalno ili temporoparijetalno, dok u sAB hipometabolizam je difuzan diljem korteksa, a najizraženiji u asocijativnim frontalnim i temporoparijetalnim regijama gdje je i inače najizraženija potreba za glukozom. Ta područja se poklapaju s područjima visoke osjetljivosti na inzulinsku stimulaciju. Funkcionalne MRI (fMRI) studije koje ispituju distribuciju potrošnje kisika i krvnu perfuziju ne pokazuju promjene u odnosu na zdrave kontrole. [14]

Zanimljivo bi bilo istražiti i kakva je distribucija intermedijernih spojeva glikolitičkog puta, acetilkolina, acetyl-CoA, ATPa ili kreatin fosfata u moždanom tkivu bolesnika s AB koristeći spektroskopiju magnetske rezonancije (MRS), obzirom da inzulinom potaknuta utilizacija glukoze proizvodi te spojeve koji su moguće povezani s kliničkom slikom rane AB.

## 2.2.2 Humoralna patologija Alzheimerove bolesti

Alzheimerovu bolest karakterizira niz promjena u cerebrospinalnom likvoru (CSF) koji su od dijagnostičkog značaja. Najistaknutije promjene su snižena razina  $A\beta_{42}$  i povišene razine ukupnog  $\tau$ -proteina i frakcije  $\tau$ -proteina fosforiliranog na Thr181, fosfo- $\tau$  proteina. Ukupni  $\tau$  protein je povišen trostruko, a razina topivog  $A\beta_{42}$  je upola snižena u bolesnika s AB. Specifičnost i senzitivnost tih pretraga prilično je visoka (80-90%) te postoje pokazatelji da omogućuje razlikovanje AB od depresije, Parkinsonove bolesti (PD) te nekih drugih oblika demencije (FTD, LBD).

Spomenute pretrage likvora mogu poslužiti i u pretkliničkoj dijagnostici AB, gdje kombinirana prediktivna vrijednost tih biomarkera iznosi 95%. Sigurna pretklinička dijagnostika AB korisna je iz više razloga. Prvenstveno, takva vrsta informacije korisna je bolesnicima u planiranju budućnosti, pokušajima utjecanja na promjenjive čimbenike rizika te mogućem odabiru terapija koje djeluju na nakupljanje  $A\beta$  kako bi što ranije počeli s liječenjem obzirom na nakupljanje  $A\beta$  u pretkliničkom stadiju AB.

Mnoge istraživanja upućuju na promjene u lipidom sastavu mozga bolesnika s AB u odnosu na dobno-usporedive zdrave ispitanike [9] Nađeno je da CSF razine kolesterola, njegovog prekursora dezmosterola i metabolita 24-hidroksisterola (24S-OHS, cerebrosterol) pozitivno koreliraju s razinom fosfo- $\tau$ 181-proteina. [10] Međutim obzirom da je fosfo- $\tau$ 181-protein povišen i u drugim demencijama i nije dovoljno specifičan kao samostalni patološki biljeg, ove promjene se ne koriste u dijagnostici AB. Ipak, ove su spoznaje zanimljive u razmatranju patofiziologije AB. Mozak je lipidima bogato tkivo tako da je metabolizam masti značajna fiziološka stavka moždanog metabolizma. Imajući na umu krvno-moždanu barijeru, sastav masti u staničnim membranama i likvoru različit je od onog na periferiji. Iz fiziologije je poznato da astrociti koji oblažu moždane krvne žile i u dodiru su sa sistemskom cirkulacijom kao stanično gorivo koriste prvenstveno masti i  $\beta$ -oksidaciju čime proizvode laktat i ketonska tijela, preferentna goriva za neurone koji uglavnom koriste oksidativnu fosforilaciju kao metodu dobivanja ATPa. Na taj način astrocitna aktivnost štiti neurone od štetnih utjecaja masti i kontrolira moždani lipidni sastav. Sastav masti u moždanom tkivu se mijenja kroz život, a iz nasljednih metaboličkih bolesti poznato je da su neke masti posebno toksične za neurone, npr. ceramidi. Iz pokusa sa životinjama na dijeti s visokim udjelom masti (60% u odnosu na normalnih 5%, životinjski model koji se koristi u proučavanju

neurodegeneracije) poznato je da palmitoilna kiselina izaziva perifernu i centralnu (moždanu) inzulinsku rezistenciju i neuronalnu toksičnost te putem uspostave neuroupale izaziva neurodegeneraciju. [11]

Kolesterol u moždanom tkivu ima kompleksni metabolizam i in vitro istraživanja pokazala su da visoke razine kolesterola izazivaju pojačano odlaganje A $\beta$ , a da su njegovi metaboliti (npr. 24S-OHC) neurotoksični čak u fiziološkim razinama. In vivo studije sugeriraju da neurodegeneracija mijenja moždani metabolizam kolesterola tako da nije najjasnije jesu li povećane razine kolesterola i njegovih derivata uzrok ili posljedica neurodegeneracije ili možda oboje. Promjena sastava staničnih membrana može biti posljedica promjene vrste staničnog goriva koje koriste neuroni/astrociti uslijed poremećaja inzulinske signalizacije, neophodnog signalnog puta za glikolitički put i katalitičku dekarboksilaciju priuvat dehidrogenazom.

Inzulin je peptidni hormon kojeg primarno proizvodi gušterača, a zbog svoje veličine se uglavnom ne prenosi pasivnim transportom u CSF, već je taj transport većinski posredovan transcitozom pomoću inzulinskih receptora (IR) na vaskularnom endotelu i astrocitima. U općoj populaciji razine inzulina u CSFu su vrlo niske, što dijelom može biti razlog da inzulin nije ranije pronađen u likvoru. Istraživanja pomoću mikrodijalize upućuju da razine inzulina u CSFu ne koreliraju s razinama inzulina u moždanom parenhimu te da stoga ne bi mogle biti dobar biomarker lokalne inzulinske aktivnosti. [11] Rezultati studija o razini inzulina u CSFu su nekonzistentna. Jedna od prominentnijih studija pronalazi da razina CSF-inzulina u AB ima tendencija sniženja u odnosu na dobno odgovarajuće kontrole ali razlika nije bila statistički značajna. Jedna druga studija pronalazi da je CSF-inzulin snižen unatoč povišenom perifernom inzulinu u ranom i uznapredovalom stadiju AB. Istraživanja drugih nisu pokazala tu korelaciju ili čak povezuju povišene razine CSF-inzulina s lošijim kognitivnim ishodima u žena s povišenim fosfo- $\tau$  proteinom u likvoru. Studija koja ukazuje na disproporciju perifernog i centralnog inzulina u ranim stadijima AB upućuje na ulogu BBB regulaciji inzulinske signalizacije. [11]

### 2.2.1 Stanična patologija Alzheimerove bolesti

U AB dolazi do poremećaja različitih neuronalnih staničnih procesa koji postaju morfološki i molekularni supstrati čije je prepoznavanje moguće pomoću mikroskopa i metoda molekularne biologije. Ovdje ćemo se kratko osvrnuti na poremećaj homeostaze kalcija koji dovodi do

poremećaja procesa dugoročne potencijacije (LTP) i kasnije neuroapoptoze te na poremećaj inzulinske signalizacije. [11-15]

U moždanom tkivu bolesnika koji su za života bolovali od AB, u neuronima koji su optrećeni NFTovima, nađeno je da su razine slobodnog i proteinski vezanog kalcija povišene, kao što su povišene i razine kinaza ovisnih o kalciju i tkivne transglutaminaze. U ex vivo kulturi takvih neurona pokazano je da je poremećen proces dugoročne potencijacije, LTP. Post mortem, u neuronima bolesnika koji su bolovali od AB, ultramikroskopski su nađeni distrofični dendriti i smanjena sinaptogeneza. Također, u AB neuronima dolazi do apoptoze inducirane povišenom razinom kalcija. [12, 13]

Značaj takvih nalaza je u tome što je dobro regulirana homestaza/signalizacija kalcija bitna za dugoročnu potencijaciju (LTP) i sinaptogenezu te preživljenje stanica, a sva tri procesa su poremećena u patofiziologiji AB. LTP je osnova formiranja memorije koja se u neuronalnom tkivu kodira morfološki sinaptogenezom i vidi se kao osnovni simptom AB, poremećaj pamćenja. Apoptoza inducirana povišenim razinama kalcija često se susreće kao patofiziološki mehanizam u mozgu i dovodi se u vezu s pojačanim djelovanjem neurotransmitera glutamata (Glu) na N-metil-D-aspartatni receptor (NMDAR), tzv. glutamatnom ekscitotoksičnošću, čije pak djelovanje je osnova LTPa. Ovdje se jasno vidi da gubitak funkcije neurona (nemogućnost LTP i sinaptogeneze) vodi u gubitak neurona (apoptozu).

Osim što su povišene razine kalcija posljedica početnih patofizioloških zbivanja u AB [3, 13], one i doprinose razvoju AB patologije. Povišene razine kinase ovisne o kalcij/kalmodulinu nađene su u neuronima s parnim helikalnim filamentima, predstadijem NFTova, što upućuje na patogenetsku ulogu kalcija, koji inducira pojačanu ekspresiju kalcij/kalmodulin ovisne kinaze, u razvoju NFTova. [12]. Također, u moždanom tkivu u AB nađene su i povišene razine kalpaina-I, kalcijem aktivirane cisteinske protaze zadužene za inaktivaciju kinaza signalizacijskih sustava, npr. kalcineurina i cAMP ovisne proteinske kinaze, ali i komponenata inzulinskog signalizacijskog sustava [15], što daje još jednu dimenziju patogenetskom efektu kalcija u AB.

Neuroni u Alzheimerovoj bolesti pokazuju patološke promjene koje upućuju na razvoj neuronalne inzulinske rezistencije. Iako se u početku mislilo da je mozak inzulin-neovisni organ, istraživanja su pokazala rasprostranjenost IR ekspimiran u mozgu, a pojačano u olfaktornom bulbusu, hipokampusu, hipotalamusu i cerebralnom korteksu. Kolokalizirana ekspresija IR i inzulin-receptor supstrata 1 (IRS-1) upućuje da je inzulinski signalizacijski put aktivan u moždanom tkivu. [14]

Istraživanja na post-mortem tkivu bolesnika koji su za života bolovali od AB pokazala su da je gustoća IR na neuronima povećana u odnosu na dobno usklađene zdrave ispitanike, dok je tirozinkinazna aktivnost povećana; te da obe varijable opadaju s dobi u zdravih kontrola. [14] Također, novija istraživanja [15] upućuju da su u post-mortem tkivu AB bolesnika značajno smanjene aktivnosti inzulinskog signalizacijskog puta, mjereno prema normaliziranoj apsolutnoj vrijednosti i omjeru fosforiliranih/nefosforiliranih glasnika tog puta (IR, IRS-1, PI3K, PDK1, Akt, GSK3- $\alpha/\beta$ ). Poremećena je također ex vivo stimulacija IR i receptora za inzulinu sličan čimbenik rasta 1 (IGF-IR) na AB neuronima, što govori u prilog nastanku inzulinske rezistencije u mozgu bolesnika s AB. Slično perifernoj inzulinskoj rezistenciji, unatoč regulaciji IR na više (u odnosu na dobno usklađene kontrole), proboj signala u unutarstanični odjeljak je smanjen.

U moždanom tkivu AB bolesnika nađen je i 50% smanjeni kapacitet razgradnje enzima koji razgrađuje inzulin (IDE) u odnosu na dobno usklađene zdrave ispitanike, dok je razgradnja inzulina smanjena samo 30%. Obzirom da IDE razgrađuje i druge proteine, u prvom redu A $\beta$ , smanjeni kapacitet ovog enzima odgovoran je i za smanjenu razgradnju A $\beta$ . [14]

Uloga inzulina u mozgu je višestruka. Inzulin je glavni regulator enzima glikolitičkog puta i enzima oksidativne fosforilacije te je odgovoran za preživljavanje i sinaptogenu funkciju neurona. Paralelno tome, u mozgu eksperimentalnim modelima AB, ali i u moždanom tkivu AB bolesnika post-mortem uočeno je smanjenje ključnih enzima glikolitičkog puta (npr. heksokinaze, glukoza-6-fosfat dehidrogenaze), piruvat dehidrogenaze (PDH),  $\alpha$ -ketoglutarat dehidrogenaze (enzim ciklusa limunske kiseline), acetilkolin transferaze i smanjenje razina fruktoze-6-fosfata, acetilkolina i ATP-a, metaboličkih produkata navedenih biokemijskih puteva.

Ukoliko je glikolitički i PDH put suprimiran, dolazi do slabije proizvodnje piruvata i acetyl-CoA, supstrata za kasnije procese proizvodnje energije - oksidativnu fosforilaciju koja se odvija u mitohondrijima. Također, acetyl-CoA je direktni prekursor proizvodnje acetilkolina, bitnog neurotransmitera u hipokampalnim moždanim krugovima, što uz smanjenu aktivnost acetilkolin transferaza dovodi do smanjenja acetilkolina u neuronima pogođenim neurodegeneracijom AB tipa. Acetyl-CoA je i prekursor sinteze kolesterola, ali istraživanja nisu našla jasnu promjenu kolesterolonog sastava moždanih membrana. Nadalje, smanjena proizvodnja fruktoze-6-fosfata, ključnog izvora za proizvodnju UDP-N-acetilglukozamina dovodi do smanjenja O-glikozilacije sa GlcNAc (N-acetilglukozamin), procesom koji izgleda da je ključan u regulaciji aktivnosti mnogih nukleocitosolnih proteina, uključujući IR i  $\tau$ -protein. Smanjena O-GlcNAc glikozilacija je potvrđena u postmortem uzorcima moždanog tkiva AB bolesnika i negativno korelirana s razinama fosfo- $\tau$  proteina (fosforiranog na različitim mjestima).[15]

Jedan od načina nadoknade supstrata za oksidativnu fosforilaciju (OXFOS) je korištenje glukoplastičnih aminokiselina (aminokiselina s 6 C atoma), poput glutamata. Povećanje deaminacije glutamata povećava razine  $\text{NH}_3$  u mitohondriju gdje on djeluje kao direktni inhibitor raznih enzima ciklusa limunske kiseline i još više pogoršava hipoenergozu neurona. Vjerojatno, prisutnost glutamata, ili smanjenje glukoze u moždanom tkivu (putem smanjenog prijelaza kroz BBB u energetske potrebite situacijama kad je glutamata u izobilju) ima utjecaj i na ranije spomenutu glutamatnu ekscitotoksičnost. [14] Drugi mehanizam je pojačano korištenje  $\beta$ -oksidacije, tipa staničnog metabolizma koji je fiziološki najzastupljeniji u astrocitima.

Hipoenergoza neurona vidljiva je mjerenjem ATP razina u AB neuronima. Na početku bolesti razine ATP-a padaju 50%, ali se vrlo brzo kompenziraju na 80% (životnjski modeli), kako bi kroz daljnji tijek bolesti samo padali. Također, ukupne razine stanične energije mjerene u vidu kreatin-fosfata su snižene.

Glavni stanični finalni visokoenergetski spoj je ATP i pokreće većinu staničnih procesa, npr. sintezu proteina, sortiranje, transport i razgradnju proteina; održavanje ionske homeostaze (kalcij, natrij/kalij, lizosomalni/ER pH); fosforilaciju razni komponenti signalnih puteva (kinaza) te ATP-ovisno chaperoniranje proteina (promovira ispravnu konformaciju proteina vođenjem proteina kroz ispravne konformacijske međukorake do poželjene konformacije). Stanična deplecija ATP-a sigurno ima različite značajne posljedice po stanicu, npr. poremećena sekretorna aktivnost stanice morfološki je vidljiva kao atrofija Glogijevog aparata (GA) i endoplazmatskog retikula (ER) u AD neuronima. [14] Neke komponente signalnih puteva, npr.  $\text{PK}^{\text{erk36}}$  i  $\text{PK}^{\text{erk40}}$ , su kinaze direktno ovisne o dostupnosti ATPa. Ove specifične kinaze imaju ulogu u fosforiliranju  $\tau$ -proteina, a regulatorno su vezane za MAPK put, koji je opet pod kontrolom IR. [4].

Mitohondriji (MH) u AB nisu samo funkcionalno poremećeni (smanjena proizvodnja ATP). Na genetskoj razini mtDNA ima povećani broj mutacija i smanjeni broj kopija u neuronima bolesnika s AB. Na morfološkoj razini, mitohondriji su aberantno akumulirani, smanjene veličine i razlomljene unutrašnje membrane (kriste). [16] Mitohondrijska disfunkcija sama po sebi ima mjerljive citopatološke posljedice. U uzorcima moždanog tkiva u AB bolesnika nađene su povećane razine reaktivnih kisikovih i dušikovih radikala (ROS i RNS), peroksidirani lipidi i smanjene razine antioksidansa poput glutationa (GSH). Ovi nalazi upućuju da je u AB poremećena kontrola kvalitete mitohondrija. To je proces selektivne autofagije - mitofagije kojim se osigurava primjerena (niska) proizvodnja ROS kako ne bi došlo do oštećenja DNA. Također, to je posebno orkestriran proces kako ne bi došlo do oslobađanja visokih razina kalcija iz mitohondrijskog unutarnjeg miljea.



Mitofagija i kontrola MH kvalitete su proces nadograđen na fiziološku dinamiku mitohondrijske mreže. Mitohondriji su organele koje se mogu fuzionirati jedne s drugima ili biti relativno zasebne u fisioniranom stanju. Fuzionirani mitohondriji proizvode efikasnije ATP pa su preferirana morfologija u stanjima metaboličkog stresa kad je dostupnost energenata niska, npr. u stanjima inzulinske rezistencije kao u AB. Međutim, isto to stanje proizvodi efikasnije i ROS, što potiče mitohondrije da prijeđu u fisioniranu morfologiju. [11] Pretpostavlja se da je u AB narušena i ova fiziološka dinamika što može biti ishodišni čvor patogeneze AB ili pak jedan od onih koji su istovremeno posljedica nekih zbivanja, a kasnije i uzrok tih istih zbivanja : proizvodnje ROS, inzulinske rezistencije, inzulinskom rezistencijom izazvane hipoenergoze stanica itd. Zasad je poznato da je normalna mitohondrijska dinamika fiziološki mehanizam centralno-periferne regulacije fiziološke inzulinske senzitivnosti putem AgRP i POMC neurona te da poremećaj MH dinamike dovodi do periferne inzulinske rezistencije. [11]

Patologija AB, a osobito stanična patologija, kompleksna je tema koja se može promatrati i regionalno (lokalizacija promjene u moždanom tkivu, stanični tip/podtip gdje se događa promjena) i na različitim razinama (mRNA, količina proteinskog produkta, fosforilirana frakcija proteina od interesa, gustoća receptor-proteina na membrani) za mnoge signalizacijske i neurotransmitterske sustave (npr. dopaminski sustav mozga u AB, [17]). Izdašan prikaz te tematike na taj način prelazi okvire ovog poglavlja i rada. Ovdje su prikazane samo najvažnije promjene koje imaju potvrđeni značaja za patogenezu AB koja će biti opisana u narednom tekstu.

## 2.4 Patogeneza i liječenje Alzheimerove bolesti

Patogeneza AB i dalje je samo dijelom razjašnjena obzirom da dan-danas nije jasno prepoznat ishodišni patogenetski događaj najučestalijeg sporadičnog oblika te neurodegenerativne bolesti. Ipak, pojašnjene su mnoge patofiziološke veze između patohistoloških nalaza i simptoma AB te prepoznate farmakološke mete čija manipulacija može utjecati na klinički tijek bolesti, premda ove spoznaje nisu praćene razvojem novih lijekova koji doista mijenjaju tijek bolesti. U ovom odjeljku kratko su iznesene osnovne teorije nastanka i razvoja AB te vezano uz njih odobrenu simptomatsku (i onu koja je tek u razvoju) terapiju AB za ublažavanje kognitivnih/bihevioralnih simptoma.

### 2.4.1 Kolinergička hipoteza Alzheimerove bolesti i antikolinesterazni lijekovi

Potaknuti činjenicom da se u sAB izgubi se oko 75% kolinergičkih neurona znanstvenici su pretpostavljali da su gubitak kolinergičke transmisije i kolinergička deaferencijacija osnovni uzrok ravoja AB. Uzrok propadanja kolinergičkih neurona (smještenih u najviše u hipokampusu) povezuje se s manjkom sinteze acetilkolina kako je ranije navedeno, kao i degeneraciji bazalnih stanica prednjeg mozga koje pomažu u formiranju hipokampusa, neuralnog kruga odgovornog za formiranje nove memorije. U dopinos tome govori umjerena učinkovitost antikolinesteraznih lijekova na olakšanje simptoma AB poput zaboravljanja te činjenica da su AB bolesnici osjetljiviji na antikolinergičke učinke drugih lijekova u odnosu na kontrolnu populaciju. Ipak, dugoročno gledano, ti lijekovi nisu efikasni u spriječavanju progresije AB, niti djeluju na sve AB bolesnike. [23]

Odobreni lijekovi indicirani za simptomatsku terapiju stadija rane do razvijene AB u klasi antikolinesteraznih lijekova su donepezil, rivastigmin i galantamin. Djeluju tako da inhibiraju acetilkolin esterazu (AChE), enzim koji razgrađuje acetilkolin u sinapsi. Njihovo glavno djelovanje je na poboljšanje pamćenja, ali postoje indikacije da smanjuju bihevioralne smetnje i olakšavaju dnevno funkcioniranje. Nema dokaza da je neki od lijekova iz skupine superiorniji u odnosu na druge lijekove. Donepezil je najispitivaniji lijek iz skupine i u istraživanju u trajanju od 15 tjedana, AB bolesnici su polučili 1.0-1.3 bodova bolji rezultat na MMSE ocjenskoj ljestvici u odnosu na zdrave ispitanike (2.5-3.1 na ADAS-Cog ljestvici). Taj je učinak vrlo blag, uzevši u obzir da se rezultat zdravih ispitanika na obe ocjenske ljestvice također smanjio u razdoblju od 15 tjedana.

Periferni kolinergični efekti poput mišićnih grčeva i nadražaja peristaltike česte su ali dobro tolerirane nuspojave inhibitora AChE, osobito ako su lijekovi pažljivo uvedeni u terapiju. Kontraindicirani su u bolesnika sa srčanim konduktivnim defektima i bradiaritmijama jer mogu izazvati srčani blok. Takrin je stariji lijek iz iste skupine ali se više ne koristi zbog izražene hepatotoksičnosti. Postoje dokazi da prekid terapije donepezilom u naprednom stadiju AB dovodi do povećane vjerojatnosti hospitalizacije bolesnika u slijedećih 12 mjeseci.[1]

### 2.4.2 Glutamatna ekscitotoksičnost i antagonist NMDA receptora (memantin)

Poremećena regulacija homeostaze kalcija u neuronima bitan je patocelularni nalaz u AB bolesnika. Kalcij je bitan za mnoge stanične procese, a njegov neregulirani ulazak u stanicu putem

glutamatnih NMDA receptora (NMDR) jedan je od načina kako porasta njegove citosolne koncentracije. Poremećaj NMDAR povezuje se s poremećenom LPT u AB. Koji je ishodnišni uzrok poremećene funkcije NMDAR, je li to direktna posljedica glutamatne ekscitotoksičnosti (kao što je viđeno u ostalim neurološkim obolijenjima) te kako su metabolizam glutamata i njegova funkcija u tom slučaju narušeni, ostaju otvorena pitanja. [12, 13]

NMDAR su ionotropni receptori za glutamat i glicin. Imaju alosteričko modulatorno vezno mjesto na koje se vežu različite endogene i egzogene supstance. Oni su neselektivni kationski ionski kanali koji dozvoljavaju influks kalcija i natrija u stanicu i efluks kalija iz stanice jednom kad je stanica dovoljno depolarizirana. Lokalizirani su intrasinaptički ili ekstrasinaptički i čini se da to ključno definira posljedice njihove aktivacije. [24] Intrasinaptički NMDAR pomažu LTP, a ekstrasinaptički je odmažu. Ekstrasinaptički NMDAR se kompleksiraju s TRPM4 citosolnim proteinom i dovode do poremećene funkcije i strukturalne dezintegracije mitohondrija, što djeluje sinergistički uz povećane koncentracije citoplazmatskog kalcija.

Značaj ove hipoteze nastanka AB je u tome da je memantin, antagonist NMDAR, odobreni lijek indiciran za stadije razvijene i teške AB. Time je dokazano da je opisana patofiziologija značajna u patogenezi AB, ali slično kao i kod antikolinesteraznih lijekova, memantin ne pokazuje mogućnost da mijenja tijek bolesti, što upućuje da glutamatna ekscitotoksičnost nije presudna za razvoj AB.

Memantin djeluje kao nekompetitivni agonist NMDAR koji sterički ometa protok iona kroz centralnu poru kanala. Bazalna aktivnost NMDAR mora biti očuvana jer ima ulogu održavanju sinapsi stoga je ključno da je afinitet memantina za NMDAR slab. Memantin se veže na svoje vezno mjesto samo ako protok iona traje dugo da dodje do njegovog vezivanja, čime se osigurava da je brza signalizacija putem NMDAR očuvana. Klinički učinak memantina se odnosi na ublažavanje pada kognitivnih sposobnosti i bihevioralnih simptoma AB. Njegov učinak je slab, ali statistički značajan. Postoje indikacije da je korisno upotrebljavati ga u dualnoj terapiji uz antikolinesterazni lijek. Glavne nuspojave memantina su konstipacija i glavobolja. [1]

### 2.4.3 Amiloidna hipoteza i metabolizam amiloidnog prekursorog proteina

Amiloidna hipoteza je središnja hipoteza patogeneze AB. Ona postulira da APP svojim pojačanim ili promjenjenim metabolizmom pojačano stvara problematične proteine  $A\beta_{40}$  i  $A\beta_{42}$  koji ostvaruju toksični učinak na neuron. Dok je to zasigurno točno za etiopatogenezu fAB, to se ne odnosi na sAB u kojem ne postoje jasno definirani genetski čimbenici koji utječu izravno na APP i njegov metabolizam i time na povećanu produkciju  $A\beta$ . Danas se smatra da niz drugih čimbenika

utječe na promjenu regulacij metabolizma APP što dovodi do začaranog kruga koji pozitivnom povratnom spregom dalje pogoršava regulaciju homeostaze  $A\beta$  i  $\tau$ -proteina te omogućuju da  $A\beta$  i fosfo- $\tau$  protein rastu u koncentraciji i ispoljavaju svoje toksične učinke na neurone. Gledano na taj način amiloidna hipoteza je više zajednički završni tijek brojnih procesa koji djeluju u AB općenito, a ne isti etiopatogenetski čimbenik različitih oblika AB.

Protein APP je integralni membranski protein kodiran na kromosomu 21, duljine 290kbp. Ima 18 egzona i ovisno o izoformi sadrži od 639 do 770 aminokiselinskih ostataka. Taj protein je visoko očuvan i prisutan u mnogim vrstama stanica. U neuronima je koncentriran oko sinaptičke pukotine i ima različite uloge od regulacije sinaptogeneze (npr. potencira djelovanje neurotrofičnih čimbenika transdukcijom signala na IR) do transporta željeza. Sadrži visoko glikoziliranu ekstracelularnu N-terminalnu domenu i kratku intracelularnu C-terminalnu domenu. Proteoliza APP-a ovisno o mjestu djelovanja proteaza kao jedan od produkata daje 37-49 aminokiselina dugačak polipeptid,  $\beta$ -amiloid. Amiloidogena regija APP-a je transmembranska regija i najmanje je evolucijski očuvan dio proteina.

U razgradnji APP sudjeluju tri oblika sekretaza,  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ - sekretaza. U fiziološkim uvjetima dominantnu ulogu ima  $\alpha$ -sekretaza koja cijepa APP u amiloidogenoj regiji i daje dva lako razgrađiva fragmenta, N-terminalni APP $\alpha$  i C-terminalni C88. Ukoliko je aktivnost  $\alpha$ -sekretaze smanjena, APP proteoliza teče po amiloidogenom putu. Aktiviraju se  $\beta$ - i  $\gamma$ -sekretaza.  $\beta$ -sekretaza djeluje izvanstanično i odcjepljuje N-terminalnu domenu, a  $\gamma$ -sekretaza unutar amiloidogene regije, slično  $\alpha$ -sekretazi, cijepa ostatak APP-a na  $\beta$ -amiloid i kraći C-fragment koji se regularno razgrađuje unutarstaničnom kaspazom.

$\gamma$ -sekretaza enzimska je domena većeg proteinskog kompleksa koji ima regulatornu domenu kodiranu genima presenilin 1 i presenilin 2. Mutacije u tim genima, kao i mutacija u genu za APP ili duplikacija gena za APP (u npr. Downovom sindromu) uzrokuju povećanu aktivnost  $\gamma$ -sekretaze, smanjenu aktivnost  $\alpha$ -sekretaze ili povećanje količine razgradnih produkata, pa time i  $A\beta$ . Te mutacije su glavni uzrok nastanka fAB. Mutacije u presenilin genima imaju i druge utjecaje na (anti)apoptotske mehanizme mimo utjecaja na  $A\beta$  metabolizam. [23]

Ovisno o egzaktnom mjestu djelovanja  $\beta$ - i  $\gamma$ -sekretaze dobivamo niz  $A\beta$  polipeptida različitih duljina.  $A\beta$  proteini su bogati takozvanim  $\beta$ -nabranim pločama i skloni su polimerizaciji u fibrile (osobito  $A\beta_{42}$ ), koji su pak skloni agregaciji u vanstaničnom mediju, što se tada naziva  $\beta$ -amiloid plakovima i patohistološki je znak AB. [23]

Iako se A $\beta$  luči izvanstanično iz astrocitnih i neuronskih membrani, on može ući u stanicu na više načina: endocitozom, kroz staničnu poru uz pomoć perforina i uz pomoć receptora za produkte neenzimatske glikacije (AGE, RAGE) (taj put je rezerviran za A $\beta_{42}$ ). Obe vrste toksičnog amiloida, A $\beta_{40}$  i A $\beta_{42}$  kao glavni put ulaska koriste endocitotski mehanizam, pri tome je endocitoza A $\beta_{42}$  dva puta efikasnija od endocitoze A $\beta_{40}$ . [17]

A $\beta$  toksičan je u mnogim svojim formama. Amiloidni plakovi u sinapsama zasigurno dovode do propadanja sinapsi, ali smatra se da A $\beta$  u drugim formama (fibrili i monomeri), prisutnim puno ranije u mozgu, ranije dovodi do neurodegeneracije. Istraživanje na post-mortem moždanom tkivu bolesnika s AB, DMT2 i AB+DMT2 pokazalo je da, iako je zahvaćenost mozga A $\beta$  plakovima u AB i AB+DMT2 bolesnika jednaka (uz iznimku amiloidne angiopatije), molekularno patološki supstrati inzulinske signalizacije u mozgu prisutni su u različitom stupnju. To upućuje da A $\beta$  plakovi *per se* nisu ključni za patogenezu AB jer ne koreliraju s težinom patomolekularnih promjena koje imaju izravne veze s poremećajem iskorištenja glukoze u stanici, već da bi značajniju ulogu u toksičnim procesima mogli imati drugi oblici - A $\beta$  monomeri i oligomeri. Slično je pokazano i za fosfo- $\tau$  protein i NFTove. [15]

In vitro istraživanja pokazala su da A $\beta_{42}$  oligomeri (fibrile) ometaju homeostazu kalcija, podižu razinu ROS, induciraju  $\tau$ -protein hiperfosforilaciju te utječu na mitohondrijsku morfologiju i apoptozu. [23] In vitro, unutarstanični A $\beta$  u neuronima izaziva neuronalnu smrt unutar 24h. Daljnjim istraživanjem uočene su razne molekularne mete A $\beta$  monomera i oligomera. Za ovaj rad bitno je istaknuti interakciju A $\beta$  s IDE, IR i drugim komponentama inzulinskog signalizacijskog sustava.

A $\beta$  se veže na IR (iako smanjenim afinitetom nego inzulin) i ovisno o dozi ometa inzulinsku signalizaciju te potiče internalizaciju i nedostupnost IR. IDE je glavni enzim za razgradnju inzulina u izvanstaničnom matriksu, ali isto i za A $\beta$ . Čini se da IDE favorizira inzulin i time omogućuje akumulaciju A $\beta$ . [29] Također, ADDL (eng.  $\beta$ -amiloid derived diffusible ligands), difuzibilni ligandi nastali od A $\beta$  uzrokuju snažnu regulaciju IR na niže, a unutarstanični A $\beta$  ometa interakciju PDK1 i Akt, čime sprječava aktivaciju kinaze Akt. [15]

$\tau$ -protein, drugi važni protein u patogenezi AB, je stabilizacijski protein mikrotubula. Ukoliko je hiperfosforiliran on se više ne može vezati za mikrotubul i gubi svoju stabilizacijsku ulogu. Mikrotubuli se raspadaju što ugrožava aksonalni transport i funkciju neurona. To dovodi do oksidacijskog stresa, poremećene funkcije mitohondrija i stanične smrti. Hiperfosforilirani  $\tau$ -protein također je sklon autoagraciji u unutarstanične NFTove, s intermedijarnim stadijem parnih

helikalnih filamenata. Glavni fosforilacijski enzim koji djeluje na  $\tau$  je GSK-3 $\beta$ ,  $\beta$ -izoforma glikogen sintaza kinaza 3, jedna od značajnijih signalizacijskih kinaza u putu inzulinske signalizacije. Kad je inzulinski put aktivan, GSK3- $\beta$  je fosforilirana i smanjene aktivnosti. Kad je pak defosforilirana, povećane je aktivnosti što dovodi do hiperfosforilacije  $\tau$ -proteina. [23] U regulaciji  $\tau$ -proteina uključene su i ostale kinaze (PK<sup>erk36</sup>, PK<sup>er40</sup>, GSK3- $\alpha$ , Akt) i fosfataze, od kojih su neke i spomenute ranije. Sve one imaju izravnu ili neizravnu vezu s inzulinskom signalizacijskom kaskadom. [14, 15] Također,  $\tau$ -protein je podložan O-GlcNAc glikozilaciji, što stvara dodatnu spregu između inzulinske kaskade, glikolitičkog puta i metabolizma  $\tau$ -proteina.

Postoje mutacije  $\tau$ -proteina koje dovode do razvoja NFTova i demencije u sklopu demencije tipa FTD, ali ne dovode do promjena i kliničke slike kakva se vidi u AB. To upućuje da je hiperfosforilacija  $\tau$ -proteina nije glavni ishodišni događaj patogeneze AB, nego da je primarno posljedica nekog ranijeg zbivanja u AB ili paralelni proces u neurodegeneraciji. [23] U prilog tome govori i činjenica da se NFT patologija počinje događati tek u simptomatskoj fazi AB (a A $\beta$  patologija desetljeće prije) te korelira s težinom simptoma AB.

Slično A $\beta$ , hiperfosforilirani  $\tau$ -protein djeluje i unutarstanično i izvanstanično. Hiperfosforilirani  $\tau$ -protein također ima niz unutarstaničnih meta [23], ali najbitnija je činjenica da onemogućuje mikrotubularni transport.

APOE $\epsilon$ 4 alel gena za apolipoprotein E rizični je faktor za razvoj AB. Istraživanja upućuju na interakciju APOE $\epsilon$ 4 alela i A $\beta$  i  $\tau$ -proteina [25] kao i na interferiranje s IR i inzulinskom signalizacijskom kaskadom [30]. Naime, APOE $\epsilon$ 4 tip apolipoproteina se brzo veže za A $\beta$  i služi kako centar nukleacije u formiranju A $\beta$  monofibrila, što nije slučaj za APOE $\epsilon$ 3 i APOE $\epsilon$ 2 alele. Također APOE $\epsilon$ 2 i APOE $\epsilon$ 3 alelni apolipoproteini vežu se za nefosforilirani  $\tau$ -protein čime ga štite od fosforilacije, za razliku od APOE $\epsilon$ 4 izoforme koja ne pokazuje afinitet za  $\tau$ -protein.

#### 2.4.3.1 Lijekovi koji utječu na metabolizam APP

Novost na tržištu lijekova za Alzheimer je adukanumab, monoklonalno protutijelo na A $\beta$  kompanije Biogen. Registriran je se pod nazivom Aduhelm i na tržištu je prisutan od veljače 2020. godine kada ga je Američka agencija za hranu i lijekove (FDA) uvjetno odobrila za preklinički stadij AB unutar sheme ubrzanog odobravanja lijekova (*eng. accelerated approval programme*) na temelju toga što uspješno uklanja A $\beta$  plakove na amiloid PET-skenu mozga, a randomizirane kliničke (RCT) studije pokazuju blago smanjenje opadanja kognitivnih funkcija u APOE $\epsilon$ 4

pozitivnih AB bolesnika. Mjereno CDR-SB ljestvicom, u tako liječenih bolesnika kognitivno propadanje usporava se za 10%.

Uz lijek Aduhelm vezani su kontroverzni stavovi o njegovoj učinkovitosti jer prije nego što je uvjetno pušten na tržište, dvije velike kliničke studije faze 3 (ENGAGE i EMERGE studije) su prekinute jer su predrezultatne analize (*eng. futility studies*) pokazale da se vjerojatno neće moći postići prethodno postavljeni primarni ishodi u vidu kliničkog poboljšanja na CDR-SB ljestvici. Ipak, kako se dio tih studija faze 3 nastavio, završna analiza pokazala je da je studija EMERGE dosegla svoj primarni ishod, a studija ENGAGE ga je dosegla u podskupini bolesnika koji su primali visoke doze lijeka. Također, lošiji ishod studije ENGAGE bio je uzrokovan većim udjelom bolesnika s brzoprogresivnim tipom AB. Na temelju tih novih rezultata i posredovanja udruge pacijenata oboljelih od AB (Alzheimer Association), FDA je uvjetno odobrila izlazak Aduhelma na tržište na 5 godina.

Mnogi kritičari ističu da su takvi rezultati kliničkih studija odraz uspješne statističke manipulacije rezultatima u vidu naknadnog uključivanja ispitanika u klinički pokus, odsljepljivanja studija nakon objave zaključaka predrezultatnih studija, činjenice da je dio podpopulacije bolesnika koji su primali najviše doze lijeka ispio iz studije zbog nuspojave moždanog edema i slično [26]. S tim mišljenjem se slaže i većina investitora jer su se dionice Biogena na njujorkškoj burzi vratile na razine iz 2019. godine ubrzo nakon objavljivanja detalja kliničkih studija.

U svakom slučaju, Aduhelm je prvi lijek baziran na amiloidnoj hipotezi AB koji se približio odobravanju na tržištu i potaknuo je ponovno pokretanje kliničkih studija baziranih na istom konceptu u drugim farmaceutskim firmama. [27] Međutim, je li Aduhelm zaista učinkovit lijek koji mijenja ishod i progresiju bolesti vjerojatno će pokazati tek nova klinička studija i dugoročnije praćenje bolesnika.

#### 2.4.4 Ostali terapijski pristupi u liječenju Alzheimerove bolesti

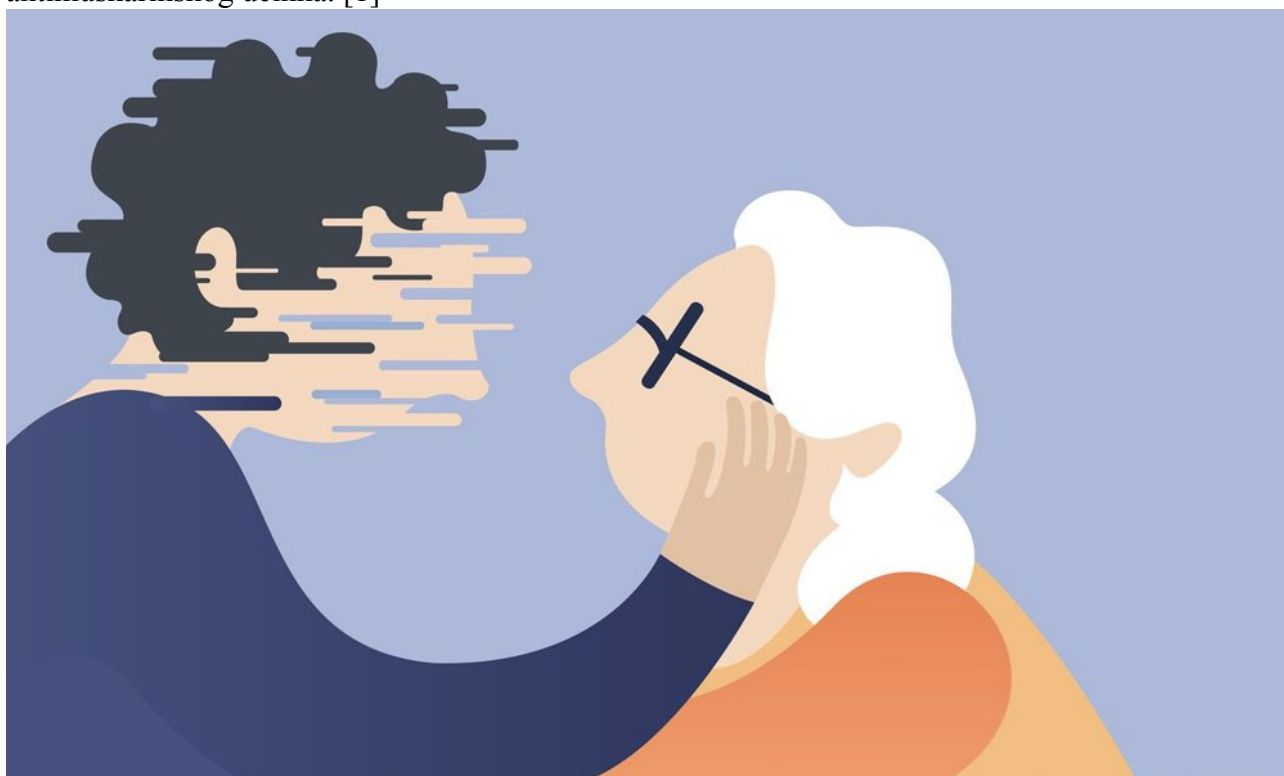
Također, postoje i drugi farmakološki i nefarmakološki pokušaji liječenja AD. Detalji o svim pokušajima liječenja Alzheimerera se mogu naći pregledno navedeni i s citiranom znanstvenom literaturom na webstranici [alzforum.org](http://alzforum.org).

Tema ovog diplomskog rada detaljnije se bavi korištenjem intranazalnog inzulina u pokušaju prekida inzulinske rezistencije za koju se smatra da je bitan etiopatogenetski činitelj nastanka AD. Istraživanje intranazalnog inzulina je u fazi 3 kliničkih studija.

U biotehnološkim vijestima trenutno prominiraju druga tri anti-Alzheimer lijeka koji su u kliničkim studijama: simufilam (tvrtke Cassava, povezane s NIH) i 2-73 (generičkog naziva blarcamesin, tvrtke Anavax) te posiphen (tvrtke Annovis). Simufilam, trenutno najperspektivniji lijek, je mala molekula čija je meta membranski protein filamin A, uključen u početak stvaranja amiloidnih fibrila i  $\tau$ -proteinskih helikalnih filamenata. [28] U kliničkoj studiji, simufilam pokazuje snažno djelovanje na 11 biomarkera Alzheimerove bolesti i nakon 6 mjeseci tj. 9 mjeseci diže ADAS-Cog rezultat za 1.3 tj. za 3 boda iznad početne vrijednosti ADAS-Cog score-a terapijske skupine, a ne kontrolne skupine; kako je nedavno objavljeno na webstranici tvrtke Cassava (cassavasciences.com).

#### 2.4.5 Simptomatsko liječenje Alzheimerove bolesti

Kako se u razvoju AB javljaju bihevioralni problemi u vidu paranoidno-deluzivnog ponašanja, depresija i agitiranost, za kupiranje takvih simptoma koriste se *off-label* antipsihotici, antidepresivi i anksiolitici. Za bihevioralne probleme najviše dokaza upućuje na učinkovitost niskih doza risperidona, dok su tipični anksiolitici (klorpromazin, haloperidol, flufenazin, thioridazin, trifluoperazin) kontraindicirani zbog antimuskarinskog djelovanja. Antidepresivi i anksiolitici nisu pretjerano efikasni u razrješavanju depresivnih i anksioznih simptoma, ali čini se da psihološka terapija pomaže. Tricikličke antidepresive treba izbjegavati, posebno zbog njihovog antimuskarinskog učinka. [1]



**Slika 1.** Umjetnički doživljaj kognitivnih problema Alzheimerove bolesti. Preuzeto s [www.roche.ch](http://www.roche.ch) (21.8.2021.)



### 3 Inzulinska signalizacija u Alzheimerovoj bolesti

Inzulin je jedan od glavnih metaboličkih hormona uz glukagon, kortizol, kateholamine i hormon rasta. Njegova glavna uloga na periferiji je olakšana difuzija glukoze u stanicu posredstvom povećanja gustoće nosača za glukozu tip 4 (GLUT4) na staničnim membranama. Inzulin snižava koncentraciju glukoze u krvi, ali i regulira brojne metaboličke puteve iskorištenja glukoze, te rast, razvoj i preživljavanje stanica. U ovome poglavlju opisane su komponente inzulinskog signalizacijskog puta, prepoznate uloge inzulinske signalizacije u mozgu i pojam inzulinske rezistencije u mozgu (IRBS, engl. *insulin resistant brain state*) te njenog utjecaja na kognitivne procese u ljudi i životinjskih modela. IRBS je važan za noviju hipotezu nastanka AB koja postavlja smanjeno iskorištenje glukoze i poremećaj inzulina u mozgu kao središnji oslonac patogeneze AB, za razliku od amiloidne hipoteze koja postavlja A $\beta$  toksičnost ranije u etiopatogenetskom lancu događaja nego hipometabolizam glukoze.[32]

Poremećaji inzulinskog sustava u AB važni su za razumijevanje primjene intranazalnog inzulina kao novog terapijskog pristupa u liječenju ove bolesti, a detaljnije su istraživani u životinjskim modelima AB uz praćenje učinka na kognitivne funkcije, obzirom da je u ljudi to moguće jedino post mortem u in vitro analizama moždanog tkiva. Stoga je važno navesti osnovne životinjske modele koji oponašaju AB u ljudi, posebno njen sporadičan oblik, te način procjene kognitivnih sposobnosti u tih modela čija je translacija važna za planiranje i interpretaciju rezultata kliničkih ispitivanja u bolesnika s AB.

#### 3.1 Životinjski modeli za Alzheimerovu bolest i procjena njihovih kognitivnih sposobnosti

Prvi razvijeni životinjski modeli AB su bili transgenični miševi koji su bili transfecirani s švedskom mutacijom APPa (KM670/671NL), tzv. Tg2576 miševi koji razvijaju simptome AB bolesti u dobi od 6-12 mjeseci, a oko 12 mjeseci razvijaju  $\beta$ -amiloidne plakove, ali ne razvija NFTove niti neuronalnu apoptozu. Kasnije su razvijeni i drugi transgenični modeli AB s mutacijom drugih gena povezanih nastankom A $\beta$  i/ili  $\tau$ -proteina (ili kombinacijom mutacije više gena, npr. 3xTg mišji model), ali je problem ovakvih transgeničnih modela da oponašaju familijalni, a ne sporadičan oblik AB, koji je daleko najčešći u populaciji AB bolesnika.

Najšire korišteni modeli koji oponašaju sAB su icv-STZ štakorski model te A $\beta$  mišji model.

HFD (eng. *high fat diet*) model također izaziva simptome AB i odlaganje amiloidnih plakova, ali je opterećen značajnom perifernom patologijom i prvenstveno služi proučavanju diferencijalnih utjecaja prehrane bogate mastima na IRBS. Mišji modeli sa selektivnim izbacivanjem gena (*knock-out*), za IR ili IRS-1/2, bilo da je on ograničen na neurone, astrocite, neurone i astrocite (tzv. NIRKO miševi), ili neku neuronalnu podpopulaciju ili moždanu regiju, također su od velike pomoći u rasvjetljavanju patofizioloških mehanizama AB i IRBS. Aβ mišji model dobiva se primjenom Aβ<sub>42</sub> direktno u središnji živčani sustav (SŽS), bilo da je to intrakortikalna injekcija ili intracerebroventrikularna injekcija/infuzija. Radi se novijem modelu koji je za sada manje korišten od icv-STZ modela [11, 17]

Sa stajališta razvoja IRBS, najzanimljiviji je icv-STZ model, gdje se štakorima intracerebroventrikularno jednom ili dva puta primijenjuje injekcija streptozotocina u dozi od 1-3 mg/kg. Takav tretman dovodi do smanjenja metabolizma glukoze u 17 od 35 moždanih područja, također smanjuje koncentracije ATPa i fosfokreatina. Nadalje, u štakorima tretiranim s icv-STZ primjećen je značajan poremećaj inzulinskog signalizacijskog puta načelno mjeren koncentracijom različitih proteina tog signalizacijskog puta, te omjerima ukupnih i fosforiliranih oblika proteina (uključivo i pojedinih enzima) u različitim moždanim regijama (prvenstveno frontalnom korteksu i hipokampusu). U štakora nakon tog tretmana dolazi do poremećaja radne i referentne memorije, što upućuje na razvoj kognitivnog deficita. Kasnije u tijeku bolesti, u životinjskih modela dolazi do nakupljanja Aβ i fosfo-τ-proteina.

Rijetka istraživanja koja su se bavila istraživanjem vremenskog tijeka bolesti u icv-STZ tretiranih štakora, pokazala su da razvoj patoloških promjena tri faze: prvu akutnu s biokemijskim poremećajima u prvom mjesecu poslije tretmana, drugu fazu kao pokušaj kompenzacije stanja u trajanju od 3-6 mjeseci poslije tretmana i konačno treću dekompenzacijsku fazu 6-9 mjeseci poslije tretmana u kojoj slijedi sporo pogoršanje bolesti i pozitivan AB-sličan patohistološki nalaz. Klinička slika toksičnosti icv-STZ-a je progresivna u vremenu i prostoru te ireverzibilna. Gledano patomorfološki, patofiziološki i klinički tako tretirani štakori razvijaju veći broj simptoma karakterističnih za AB u ljudi te su predloženi kao reprezentativni životinjski model sAB, barem onog endofenotipa koji se prezentira s inzulinskom rezistencijom u mozgu . [31,32]

Vitalna grana istraživanja patogeneze različitih bolesti bazira se na proučavanju bioloških promjena u organizmima životinjskih modela te bolesti. Tako i ovdje, u istraživanju AB, istraživači pokušavaju otkriti na koji način toksičnost STZ inducira AB simptomatologiju.

Streptozotocin je prvo upoznat kao antibiotik koji se kasnije u humanoj medicini počeo koristiti

za liječenje inzulinoma, tumora endokrine gušterače koji luči inzulin. STZ je spoj temeljen na nitrozaminskoj strukturi (glukoza-N-nitrozoureja) prepoznat kao  $\beta$ -citotoksična tvar koja se u visokim jednokratnim dozama  $>65\text{mg/kg}$  (misli se na  $\beta$ -stanice endokrinog pankreasa) primijenjenim supkutano ili intraperitonealno koristi za indukciju DMT1 u eksperimentalnih životinja. Njegova  $\beta$ -citotoksičnost potječe od ciljane toksičnosti za stanice koje eksprimiraju GLUT2 nosač za glukozu na svojim membranama. STZ ulazi u te stanice posredstvom GLUT2 gdje inducira serijski: alkilaciju DNA metilnitrozoureja radikalima, mehanizme popravka DNA (aktivira PARP, poli(ADP-riboza) polimerazu), depleciju energetske zaliha stanice ( $\text{NAD}^+$  i ATP) te posljedično, staničnu smrt. U dozama od  $20\text{-}30\text{mg/kg}$ , opetovano periferno primjenjen, STZ dovodi do desenzitizacije IR i služi za indukciju eksperimentalnog DMT2. Mehanizam tog djelovanja nije u potpunosti razjašnjen, ali pretpostavlja se da uključuje direktnu interakciju s inzulinskim signalizacijskim putem u gušterači, jetri i bubrežima te indirektnu sa središnjim strukturama uključenim u energetske homeostazu organizma (obzirom da STZ ne prolazi BBB) putem hiperglikemijom i hiperlipemijom inducirano oksidativnog stresa [17, 31, 32]

U slučaju icv-STZ primjene, postoji više hipoteza kako STZ oštećuje neurone, što bi bilo od značaja za razumijevanje moguće etiopatogeneze sAB i stime povezanih ciljanih terapijskih pristupa. Jedna od hipoteza pretpostavlja da STZ ulazi u sve stanice koje na membrani imaju ekspresiju GLUT2 nosača za glukozu, ali oštećenje se događa u onih stanica koje imaju koeksprimiraju i IR te imaju aktivne inzulinske signalizacijske puteve. Takve stanice nalazimo u parijeto-temporalnom korteksu, hipokampusu i endodermalnim stanicama treće moždane komore (blizu hipotalamusa). Nije jasno na koji način STZ dovodi do oštećenja inzulinske signalizacije u ovim stanicama te radi li se o izravnom toksično učinku na IR ili ne. [32] Nadalje, istraživanja na NIRKO miševima kojima nedostaje početni dio inzulinskog signalizacijskog puta bilo u astrocitima ili u neuronima, unatoč tome nemaju kognitivna oštećenja, poremećaj metabolizma glukoze niti poremećaj s proliferacijom i preživljenjem neurona. To govori u prilog tome da bi etiopatogenetski poremećaj koji uzrokuje STZ, direktno ili indirektno, lociran distalno od IRS1/2. [32] Ne može se isključiti da se pri icv-STZ primjeni možda radi samo o lokalnom (na mjestu primjene) periventrikularnom oštećenju mijelina i aksona neurona forniksa, anteriornog hipokampusa i periventrikularnih struktura, esencijanih za učenje i pamćenje ili pak tanicita, GLUT2<sup>+</sup> stanica kemosenzora glukoze u likvoru i krvi, smještenih na dnu treće moždane komore. [32] Oštećenje tanicita dovelo bi do poremećenog ulaznog signala za važni metabolički integrator hipotalamus što bi moglo dovesti do promjena u metaboličkoj aktivnosti periferije kao što su to pokazala neka ranija

istraživanja, što bi moglo uputiti na moguću povezanost središnjih i perifernih promjena patofiziologiji AB.

Činjenica da icv-STZ štakorski model u velikoj mjeri modelira patofiziologiju sAB i da je toksičnost STZ-a izravno povezana s metaboličkom disregulacijom, bilo periferno ili središnje, upućuje na potrebu detaljnijeg upoznavanja inzulinske signalizacije i njenu ulogu u regulaciji energenata i neurotrofike u mozgu.

### 3.1.1 Ekvivalenti kognitivne psihometrije u životinjskim modelima Alzheimerove bolesti

Životinjama kojima moramo testirati kognitivnu funkciju to činimo indirektno, postavljajući im zadatke za koje znamo da će ih životinja koja bolje pamti, izvesti brže. Ukoliko je memorija koja ubrzava rješavanje zadatka nastala u tijeku obavljanja zadatka nazivamo je radnom memorijom, a ako potječe iz ranijeg susreta životinje s istim zadatkom, nazivamo je referentnom memorijom.

Postoje razni zadatci koji se mogu zadati životinjskom modelu. Jedan od najčešće korištenih testova provjere sposobnosti učenja i pamćenja je Morrisov test vodenog labirinta (eng. *Morris water maze*, MWM) u kojem se životinja prvo par dana aklimatizira na plivanje u bazenu podjeljenom u četiri kvadranta, potom trenira tako da zapamti da je u četvrtom kvadrantu postavljena podvodna platforma na kojoj se može odmoriti. Na dan kada se vrši testiranje ponavlja se procedura iz dana kad se životinja trenirala, s iznimkom da podvodne platforme više nema. Očekuje se da kognitivno zdrava životinja (koja ne voli plivati, poput štakora) provede više vremena u četvrtom kvadrantu u potrazi za podvodnom platformom. Neki od drugih češće korištenih testova su test prepoznavanja novog objekta (engl. *novel object recognition*, NOR), test pamćenja uvjetovanog strahom – izbjegavanje elektro šoka (engl. *passive avoidance test*, PAT) i sl. [4, 31] Važno je naglasiti da iako ovi kognitivni testovi mjere sposobnost različitih vrsta učenje i pamćenja u životinja, ne mogu u potpunosti odgovarati ranije navednim ocjenskim ljestvicama koji se koriste za procjenu kognitivnih sposobnosti u bolesnika koji boluju od AB. To je posebno važno obzirom na testiranje učinkovitosti različitih terapijskih pristupa u životinja i zatim translaciju ovih rezultata u klinička ispitivanja u populaciji bolesnika s AB. Dodatno, u životinja nisu mogući verbalni testove za procjenu kognitivnih poremećaja koji su važan dio dijagnostike i procjene uspješnosti terapije u AB bolesnika.

## 3.2 Osnovne komponente puta inzulinske signalizacije

Inzulinska signalizacija započinje vezivanjem inzulina na IR i time potiče njegovu autofosforilaciju i tirozinkinaznu aktivnost. Taj signal se dalje transducira na niz sekundarnih glasnika (IRS-1/2, SH2, Grb i sl.) koji kontroliraju transkripcijske faktore za različite proteine ili konkretne procese poput spajanja endocitotičnih vezikula s GLUT4 nosačima za glukozu sa staničnom membranom (protein-protein interakcije). Ugrubo, inzulinski signalizacijski put ima dvije grane: metaboličku koja regulira staničnu energetiku i mitogenu koja regulira stanični rast i razvoj. Među te dvije grane, kao i između inzulinskog signalizacijskog puta i ostalih signalizacijskih kaskada postoji komunikacija (eng. *crosstalk*) koja čine signalizacijsku mrežu puno kompleksnijom, izdržljivijom i bolje kontroliranom.

### 3.2.1 Inzulin i inzulinski receptor

**Inzulin** je peptidni hormon kojeg proizvode  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića u gušterači. On je heterodimer, sastavljen od dva proteinska lanca, A i B, povezana disulfidnim vezama. Molekularna težina inzulina je 5808Da i sastavljen je od ukupno 51 aminokiselinskog ostatka. On je prvi otkriveni i izolirani (1921.g., Banting i Best), sekvencirani (1951.g., Sanger), kristalizirani i kristalografski karakterizirani (1969.g., Hodgkin) te rekombinantno proizvedeni (1978.g., Riggs i Itakura) peptidni hormon. U tijelu se nalazi u svom aktivnom monomernom obliku i inaktivnom heksamernom obliku gdje tri inzulinska dimera okružuju centralni hidratizirani ion cinka. Heksamer je puno stabilnija forma (iako biološki neaktivna). [33]

Onemogućavanje agregiranja inzulina u heksamere je osnova formiranja brzodjelujućih inzulinskih analoga (insulin lispro - Humalog®, aspart - Novolog® i glulisine - Apidra®), što je postignuto tako da su neki aminokiselinski ostatci ljudskog inzulina zamjenjeni nekim drugima čime se smanjuje afinitet monomera da se međusobno udružuju. Na tržištu su dostupni i dugodjelujući inzulinski analozi, npr. inzulin glargin - Lantus®, inzulin detemir - Levemir® i NPH-inzulin® (srednjedjelujući inzulin). Inzulin glargin ima rekombinantno promjenjenu strukturu tako da ima veći afinitet za heksamernu formu pri fiziološkom pH, a inzulin detemir je aciliran s miristinskom kiselinom što ga čini lipofilnim i vezanim za albumin u krvi čime se produljuje njegovo poluvrijeme eliminacije. NPH-inzulin je regularni inzulin pomješšan s protaminom pri neutralnom pH, čime se dobivaju inzulinski heksameri stabilizirani s protaminom što opet

produljuje njihovu eliminaciju. Inzulin i inzulinski analozi su terapijske opcije liječenja DMT1 i DMT2, a u kliničkim su studijama za liječenje neurodegenerativnih bolesti (AD, PD, HD), depresije i pretilosti. [33]

Inzulin se većinski proizvodi u gušterači i odatle distriburira diljem tijela, no u mozgu glodavaca je nađena mRNA preproinzulina, kao i njen proteinski produkt. Središnja etiologija tog preproinzulina potvrđena je tako da je on nađen i u DMT1 glodavaca. Iako je danas većinom odbačena teza da je in situ sintetiziran inzulin biološki aktivan zbog nedostatka posttranslacijske enzimatske mašinerije potrebne za obradu preproinzulina, Havrankova et al. su eksperimentalno potvrdili da moždano specifični - KO miševi kojima nedostaje inzulinski gen 1 umiru tri dana nakon rođenja. Zasad uloga in situ sintetiziranog (prepro)inzulina ostaje otvoreno istraživačko pitanje.

**Inzulinski receptor**, IR, je tetramer sastavljen od 2 transmembranske jedinice povezane disulfidnim vezama od kojih svaka ima  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinicu ( $IR = (\alpha\beta)_2$ ).  $\alpha$  podjedinice zajedno čine vezno mjesto za inzulin, a  $\beta$  podjedinice su katalitičke domene s tirozinkinaznom aktivnošću. Inzulinske transmembranske podjedinice dolaze u dvije izoforme, IR-A i IR-B, ovisno o tome da li je egzon 11 isključen ili uključen. IR-B izoforma prisutna je na periferniji i središnje u astrocitima, a IR-A se čini specifična za neuronalnu ekspresiju. Egzon 11 figurira u  $\alpha$  podjedinici, tako da ne čudi da IR-A izoforma ima 1-2 puta veći afinitet za inzulin. Pretpostavlja se da bi signalna transdukcija preko IR-A izoforme prvenstveno inducirala mitogenu granu inzulinske signalizacijske kaskade, dok bi transdukcija preko IR-B aktivirala primarno metaboličku granu unutarstanične signalizacije inzulina. [33, 34] Neuronalni IR ima i specifični glikozilacijski obrazac u odnosu na periferne IR te češće formira heterodimere s jednim drugim sličnim receptorom, IGF1R. Takvi hibridni receptori pokazuju veći afinitet za IGF-1 i -2 nego za inzulin s mogućim utjecajem na različitu preferenciju nizvodnih signalinih puteva. [11, 33]

Jednom kad se inzulin veže na IR, dolazi do transdukcije signala u vidu konformacijske promjene koja potiče tirozinkinaznu aktivnost  $\beta$  podjedinica.  $\beta$  podjedinice prvo fosforiliraju jedna drugu, čime njihova aktivnost još više jača, što dovodi do fosforiliranja drugih glasnika, IRS1-4 koji dalje propagiraju signal. Periferno, u miocitima i adipocitima, IR ima i direktnu interakciju s aktinskim citoskeletom putem koje može osloboditi GLUT4 nosače za glukozu na staničnu površinu neovisno o distalnom inzulinskom signaliziranju. [33]

Aktivnost IR ovisi o jačini konformacijske promjene koju izaziva njegov ligand, o dostupnosti

IR na staničnoj površini i o detaljnom fosforilacijskom stanju i fosforilacijskoj dinamici  $\beta$  podjedinica IR.

Naime, serinska i treoninska fosforilacija  $\beta$  podjedinice inhibira njegovu tirozinkinaznu aktivnost. Povećane koncentracije kortizola, kateholamina i upalnog medijatora TNF- $\alpha$ , koji su povišeni u AB, dovode do serin/treoninske fosforilacije i tako potpomažu razvoj inzulinske rezistencije. Pojačana tirozinska defosforilacija ili nemogućnost tirozinske defosforilacije  $\beta$ -podjedinica (poremećaj homeostaze tirozinske fosforilacije) isto dovode do smanjenja aktivnosti IR. Mehanizam uključuje direktno smanjenje tirozinkinazne aktivnosti tirozinfosfatazama PTP1B i LAR (povišeni u AB i bolesnicima s inzulinskom rezistencijom) ili u slučaju prolongirane tirozinkinazne aktivnosti je kompleksniji i vjerojatno uključuje prisilnu prolongiranu endocitozu IR čime se smanjuje njegova dostupnost. PTP1B je fosfataza čija je aktivnost potaknuta s ROS, a TNF- $\alpha$  svoje utjecaje na IR ostvaruje putem JNK (c-Jun N-terminalne kinaze) koja ima svoje distalne efekte na neurone u upalnom okruženju. Naravno, rijetke mutacije IR također utječu na aktivnost IR, kao i autoantitijela koja se razvijaju u nekih ljudi i dovode do izražene inzulinske rezistencije praćene dermatološkom pojavom acantosis nigricans. [3, 11, 14, 33]

Jednom kad IR bude fosforiliran to potiče i mehanizme njegove endocitoze gdje se on defosforilira ili razgradi, drugim riječima reciklira. Tonički podražaj IR inzulinom periferno dovodi do regulacije IR na niže navedenim mehanizmom i razvoja inzulinske rezistencije. Nije primjećeno da hiperinzulinorafija (povišeni inzulin u CSFu) dovodi do istog efekta, ali nedavno je otkriveno da je taj proces endocitoze kojim se prekida signalna transdukcija u specifičnoj interakciji s APOE lipoproteinom. [4, 30] Istraživanja upućuju da u in vitro i in vivo modelima APOE $\epsilon$ 4 alel ima značajno pojačani afinitet za C-završetak IR u odnosu na APOE $\epsilon$ 3 alel. Ta interakcija produžuje vrijeme zadržavanja IR u endocitotičnim vezikulama što rezultira smanjenom površinskom gustoćom IR te smanjuje afinitet inzulina za IR i dovodi do slabijeg odgovora IR i nizvodne inzulinsku signalizaciju. Taj je učinak pojačan s dobi miševa i HFD dijetom, a smatra se da bi uzrok mogao biti u povećanoj agregaciji APOE $\epsilon$ 4 (također specifično za taj alel) u endosomima što bi potenciralo prethodno opisane efekte.

Ovaj rezultat je bitan jer pokazuje da APOE aleli, poznati rizični faktori za razvoj AD, imaju direktnog utjecaja na inzulinsku signalizaciju što podupire IRBS hipotezu nastanka AD, ali i zato jer objašnjava diferencijalno terapijsko djelovanje inzulina na bolesnike s različitim APOE statusom u kliničkim istraživanjima. [30, 40]

U konačnici,  $\beta$ -amiloid ulazi i u interakciju s IR na razini  $\alpha$  podjedinica, gdje se kompetira s inzulinom za vezno mjesto. To također doprinosi smanjenju transdukcije signala putem IR.

Ekspresija inzulinskog receptora nađena je u svim regijama mozga, a najveće koncentracije se nalaze u cerebralnom korteksu, hipokampusu, olfaktornom bulbusu i hipotalamusu. Njegova ekspresija na endotelu moždanih žila i astrocitima ima ulogu u transcitoznom transportu inzulinskih molekula preko BBB, koji je proces aktivnog i saturabilnog transporta niskog kapaciteta. Inzulinska rezistencija na razini endotela i astrocita implicirana je u smanjenom transportu inzulina u moždani parenhim što na drugačiji način može dovesti do nedostatnosti inzulinske signalizacije. [29] Zanimljivo je spomenuti da se taj transport danas eksperimentalno upotrebljava za dopremu lijekova nesrodnih inzulinu kroz BBB i širi farmakokinetiku lepezu opcija kako zaobići BBB. [41]

**Inzulinu-slični hormon rasta 1/2 (IGF-1/2)** i njihov receptor IGF-1/2R dijele značajnu sličnost s inzulinom i inzulinskim receptorom. Štoviše, IGF1R formira heterodimere s IR, međutim nisu jasni fiziološki efekti takve heterodimerizacije. Inzulin može pokrenuti signalizaciju na IGFR i obratno. IGFovi su ključni hormoni za metabolizam, rast i proliferaciju mnogih stanica u tijelu, a značajnu ulogu zadržavaju i u mozgu. Osnovna signalizacijska kaskada koju uzrokuju je zapravo mitogena grana inzulinske signalizacije, iako mogu potaknuti i metaboličku granu inzulinske signalizacije. Ovdje je riječ o značajnoj interakciji na razini vezanja hormona, formiranja receptora i prijenosa primarnog distalnog signala (putem IRS) između inzulinske i IGF-1/2 signalizacije što čini razumijevanje njihovih utjecaja u mozgu puno težim. [11, 29, 33]

**Inzulin-razgrađujući enzim**, IDE je izvanstanična metaloproteaza uključena u razgradnju inzulina. Također ima smanjeni ali značajni afinitet za  $\beta$ A i predstavlja glavni put ekstracelularne razgradnje oba proteina. Kao što je ranije komentirano, kompeticija između inzulina i  $\beta$ A doprinosi razvoju moždane amiloidoze.

### 3.2.2 Metabolička grana inzulinske signalizacijske kaskade

**Substrati inzulinskog receptora 1-4 (IRS1-4)** su kritični proteini koji s jedne strane imaju fosfotirozinsku veznu domenu, a s druge strane niz drugih veznih domena poput eng. *pleckstrin-homology* domene i eng. *Src homology* domene kojima dalje prenose signal. Postoje četiri izoforme IRS-a, ali je ekspresija IRS-1 i IRS-2 ubikvitarna. Poremećaj IRS-1 ekspresije u miševima dovodi do blage inzulinske rezistencije i zastoja u rastu, dok poremećaj ekspresije IRS-2 rezultira u smrti beta stanica i sekundarnoj inzulinskoj rezistenciji. [33] IRS-1 i IRS-2 mogu biti fosforilirani na



serinskim aminokiselinskim ostatcima, što smanjuje njihovu aktivnost. [17, 29 ]

U post mortem uzoraka moždanog tkiva AB bolesnika nađeno je da sniženje ukupne koncentracije IRS-1 i IRS-2 korelira s progresijom kliničke slike. Osim toga, oba proteina su značajno snižene aktivnosti u AB. [29]

**Fosfatidilinozitol 3-kinaza (PI3K)** je serin/treoninska kinaza aktivirana vezanjem na IRS putem p85/55 domene. Djelujući na lipidnu staničnu membranu PI3K putem katalitičke domene p110 proizvodi PIP3 (fosfatidilinozitol - 3,4,5 - trifosfat) koji aktivira više kinaza, međuostalima i o fosfatidilinozitolu ovisnu kinazu 1 i 2 (PDK1/2). PI3K je bitan regulacijski čvor ove kaskade. Npr. BDNF (eng. *brain derived neurotrophic factor*) pomaže kognitivne funkcije djelujući na razini PI3K. [29, 33]

**O fosfatidilinozitolu - ovisne kinaze 1 i 2 (PDK1/2)** aktiviraju daljnje kinaze, među istaknutijima Akt (protein kinazu B), aPKC (atipičnu protein kinazu C), na wortmannin - osjetljivu protein kinazu i inzulinom - stimuliranu protein kinazu. Puna aktivacija Akt kinaze, centralnog distalnog čvora te signalizacijske mreže, zahtjeva dodatnu fosforilaciju serinskog ostatka posredstvom mTORC2, distalnog glasnika tog istog signalizacijskog puta. [33] Nađeno je da unutarstanični A $\beta$  monomeri ometaju vezivanje PDK1 i Akt i posljedičnu aktivaciju Akt. [15]

**Akt kinaza** ima tri izoforme, Akt1, Akt2 i Akt3. U mozgu je prisutna Akt3 izoforma. Akt kinaza regulira proteine ključne za glikolitički put, glikogenezu, lipogenezu, proteinsku sintezu i apoptozu. Regulacija je direktna npr. u slučaju GSK-3, enzima vezanog za glikogenolizu, IRAP, proteina uključenog u oslobađanje vezikula s GLUT4 na periferiji te Bcl2 i BAD, proteina koji potiču staničnu apoptozu. Akt regulira negativno GSK-3 i Bcl2/BAD, a pozitivno IRAP. [11, 29, 33]

Skupno gledano, Akt omogućava da stanica pojačano proizvodi energiju olakšavajući ulazak glukoze u stanicu i pojačavajući glikolitički i oksidativno fosforilacijski kapacitet stanice sintezom potrebnih enzima. Dodatno, Akt je uključen u spriječavanje razgradnje staničnih proteina i apoptoze stanice. Promjene u staničnom toku metaboličkih supstrata poput glukoze, sterola i masnih kiselina imaju direktni učinak na gene odgovorne za njihov metabolizam.[11, 29, 33].

Akt negativno regulira GSK-3 što umanjuje AB patološke procese poput depozicije A $\beta$  i hiperfosforilacije  $\tau$ -proteina. Međutim, Akt također fosforilira  $\tau$ -protein te je dokazano da kočenje njegove aktivnosti in vitro smanjuje nastanak NFTova. [29] Takva dvosmislenost se vidi i u studijama na bolesnicima s perifernom inzulinskom rezistencijom u kojih je u dijelu bolesnika prisutna regulacija IRS/PI3K/Akt signalizacijskog puta na niže u mišićima, dok je u nekih pacijenata aktivnost Akt nepromjenjena, što upućuje na heterogenu i kompleksnu etiologiju inzulinske

rezistencije, bilo da je periferna ili središnja. [33]

**Glikogen sintaza kinaza 3**, GSK-3, je serin/treonin kinaza koja je centralna u povezivanju poremećaja inzulinskog signalizacijskog puta sa staničnom patologijom AB. GSK-3 je negativno regulirana fosforilacijom pomoću Akt kinaze. Ukoliko je inzulinska signalizacijska kaskada aktivna, aktivnost GSK-3 je snižena što dovodi do povećanja glikogeneze u miocitima i hepatocitima (GSK-3 negativno regulira glikogen sintazu) i smanjenja staničnog efluksa glukoze. U ostalim stanicama GSK-3 vrši razne druge regulatorne funkcije.

GSK-3 ima dvije izoforme,  $\alpha$  i  $\beta$ . U mozgu je GSK-3 $\alpha$  kinaza odgovorna za razgradnju A $\beta$  u endocitotičnim vezikulama, dok je GSK-3 $\beta$  izoforma koja fosforilira  $\tau$ -protein i time dovodi do smanjenja njegovog afiniteta za mikrotubule čime uzrokuje mikrotubularnu disocijaciju i oštećenje vitalnog aksonalnog transporta. [14, 23, 29, 33]

**mTOR, eng. mammalian target of rapamycin**, osnova je za formiranje dvaju proteinskih kompleksa, mTORC1 i mTORC2. mTORC1 je aktiviran s pristunošću inzulina putem Akt, ali i služi kao nutritivni senzor gdje ga aktiviraju povišene razine slobodnih aminokiselina. Krajnji rezultat aktivacije mTORC1 je sinteza nuklearno kodiranih mitohondrijskih proteina koji direktno izgrađuju mitohondrijske metaboličke puteve: ciklus limunske kiseline,  $\beta$ -oksidaciju masnih kiselina i komplekse koji sačinjavaju elektronski transportni lanac. [11, 29] mTORC2, aktiviran posredstvom Akt, ali i direktno posredstvom PI3K, negativno regulira transkripcijski faktor FOXO1, glavni regulator apoptotskih proteina i razgradnih puteva proteina u stanici. [11] Poremećena fosforilacija mTOR korelirana je s patohistološkim biljezima AB.

Zaključno s aktivacijom mTOR, metabolička grana inzulinske signalizacije diže kapacitet energetske utilizacije glukoze putem glikolize i oksidativne fosforilacije. Pokazano je da je neto-efekt takve signalizacije relativno povećanje glikolitičkog puta u odnosu na oksidativnu fosforilaciju, što daje prostor za sintezu korisnih (među)produkata glikolitičkog puta poput UDP-GlcNAc, laktata i acetilkolina. [11] Pretpostavlja se da je metabolička grana inzulinske signalizacije aktivnija u astrocitima nego u neuronima, za koje se zna da imaju povećani glikolitički kapacitet.

### 3.2.3 Mitogena grana inzulinske signalizacijske kaskade

Druga glavna grana inzulinske signalizacijske kaskade u konačnici aktivira MAP kinaze ERK1 i

ERK2, transkripcijske faktore koji ulaze u staničnu jezgru i potiču ekspresiju gena vezanih uz stanično preživljavanje. Stanično preživljavanje u ovom kontekstu znači obnovu DNA, regularno energetske funkcioniranje staničnih mitohondrija i regularno vršenje staničnih funkcija poput LTP. Blokiranje ERK1 i ERK2 rezultira smanjenom oksidativnom fosforilacijom, što je glavni energetski proces u neuronima za koje se pretpostavlja da uglavnom koriste mitogenu granu inzulinske signalizacije i režim dobivanja energije oksidativnom fosforilacijom. [4, 11, 33]

**Mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK)** su skupina transkripcijskih faktora koji reguliraju stanični odgovor na vanjske podražaje. Dijelev se u tri skupine. Prvoj pripadaju ERK1 i ERK2 (eng. *extracellular-signal regulated kinase*) koje odgovaraju na podražaj mitogena poput hormona rasta ili inzulina, drugoj JNK (c-Jun N-terminalna kinaza), a trećoj skupina p38 MAP kinaza. Zadnje dvije skupine odgovaraju na izvanstanične stresore poput citokina, oksidativnog stresa, hipoenergozu, hiper ili hiposmolarlost. Nisu povezane s inzulinskim signaliziranjem per se, ali su implicirane u patogenezi AB. [33] Aktivacija ERK1 i 2, kao i svih ostalih MAPK, rezultat je tročvorne signalne kaskade. Prvi čvor čini Ras-GTP G-protein, koji aktivira drugi čvor, Raf kinazu koja aktivira ERK1 i ERK2. Sa stajališta regulacije mitogene grane inzulinske signalizacije, najzanimljiviji je prvi Ras-GTP čvor. [29]

**Ras** je G-protein kojeg aktivira IR na kompleksan način. IR prvo aktivira IRS-1 koji putem svoje SH2 domene regrutira Grb2 protein (eng. growth hormone receptor binding protein 2). Grb2 širi lepezu mogućih interakcija pomoću svoje SH3 domene na koju se vežu, među ostalima, SOS (eng. *Son of Sevenless*) i Ras G-protein. SOS je protein koji pomaže aktivaciju Ras G-proteina olakšavajući zamjenu GDP-a sa GTP-om. Konglomerat svih tih proteina (IRS-1, Grb2, SOS, Ras) nužan je za aktivaciju Ras-a i daljnu propagaciju mitogenog signala.

**Grb10 i Grb14**, su proteini srodni Grb2 koji također ulaze u interakciju s IRS-1 i reguliraju inzulinsku i IGFR signalnu kaskadu na niže. Potencijalno su implicirani u patogenezu inzulinske rezistencije i AB, a predstavljaju i potencijalno korisne farmakološke mete. GAB2 (eng. *Grb2 - associated protein 2*) je još jedan protein koji se upliće u prvi čvor mitogene kaskade i novija istraživanja upućuju na njegovu povezanost s povećanjem rizika od razvoja AB u nositelja APOEε4 alela. [30]

### 3.2.4 GLUT nosači za glukozu

GLUT-ovi su specijalizirani nosači za glukozu kojih ima ih 8 vrsta, GLUT1-8.

GLUT1 i GLUT3 su široko rasprostranjeni u moždanome tkivu, klasično se smatraju

neosjetljivim na inzulin. GLUT1 je specifičan za astrocite (i endotel moždanih krvnih žila), a GLUT3 za neurone. U neuronima je nađena ekspresija GLUT2 i GLUT4, ali samo u nekim regijama mozga. GLUT2, konstitutivno prisutan na staničnoj membrani i u koekspresiji s heksokinazom čini dio eng. *glucose sensing* mehanizma u  $\beta$ -stanicama gušterače. U mozgu je prisutan u hipotalamusu, gdje regulira unos hrane u organizam i u hipokampusu, gdje regulira otpuštanje neurotransmitera i sinaptičke funkcije. GLUT4, klasični nosač za glukozu osjetljiv na inzulin, u mozgu je prisutan u područjima s najgušćim sinapsama: korteksu, hipokampusu, hipotalamusu, amigdali i cerebelumu. GLUT5 je nosač za fruktozu prisutan u mikrogliji, a GLUT8 ima distribuciju sličnu GLUT4 i s njim dijeli mehanizam regulacije inzulinom. [29]

GLUT je jedan od bitnih konačnih efektoru periferne inzulinske signalizacije. Podizanje razine inzulina u krvi dovodi do aktivacije metaboličke grane inzulinske kaskade i Akt kinazom posredovane fosforilacije IRAP (eng. *insulin responsive aminopeptidase*), čime se oslobađa endocitotička zaliha GLUT4 i naglo olakša ulazak glukoze u stanicu. Zbog oskudne količine GLUT4 (i 8) u mozgu, ovaj prepoznatljiviji efekt inzulina izostaje, vjerojatno da bi mozgu uvijek bila dostupna glukoza. [33]

Međutim, detaljnim istraživanjem uočeno je da je ulaz glukoze u moždano tkivo ipak olakšan inzulinom iznad neke bazalne razine. Pokazano je da astrocit-specifični IRKO miševi imaju oligoglikorafiju (smanjenu glukozu u CSFu), te da na FDG-PETu pokazuju smanjenu apsorpciju periferne glukoze u moždano tkivo. Pošto je GLUT1 involviran u transport glukoze preko BBB očito je da inzulin ima stimulacijsko djelovanje na njegovu ekspresiju, što je biokemijski dokazano. Predložen je i mehanizam te dozno ovisne ekspresije GLUT1 o inzulinu prema kojem bi istovremeno signaliziranje IGF1R i IR signalnim putevima u astrocitima dovodilo do regulacije GLUT1 na više u tim stanicama. Postoje i indikacije da je GLUT3, glavni neuronalni GLUT s pet puta većom provodljivosti za glukozu od GLUT1, također dozno ovisne ekspresije o inzulinu. Poremećaj tog transporta može dovesti do smanjenja glukoze u CSFu u kritičnim razdobljima pojačane neuronalne aktivnosti i tako do metaboličkog oštećenja neurona i astrocita te utjecati na sinaptogenu funkciju moždanih regija. [11, 29]

### 3.3 Inzulinska signalizacija u moždanome tkivu

Inzulinska signalizacija pristuna je diljem organizma i u različitim stanicama. Danas je djelovanje inzulina prepoznato u autokrinoj regulaciji  $\beta$ -stanične mase, vazodilataciji krvnih žila,

odgovoru imunskog sistema na upalu ali i u nizu moždanih funkcija.[33]

Na substancičnoj i molekularnoj razini, aktivacija inzulinske signalizacije u mozgu dovodi do već navedenih učinaka na metabolizam, preživljavanje, rast, razvoj i funkcioniranje neurona i mozga. Inzulinska signalizacija omogućuje transport inzulina u moždani parenhim, olakšava unos glukoze u stanice mozga, omogućuje efikasnu glikolizu i sintezu energetskih, gradivnih i regulatornih supstrata povezanih s glikolitičkim ciklusom, čuva neurone od oštećenja s ROS, koči apoptotske procese, regulira kvalitetu mitohondrija i sudjeluje u sintezi proteina bitnih za neuronalne funkcije poput LTP. Gledano na taj način, inzulin u moždanom parenhimu djeluje kao čimbenik rasta i glavna razlika središnje u odnosu na perifernu inzulinsku signalizaciju je u krajnjim efektorima te signalizacije, tj. konkretnim genima koji su uključeni u postizanje ciljeva te signalizacije (npr. GLUT4 nije ubikvitarno aktivan gen u neuronima).

U pokusima s NIRKO, astocit/neuron specifičnim IRKO i IGF1R/IR DKO životinjskim modelima ustanovljeno je da prekid inzulinske signalizacije uzrokuje povećanu tjelesnu težinu, hipotalamički hipogonadizam, povećanje (hepatičke) glukoneogeneze, depresiju i poteškoće s učenjem i pamćenjem. Ti su poremećaji povezani sa specifičnom populacijom stanica u specifičnoj moždanoj regiji. Npr. inzulinska signalizacija u neuronima hipotalamusa ključna je za regulaciju ukupne tjelesne težine i inzulinske senzitivnosti čitavog tijela dok je inzulinska signalizacija u astrocitima ključna za regulaciju raspoloženja. Za primjetiti je da moždano specifični IRKO glodavci ne umiru za razliku od moždano specifičnih inzulinske KO glodavaca koji umiru tri dana po okotu. [11, 33]

Dosad je prepoznata značajna uloga inzulinske signalizacije u modulaciji hranjenja i središnje-perifernoj regulaciji inzulinske senzitivnosti. U hipotalamusu postoje tri neuronalne populacije, AgRP neuroni, POMC neuroni i MCH neuroni. AgRP neuroni su oreksigeni neuroni koji lučenjem AgRP hormona promoviraju osjećaj gladi, POMC neuroni su njihova fiziološka suprotnost - anoreksigeni neuroni koji lučenjem  $\alpha$ MSH promoviraju osjećaj sitosti, a MCH neuroni su neuronalni integrator tih podražaja koji inducira osjećaj gladi ili sitosti i shodno tome potragu za hranom. Inzulin suprotno regulira aktivnosti AgRP i POMC neurona, tj. njegovo lučenje poslije jela potiče aktivnost POMC neurona i koči aktivnost AgRP neurona što dovodi do osjećaja sitosti i prekida hranjenja. Pokusom je potvrđeno da icv-infuzija inzulina potiče osjećaj sitosti i mišji modeli gube na težini. Na substancičnoj razini inzulin to čini utjecajem na mitohondrijsku dinamiku kako je ranije navedeno u tekstu.

Osim što inzulin utječe na lučenje specifičnih hormona u hipotalamusu, on utječe i na

neuralno izbijanje impulsa AgRP i POMC neurona čiji aksoni vode sve do jetre i stanica masnog tkiva. AgRP impulsi reguliraju hepatičku glukoneogenezu indukcijom heksokinaze koja olakšava izlazak glukoze iz glikolitičkog ciklusa i hepatocita. POMC neuralni impulsi reguliraju adipocitnu lipolizu i time razinu FFA i adipokina u krvi. U stanju gladovanja, tj. hipoinzulinemiji impulsi obe neuralne mreže su zakočeni. Razina glukoze u mirovanju, FFA i adipokina u krvi direktno utječu na inzulinsku senzitivnost cijelog tijela. Na taj način središnje inducirani signal ima utjecaj na čitav organizam što nazivamo središnje-perifernom regulacijom inzulinske senzitivnosti.

Poremećaj središnje-periferne regulacije inzulinske senzitivnosti mogao bi doprinijeti sekundarnom nastanku inzulinske rezistencije u mozgu, kao i direktno doprinijeti patogenezi AB putem utjecaja sekundarno nastalih AGE-ova i dislipidemije na neurodegeneraciju. [11, 32]

Utjecaj inzulina na učenje i memoriju je nedavno prepoznat u studijama na IRKO miševima. Miševi kojima je u hipokampus injiciran lentivirus s *antisense* IR sekvencom kako bi smanjio broj IR, imaju oslabljen LTP i prostornu memoriju. Također, u pretkliničkim studijama utjecaja inzulina na kogniciju (detaljnije u o tome u četvrtom poglavlju) potvrđen je blagotvoran akutni i kronični učinak inzulina na pamćenje. Otvoreno je pitanje čime je uzrokovan akutni, a čime odgođeni ili kronični učinak inzulina na pamćenje. [11, 23]

Pretpostavlja se da je akutni učinak inzulina posredovan pojačanom utilizacijom glukoze u mozgu. Inzulin bi poticao BBB transport glukoze i pripremao neurone za pojačanu utilizaciju glukoze. Kronični učinak inzulina na pamćenje vjerojatno ima veze s drugim efektima inzulinske signalizacijske kaskade, npr. mitogenom njenom granom.

### 3.4 Inzulinska rezistencija moždanog tkiva kao osnova patogeneze Alzheimerove bolesti

U prethodnim (pot)poglavljima dane su različite teorije nastanka AB, međutim, nitijedna nije nedvosmisleno potvrđena niti je rezultirala lijekom koji značajno mjenja ishode bolesti. Također, dani su značajni argumenti da poremećaj regulacije inzulinske kaskade i njenih fizioloških učinaka ima veze sa simptomima i progresijom kliničke slike AB. Inzulinska hipoteza patogeneze AB postulira da je poremećaj te signalne kaskade središnji u etiologiji AB i da direktno doprinosi nastanku glavnih značajki AB -  $\beta$ -amiloidnih i  $\tau$ -proteinskih nakupina.  $A\beta$  i fosfo- $\tau$  protein na različitim razinama ulaze u povratnu interakciju s elementima inzulinske kaskade i tako zatvaraju

patogenetski krug pozitivnom povratnom spregom koja vodi samo dalje u neurodegeneraciju. Epidemiološka korelacija između dijabetesa melitusa i neurodegenerativnih bolesti, kao i činjenica da postoji eksperimentalni model AB temeljen na toksičnosti istog spoja koji inducira DMT1/2 u životinjskim modelima, dodatno učvršćuju ideju da je poremećaj regulacije inzulinske signalizacije etiopatogenetski ključna u AB.

Nije poznato što bi bio incijalni događaj koji bi potaknuo poremećaje regulacije inzulinske kaskade, ali činjenica je da je periferna inzulinska rezistencija česta pojava u starećoj populaciji. Ipak, inzulinska rezistencija se ne pojavljuje kod svakog, kao što se ne pojavljuje ni AB, tako da mora postojati neki konkretan uzrok te patologije, kao i uzrok nastanka AB.

Molekularni mehanizmi periferne i središnje inzulinske rezistencije su vjerojatno dijeljeni. Istraživanjem jednog tipa rezistencije možemo dobiti uvid u drugu. Također, treba imati na umu da periferna inzulinska rezistencija može uzrokovati središnju, dok za obratno nema jasnih izravnih dokaza. U slijedećem potpoglavlju kratko je izložena periferna inzulinska rezistencija i neki njeni patofiziološki mehanizmi koji bi mogli biti bitni centralno.

### 3.4.1 Mehanizmi periferne inzulinske rezistencije

Slično kao poremećaj sinteze ATP-a u AB, inzulinska rezistencija prethodi pojavi kliničke manifestacije dijabetesa i više od 10 godina, može poslužiti predviđanju vremena nastanka dijabetesa i djelomice je definirana genetskim naslijeđem. Inzulinska rezistencija direktno povezana sa nastankom metaboličkog sindroma koji je značajni rizični čimbenik za razvoj ateroskleroze, DMT2, srčani udar, bubrežnu bolest, hepatosteatozu, perifernu arterijsku bolest, moždani udar i mnoge druge bolesti, uključujući AB i druge neurodegenerativne bolesti. Ono što je značajno je da povišeni laboratorijski činitelji metaboličkog sindroma direktno utječu na inzulinsku senzitivnost različitih tkiva, uključno i moždanog tkiva. [33, 34]

Patološka (periferna) inzulinska rezistencija se razvija kroz kompleksnu interakciju genotipa i okoliša (prekomjerni unos hrane i manjak tjelovježbe) putem utjecaja na cirkulirajuće razine FFA, hormona i adipokina. Stanične signalne kaskade koje izazivaju ti čimbenici u interakciji su s inzulinskom kaskadom i konstantno prilagođavaju inzulinsku senzitivnost čitavog organizma. Na organskoj razini - adipociti, gasterintestinalni sustav i mozak - čine neuroendokrinu os koja je većinski odgovorna za regulaciju tih čimbenika i posljedično inzulinske senzitivnosti. [34]

**Adipokini** se dijele u dvije skupine; oni koji dižu inzulinsku osjetljivost (leptin i adiponektin) i

oni koji je smanjuju ( $\text{TNF}\alpha$ , rezistin, IL6). Leptin se luči u proporciji s količinom masnog tkiva, a adiponektin obrnuto. Međutim toničko lučenje leptina, u slučaju pretilosti, dovodi do regulacije na niže leptinskih receptora (u mozgu) i paradoksalno do smanjenja njegovog učinka i inzulinske senzitivnosti. Mozak na periferiju djeluje putem mehanizma središnje-periferne regulacije inzulinske senzitivnosti i poticaja na hranjenje. Na taj način se simplificirano objašnjava nastanak inzulinske rezistencije u pretilih osoba. [34]

Povišene razine FFA smanjuju inzulinsku senzitivnost tkiva. To čine povećavanjem produkcije ROS, koji induciraju kinazu osjetljivu na oksidativni stres (JNK). JNK direktno ulazi u interakciju s IR i smanjuje njegovu tirozinkinaznu aktivnost. Najizraženije djelovanje ima palmitinska kiselina i ceramide koji su potencijalni bitni činitelj središnje inzulinske rezistencije jer je njihova sinteza u mozgu povećana u stanjima hiperlipemije. [11, 34]

**Reaktivni kisikovi spojevi (ROS)** su kisikovi radikali koji uzrokuju oštećenje i peroksidaciju lipida, proteina i DNK. ROS nastaju u mitohondrijima nereguliranom oksidativnom fosforilacijom. Osim već spomenutih činitelja, i povišene koncentracije metala u tragovima poput bakra, olova, aluminijska i žive, olakšavaju rasprezanje reduktivnog potencijala elektronskog lanca i redukcije kisika u stanici te pojačavaju nastanak nepotpuno reduciranih kratko živućih kisikovih spojeva. ROS dalje djeluje direktno na indukciju JNK kinaze i  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  puta čime se potiče nastajanje upale koja sinergistički s JNK kinazom dovodi do inzulinske rezistencije. Stanični kompenzatorni mehanizam uključuje sintezu antioksidativnih proteina poput glutationa, superoksidne dismutaze i katalaze. U zdravih ljudi, moždano tkivo unatoč tome što je izrazito metabolički aktivno ima snižene rezerve antioksidativnih proteina, a u AB bolesnika to je još više izraženo. [11, 29]

**Upala** je značajna histološka komponenta pretilosti i njen sistemski značaj je da producira upalne citokine poput  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL1}\beta$  i IL6. ROS aktiviraju i  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  put koji daljenje potiče sintezu citokina. Citokini lokalno regrutiraju nove upalne stanice, ali i ostvaruju sistemski učinak. Npr.,  $\text{TNF}\alpha$  putem svog receptora aktivira već spomenutu JNK kinazu koja neposredno uzrokuje inzulinsku rezistenciju. Neuroupala je značajka i AB. [11, 29]

**Produkti neenzimatske glikacije (AGE)** su povišeni u dijabetičnih bolesnika, ali i u starije populacije. Sakupljaju se unutar stanica putem svog receptora RAGE gdje im slijedi enzimatska razgradnja. AGEovi ulaze u interakciju s IR receptorom tako da olakšavaju aktivaciju GSK-3 i



produkciju ROS. U moždanom parenhimu, to dovodi do hiperfosforilacije  $\tau$ -proteina. Također, AGEovi olakšavaju polimerizaciju  $\beta$ A. [29]

### 3.4.2 Molekularna osnova centralne inzulinske rezistencije

Stjecaj svih dosad spomenutih interakcija rezultira središnjom inzulinskom rezistencijom na dva načina: poremećajem komponenti inzulinske signalizacijske kaskade poput IR, IRS, Akt, mTORC1 i sl. ili poremećenim transportom glavnih supstrata inzulinskog signalizacijskog puta: inzulina i glukoze preko BBB u mozak.

Učinci pojedinih elemenata inzulinske signalizacije mogu biti smanjeni kao posljedica smanjenja ekspresije njihovih proteina, smanjene aktivnosti ili smanjene gustoće na staničnoj membrani (npr. zarobljivanje IR u endosomima) ili citoplazmi (npr. pojačanom razgradnjom kalpainom-1).

Poremećaj transporta inzulina i glukoze u mozak (koji bi bili istovremeno i uzrok i posljedica inzulinske rezistencije) drugi je način kako izazvati inzulinsku rezistenciju. Ako inzulin ne može proći BBB, to će jasno izazvati manjak njegovog učinka. Slično, ako GLUT1 inducirani povećani utok glukoze u mozak neće biti prisutan u ključnim momentima, to je u dijelu ekvivalentno tome da inzulinski signalizacijski put nije ni pokrenut. Činjenica da je ovaj način nastanka inzulinske rezistencije počiva na prisutnosti BBB, omogućuje da se inzulinska rezistencija centralizira i nudi objašnjenje patogeneze sAB u slučajevima bolesnika bez perifernih smetnji i simptoma.

Konkretni mehanizmi koji mogu dovesti do smanjenog djelovanja komponenti inzulinske signalizacije već su razrađeni u prethodnom tekstu, a ovdje ih se samo spominje na jednom mjestu radi preglednosti. To su: **1.** interakcija  $A\beta$ /fosfo- $\tau$ -protein s komponentama inzulinske signalizacijske kaskade što nakon prelaska nekog praga više ne može biti kompenzirano, **2.** pojačana razgradnja komponenti inzulinske signalizacijske kaskade pomoću povišenih razina o kalciju ovisne peptidaze kalpaina-1 ili PTP1B enzima, **3.** interakcija IR s APOE $\epsilon$ 4 alelom apolipoproteina, **4.** interakcija IR i IRS-1 s povišenim razinama glukokortikoida i kateholamina u mozgu starijih osoba, **5.** interakcija ROS, upale, lipida i AGEova s elementima inzulinske signalizacijske kaskade.

Sve te interakcije su procesi s (pozitivnom) povratnom spregom, što bi značilo da osim što npr.  $A\beta$  utječe na PDK1/Akt interakciju, poremećaj inzulinske signalizacije dovodi povratno do porasta  $A\beta$  putem disinhibicije GSK-3 $\alpha$ . Osim toga, mnogi navedeni induktori intereagiraju međusobno, npr. ROS i APOE $\epsilon$ 4, čime najčešće ostvaruju sinergistički učinak na IRBS.

Već u ovom kratkom tekstu opisan je povećani broj interakcija čiji je doprinos u razvoju inzulinske rezistencije vjerojatan, a njihova je (među)kompleksnost značajna. Etiopatogeneza inzulinske rezistencije je vjerojatno heterogena, visoko individualna i multifaktorijelna. Shodno tome, za očekivati je da je takva i patogeneza AB, u slučaju da inzulinska hipoteza bude potvrđena. Spekulativno, moglo bi se zamisliti da svi navedeni čimbenici konfluiraju u jedinstvenu patogenetsku jezgru AB koju čini poremećena inzulinska signalizacijska kaskada.

Već je u navedenim literaturnim podacima [14] predloženo da neurodegeneracija ima veze s nespriječivim porastom entropije organizma s starošću. Kako mnogi od ranije spomenutih mehanizama nastanka AB imaju pozitivne povratne sprege, greške u regulaciji tih mehanizama, koje se s dobi moraju događati, nepovratno dižu ravnotežne razine štetnih čimbenika na više i time sve više i više guraju organizam u stanje neurodegeneracije. Na neki način, koliko je regulacija sistema labava (ovisno o genetskom sastavu pojedinca), toliko vrijeme može poremetiti (potaknuto slučajnim greškama dodatno stimuliranim stresorskim okolišnim čimbenicima) i dodatno oslabiti regulacijske krugove. Neovisno o pojedincu i okolišu, vrijeme će uvijek uspjevati u svome naumu, ali je pitanje do koje mjere će organizam to strukturno dopuštati. Ako potragu za lijekom protiv AB gledamo iz te perspektive, ta potraga postaje traženje načina na koji strukturno možemo učiniti regulatorni sistem robustnijim npr. dodavanjem novog regulatornog mehanizma ili kanaliziranjem porasta entropije na lako rješive biološke mete. Također, mreže visokog kompleksiteta, poput neuronalnih mreža i potencijalno ovih signalnih kaskada imaju emergentna (neočekivana) svojstva. Moguće je da je nekako priroda uspjela usaditi inteligenciju i u same stanice i njihovu regulaciju, pa ih možda možemo naučiti kako se bolje nositi sa stresom?

Inzulinska hipotezu je najbolje ispitati testirajući utjecaj intracerebralnog inzulina na bolesnike s AB.

## 4 Intranazalni inzulin u Alzheimerovoj bolesti

### 4.1 Intranazalna primjena lijekova

Krvnomoždana barijera priječi slobodni prijelaz tvari iz krvotoka u moždano tkivo. Slobodno difuzibilne su tvari s molekularnom masom manjom od 500Da, ili ekvivalentno s manje do 8-10 vodikovih veza. Veće molekule (poput inzulina, molekularne mase 5808Da) u moždani parenhim mogu ulaziti samo aktivnim (i često kapacitetom ograničenim; saturabilnim) transportom ili kroz defekte BBB kao npr. u slučaju infekcije ili traume. Kao takva, BBB je često problematična s farmakokinetikog gledišta jer utječe na bioraspoloživost, potentnost i efektivnost farmaceutskih pripravaka. Intranazalna primjena lijeka u mozak kao put koji zaobilazi BBB prvi put se spominje u patentu Williama H. Freyja II. iz 1989. godine[38]. On je tu rutu koristio za dopremu inzulina u mozak kako bi liječio štakorske modele Alzheimerove i Parkinsonove bolesti. Od tada farmakokinetika takve primjene ispitana je na različitim supstancama. [37, 39]

Nazalna šupljina može se podijeliti u tri regije: vestibularnu, respiratornu i olfaktornu. Respiratorna regija je najveća i u prosjeku je velicine 130cm<sup>2</sup>, visoko vaskularizirana i inervirana ograncima trigeminalnog živca. Olfaktorna regija je smještena superiorno u odnosu na respiratornu regiju, ispod kribriiformne ploče etmoidne kosti. Sluznica te regije građena je od potpornih stanica, mikrovillarnih stanica, bazalnih stanica i olfaktornih receptora prvog moždanog živca. Receptorske stanice su direktni dio prvog moždanog živca, a ne odvojene stanice posebno sinaptirane s njim.

Ispod bazalne membrane nalazi se lamina propria ispunjena potpornim vezivom, krvnim i limfatičkim kapilarama, aksonima, perivaskularnim i periaksonalnim prostorima te bowmannovim žlijezdama. Dendriti olfaktornog živca okruženi su slojem stanica, eng. ensheating cells, koje se nastavljaju u duru mater jednom kad zajedno s dendritima prođu kribriiformnu ploču. Mjereno imunohistokemijski, olfaktorna regija nazalne šupljine i olfaktorni bulbus imaju najviše razine inzulina, IR i IDE u odnosu na ostatak moždanog parenhima.

Sudeći prema činjenici da se jednom potisnuti inzulin u nazalnu šupljinu unutar jednog sata raspoređi diljem mozga i postigne visoke razine u CSFu, kao i prema studijama s radioaktivno obilježenim inzulinom, inzulin najvjerojatnije putuje prema mozgu perineuralnim transportom upravo između membrane olfaktornog dendrita i tih eng. ensheating stanica olfaktornih dendrita. Rana pojava inzulina u području medulle oblongate također govori u prilog da se inzulin služi i trigeminalnim ograncima za perineuralno širenje. [37] Nije pretjerano jasno da li je taj transport

Tablica 3. Tablični prikaz pretkliničkih studija sa IN primjenom inzulina.

Lijek	Doza	$\Delta T$	Životinjski model	Karakteristike životinjskog modela:		Rezultati studije		Zaključak/komentar	Ref. (god)
				vezane uz DM	vezane uz AB	1'	2'		
inzulin lispro, $\mu Em$ , 20% $^{ow}$						<ul style="list-style-type: none"> <li>S-[Glc] ↓ 30-40%</li> <li>BA 21%</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>permeabilnost 0.2cm/h</li> <li>vnu = 10min</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>visokouljna <math>\mu Em</math> izaziva značajni sistemski učinak, dok formulacije bazirane na vodi ne</li> <li><math>\mu Em</math> formulacija povećava permeabilnost</li> <li>niskouljna <math>\mu Em</math> je najbolja formulacija</li> </ul>	[42] (2010)
inzulin lispro, $\mu Em$ , 80% $^{ow}$	1x1U/kg	-	New Zealand bijeli zečevi s induciranim DM	HGlc	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>S-[Glc] =</li> <li>BA &lt; 1%</li> </ul>			
inzulin lispro, $\mu Em$ , 100% $^{ow}$						<ul style="list-style-type: none"> <li>S-[Glc] =</li> <li>BA &lt; 1%</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>permeabilnost 0.08 cm/h</li> <li>vnu = 40min</li> </ul>		
inzulin s D-CPP	2IU/d	6 mj	icv-STZ štakorski model sAB	Inz $\Omega$	A $\beta$ plakovi, NFT, kognitivno ↓ @6mj	<ul style="list-style-type: none"> <li>S-[Glc] =</li> <li>BA &lt; 1%</li> <li>hycmp +, hyth +, crtx +, mob +</li> <li>S-[Glc] ↓ 5%</li> <li>BA = 5%</li> <li>hycmp +, hyth +, crtx +, mob +</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>kognitivno ↑</li> <li>depresija ↓</li> <li><math>\tau^*</math> ↓</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>uspješno dostavljen IN Inz</li> <li>manji periferni efekti s D-CPP</li> <li>anti-AB učinak</li> </ul>	[43] (2015)
inzulin s L-CPP	2IU/d					<ul style="list-style-type: none"> <li>BA &lt; 3%</li> <li>mozak +</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>saturabilnost +</li> <li>ispitan utjecaj raznih inhibitora transporta</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>IN Inz dospijeva u mozak na siguran način</li> <li>proces je saturabilan, neg reguliran s PKC</li> </ul>	
$^{125}I$ -inzulin	1x400 000 cpm/ $\mu L$	-	zdravi miševi	-	-				

Lijek	Doza	ΔT	Životinjski model	Karakteristike životinjskog modela:		Rezultati studije		Zaključak/komentar	Ref. (god)
				vezane uz DM	vezane uz AB	1'	2'		
inzulin	1xPLC 1x2IU	-	12 mjeseci stari SAMP8 miševi (model ubrzanog starenja)	InzΩ, HGlc	Aβ↑, neurodeg,k ognicija↓@ 4mj, depresija↑	<ul style="list-style-type: none"> <li>T-maze: trening {akv.} + testiranje (nakon 1tj) {ret.}</li> <li>doziranje prije treninga i testiranja <ul style="list-style-type: none"> <li>@-5' {akv. N/A, ret.↑}</li> <li>@-1tj {akv.↑, ret.↑}</li> </ul> </li> <li>NOR: trening svaki d kroz 2tj + 1x testiranje (nakon 1d)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>doziranje nakon treninga, prije testiranja <ul style="list-style-type: none"> <li>@-5' {akv. N/A, ret.↑}</li> <li>@-1d {akv. N/A, ret.=}</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- kronični IN Inz ↑ kogniciju</li> <li>- akutni učinak IN Inz ovisi o tempiranju doze</li> </ul>	[44] (2015)
	2IU/2d	2 tj				<ul style="list-style-type: none"> <li>akutni učinak <ul style="list-style-type: none"> <li>@1d {ret. ↑}</li> </ul> </li> <li>kronični učinak <ul style="list-style-type: none"> <li>@2tj+1d {ret. ↑↑}</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>kognicija ↑</li> </ul>		
inzulin +/- BSA	0.112%oinj /g	4 mj	zdravi miševi, mladi SAMP8 miševi, stari SAMP8 miševi	InzΩ, HGlc	↑Aβ, neurodeg,k ognicija↓@ 4mj, depresija↑	<ul style="list-style-type: none"> <li>vnu = 5 min</li> <li>vtu = 1h</li> <li>mozak +</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>kognicija ↑</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- fenotip ne utječe na ΦK</li> <li>- BSA ↑ dopremu u mozak</li> <li>- kognitivno poboljšanje u stariji-SAMP8</li> </ul>	[45] (2017)
inzulin	PLC/2d ili 2IU/2d	2 mj	3xTg miševi (model fAB)	InzΩ, HGlc	Aβ plakovi, NFT, kognitivno↓ @4mj	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ kratkoročna memorija</li> <li>↓ depresivno ponašanje</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓τ*, ↑oligo-Aβ</li> <li>↓β3-nitrotirozin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inz djeluje očekivano</li> <li>- BVR-A neophodna za korisni učinak Inz</li> </ul>	[46] (2019)

Inzulin se odnosi na regularni inzulin. Ako nije naznačeno koncentracije se odnose na krv/serum. Skraćenice: IN (intranasalno), ΔT (trajanje primjene lijeka), InzΩ (inzulinska rezistencija), AB (Alzheimerova bolest), DM (dijabetes melitus), PLC (placeto), μEm (mikroemulzija), akv. (akvizicija), ret. (retencija), vnu (vrijeme nastupka učinka), vtu (vrijeme trajanja učinka), th (terapija), SAMP8 (model ubrzanog starenja), ΦK (farmakokinetika), ΦD (farmakodinamika); @ (vremenska točka), d (dan), tj (tjedan), mj (mjesec), god (godina); H (hiper), h (lipo), S- (serum), C- (CSF), [A] (koncentracija od A), ↓ (negativna promjena), ↑ (pozitivna promjena), = (nema promjene), % (postotno), :O (u odnosu na subjekt), :P (u odnosu na placebo), + (prisutno), - (nedostaje); w (voda), Glc (glukoza), τ\* (fosfo τ-protein), BVR-A (biliverdin reduktaza A), CPP (stanično permeabilni peptid), PKC (protein kinaza C), BSA (goveđi serumski albumin).

saturabilan ili ne, tj. drugim riječima da li je također aktivan ili pasivan.[39] Detaljnije istraživanje tog procesa s farmakokinetikog i farmakodinamičkog gledišta je potrebno.

Sistemske djelovanje IN inzulina (u vidu hipoglikemije i poticanja glukokortikoidnog i kateholaminskog odgovora) je zanemarivo ukoliko kumulativne doze inzulina ne prelaze 200IU. Istraživanja su našla da manje od 3% IN primjenjenog inzulina dospjeva u sistemsku cirkulaciju. [38, 39]

Prepoznate varijable koje utječu na dopremu IN inzulina u mozak su postotak dopreme inzulina do olfaktornog epitela i vrijeme zadržavanja inzulina na olfaktornom epitelu. Mukocilijarni i enzimatski klirens olfaktorne regije su faktori koji jako utječu na ukupnu količinu lijeka potrebnog da bi se inzulin probio do mozga u odgovarajućim koncentracijama. Lokalno nazomukozno toksično djelovanje inzulina također je jedan limitirajući faktor koji favorizira što efikasniju IN dopremu inzulina. Od IN primjene inzulina se očekuje da bude mirisno neutralna i da ne ovisi pretjerano o edematoznom stanju sluznice nosa. [37]

Farmakotehnoški tome se doskočilo formuliranjem lijekova za IN primjenu u mukoadhezivne vehikule i nanočestičnom formulacijom lijekova za IN primjenu čime se oni štite od enzimatske razgradnje dok ne dođu u CSF. [37] Kako je ovo relativno novo područje, uređaji za IN primjenu nisu slobodno dostupni na tržištu, a dio tog istraživanja je privatn, dostupno je malo podataka o točnoj izvedbi takvih uređaja i njihovoj efikasnosti.

Alternativni načini dopreme inzulina u moždani parenhim poput intracerebroventrikularne infuzije ili injekcije nisu pogodni za kliničku upotrebu u ljudi, ali se rutinski koriste u pretkliničkim pokusima na životinjama. Također, pareneteralne euglikemične-hiperinulinemične klemme u početku su se koristile u istraživanju djelovanja inzulina na mozak u životinjama i ljudima, ali onemogućuju diferencijaciju učinka glukoze, inzulina i drugih perifernih činitelja te nose neželjene nuspojave poput indukcije periferne inzulinske desenzitizacije. [38] IN primjena inzulina definitivno je favorizirani način dopreme inzulina u mozak ali potrebno je još pretkliničkih i kliničkih studija da bi takav način primjene inzulina (i ostalih lijekova) ušao u rutinsku praksu.

## 4.2 Pretkliničke studije intranazalne primjene inzulina

Farmakokinetika i farmakodinamika intranazalne primjenjene lijekova (uključivo i inzulina)

ispitivana je prvo u pretkliničkim studijama na eksperimentalnim modelima neke ciljane bolesti, počevši od staničnih kultura do in vivo životinjskih modela. U kontekstu objašnjavanja patogeneze AB, razna istraživanja na staničnim kulturama, životinjskim modelima i ex vivo neuronima su već ranije komentirane. Ovdje su prikazana neka pretklinička istraživanja koja se tiču primjene i farmakokinetike IN inzulina, te neka pregledna istraživanja potvrde koncepta (eng. *proof-of-concept*) djelovanja IN inzulina, istraživanja utjecaja režima davanja IN inzulina na njegovo djelovanje i istraživanja mehanizma djelovanja IN inzulina. Pregledno popisane studije, njihov postav i rezultati navedeni su u Tablici 3.

**Sinov i suradnici. (2010)** [42] objavio je istraživanje na životinjskom modelu New Zealand zečeva s induciranim DM gdje je pokazao kakve systemske efekte ima IN inzulin i njegove različite formulacije. Koristio je brzodjelujući inzulin-lispro, u tri različite formulacije: čistu vodenu otopinu, mikroemulziju s većim udjelom vode i mikroemulziju s većim udjelom ulja. Prikazano je da inzulin-lispro u čistoj vodenoj otopini ne izaziva systemski učinak u vidu hipoglikemije, dok visokouljna mikroemulzija izaziva značajnu hipoglikemiju. To je razumljivo za stajališta da lipofilna formulacija lakše prolazi staničnu barijeru krvožilnog endotela nosne šupljine i tako ulazi u systemsku cirkulaciju. Nadalje, koristeći transmisijski elektronski i obični mikroskop, studija karakterizira mikroemulzijsku formulaciju u vidu veličine kapljica i permeabilnosti različitih formulacija kroz zečju nazalnu mukozu. Potvrđeno je da mikroemulzijska formulacija ima duplo veću permeabilnost te tako i vrijeme nastupa pretpostavljenog centralnog učinka IN inzulina. Studija i potvrđuje da doza od 1IU/kg postiže središnje koncentracije inzulina za koje se pretpostavlja da mogu izazvati aktivaciju inzulinskog signalnog puta u mozgu. Autori studije zaključuju da je niskouljna mikroemulzijska formulacija IN inzulina najkorisnija za daljnja istraživanja.

**Kamei i suradnici (2015)** [43] nastavlja farmakokinetička istraživanja dodajući u vodenu formulaciju regularnog ljudskog inzulina CPP (stanično permeabilni peptid), ciklički peptid koji je topiv u staničnoj membrani i nije podložan lakoj enzimatskoj razgradnji te ulazi u nekovalentni spoj s inzulinom. Hipoteza studije je da će CPP povećati dopremu IN inzulina u moždano tkivo te smanjiti periferni učinak hipoglikemije. Koristeći icv-STZ štakorski model, primjenom inzulina u dozi od 2IU/d potvrđeno je imunohistokemijski da i L- i D- izoforma CPP dopremaju inzulin u moždani parenhim, te da D-izofoma CPP-a izaziva još manje nuspojava od L-izoforme. Provedeći doziranje IN inzulinom s D-izofomom kroz daljnjih 6 mjeseci, istraživači su potvrdili da kognitivno zaostali icv-STZ štakori pokazuju bolje kognitivne sposobnosti, smanjenu depresiju, a

imunohistokemijski njihovo moždano tkivo pokazuje manju hiperfosforilaciju  $\tau$ -proteina.

**Salmeh i suradnici. (2015)** [44] također provode istraživanje koje ima farmakokinetiku (koristeći  $^{125}\text{I}$ -obilježeni regularni inzulin) i farmakodinamsku granu i ispituje je li kronična ili akutna upotreba IN inzulina odgovorna za njegove blagotvorne učinke na konsolidaciju pamćenja.

Farmakokintetska grana tog istraživanja je pomoću Giger-Müllerovog brojača pokazala da je bioraspoloživost obične vodene otopine inzulin primjenjenog sprejom IN manja od 3%, što osigurava zanemarive sistemske učinke. Doprema IN inzulina u moždani parenhim je potvrđena. Istraživanje dinamike te apsorpcije u moždani parenhim pokazalo je da je za to odgovoran saturabilni transport, lociran uz neuronalna vlakna i krvožilne puteve nosnog epitela. Zanimljivom serijom ispitivanja učinka dosad poznatih blokatora staničnog i međustaničnog transporta pokazano je da svi blokatori (npr. lidokain i PMA) i induktori (npr. verapamil, monezin, filipin) tog transporta imaju zajedničku interakciju s PKC (u slaganju s tim jesu li blokatori ili induktori transporta) i ultimativno da je taj saturabilni transport negativno reguliran aktivnošću PKC. Kao što je u ranijem potpoglavlju spomenuto, a i komentirano u studiji [44], ovo istraživanje ne daje konačne odgovore na pitanje mehanizma dopreme IN inzulina u mozak.

U farmakodinamičkoj grani, Salmeh et al. proučavali su na 12 mjeseci starim SAMP8 miševima (model ubrzanog starenja) utjecaj regularnog IN inzulina na dvije vrste pamćenja (prostorno u T-maze testu i vizualno u NOR zadatku) u više režima primjene inzulina. Režimi od interesa su bili (sub)kronična primjena 2IU/2d IN inzulina kroz 2 tjedna ili jednokratna primjena 2IU u precizno odabranim trenucima u odnosu na vrijeme treninga ili testiranja miševa. Rezultat tog dijela studije je bio da IN inzulin primjenjivan kronično pomaže s pamćenjem u NOR zadatku, kao i da primjena inzulina jednokratno 1-7 dana prije treninga i testiranja s latentncijom podiže rezultate miševa i u stjecanju vještina u treningu i retenciji vještina pri testiranju, ali ne i primjena inzulina nakon treninga, a prije testiranja u svim okolnostima. Rezultati ove grane studije [44] upućuju da IN inzulin ima djelovanje u kroničnoj i akutnoj primjeni, ali da je njegovo akutno djelovanje ovisno o tempiranju u odnosu na radni zadatak. Akutna primjena ima latenciju od barem sedam do minimalno jednog dana u utjecaju na stjecanje i konsolidaciju novih informacija, ali samo da bi utjecala na konsolidaciju mora biti dana unutar 24 sata od zadatka. Moglo bi se reći da ovi zaključci govore o tome koje molekularne procese pamćenja potpomaže IN inzulin, ali to je teško dokazati iz ovakvih podataka i eksperimentalnog postava. Možda je najveći značaj ovih rezultat u tome što otvaraju pitanje je li korisno primjenjivati IN inzulin prije spavanja ili ujutro, jednom kad bi IN inzulin postao odobrena terapija.

Studija [45], autora **Rhea i suradnika. (2017)**, na tri je različita mišja modela ispitala



farmakokinetiku IN primjene regularnog inzulina u kombinaciji s i bez BSA (goveđi serumski albumin) i njegovu dopremu u mozak. Imunohistokemijski je potvrđena uspješna doprema u mozak, ali nije bilo značajnih razlika u vremenu nastupa učinka i trajanja učinka intranazalnog inzulina među fenotipski različitim modelim. Time je pokazano da, osim što je doprema IN inzulina u mozak brza, efikasna i dugotrajuća, ona ne ovisi o biološkim karakteristikama subjekta što bi imalo implikacije za uniformno doziranje IN inzulina u ljudi prema masi (moždanoj). Također, studija [45] pokazuje da BSA modulirajući lipofilnost BSA-inzulin spoja povećava dopremu inzulina u mozak. Studija je i potvrdila kognitivno poboljšanje SAMP8 miševa pod terapijom IN inzulinom.

**Barone i suradnici. (2019)** [46] proučavali su djelovanje IN inzulina na kogniciju, raspoloženje, biokemijske parametre AB te biokemijski stres izazvan dušikovim radikalima u 3xTg miševima dozirajući ih s 2IU/d IN regularnim inzulinom. Rezultati ovog istraživanja pokazali su očekivano djelovanje inzulina na kogniciju, raspoloženje i biokemijske parametre (smanjen nitrozaminski stres). Daljnjom serijom ex-vivo eksperimenata kojima su se pokušali objasniti mehanizmi tog djelovanja, posebice s osvrtom na smanjenje nitrozaminskog stresa, pokazano je da je biliverdin reduktaza A, poznati stanični antioksidativni enzim, preduvjet za protektivno djelovanje inzulina. Blokiranje njene ekspresije, a dozvoljavanje inzulinskog podražaja ex-vivo stanica produciralo je višak RNS koji je mogao biti samo blokiran dodatkom biliverdin reduktaza A mimetičnog peptida. Čini se da aktivacija inzulinske signalne kaskade dovodi do pojačanog oksidativnog stresa stanice koji je inače kompenziran, ali je pitanje bi li u slučaju prejake aktivacije te kaskade djelovanje inzulina moglo biti štetno i već prethodno spomenutim mehanizmima potaknuti umjesto spriječiti neurodegeneraciju. Možda u ovakom i sličnim efektima treba tražiti objašnjenje obrnutog-”U” učinka inzulina na kognitivne sposobnosti kako javlja klinička studija [54] koja će biti komentirana kasnije.

Ovaj pregled pretkliničkih istraživanja pokazuje da je primjena IN inzulina vjerojatno sigurna, farmakokinetički povoljna i potencijalno efektivna terapija za liječenje kognitivne disfunkcije. Studije se dotiču i detalja koliko individualna farmakokinetika IN primjene varira, kako odabrati ispravnu dozu te kada je dati. Također, pretkliničke studije mogu poslužiti proučavanju mehanizma učinka lijeka od interesa.

Npr. studija [47], koja nije navedena u tablici 3 jer nije direktno povezana s primjenom IN inzulina, pokazuje kako je razvoj molekularnih alata za praćenje staničnih efekata djelovanja lijeka koristan način proučavanja mehanizma djelovanja tog lijeka. Motivirano željom za kvantifikacijom

Tablica 4. Tablični prikaz kliničkih studija sa IN primjenom lijekova.

Lijek	Doza	ΔT	Ispitanici	Schema studije	Mjere i ishodi		Zaključak/komentar	Ref. (god)
					1'	2'		
melano kortin	1x5mg 1x10mg	-	zdravi 9Ž+27M dob: 25-41	V@10' {} PLC +	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑C-[d], ↑↑C-[D]</li> <li>C-vnu&lt;30'</li> <li>C-vtu&gt;100'</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>S-[d/D] =</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- neuropeptidi ulaze u CSF u manje od 10'</li> <li>- značenje intersubjektivne varijacije</li> <li>- transport preko BBB je zanemariv u sl. Inz</li> <li>- C-AUC obrnuto proporcionalan sa Mr</li> </ul>	[49]* (2002)
	1x40IU							
inzulin	1x40IU	-						
inzulin, humani	4x0IU/d 4x40IU/d	8 tj	zdravi (CTR) 24M+14Ž	@1tj,3tj,10tj {} 1 koh(PLC) → 2 koh(PLC/D) (crossover@2tj)	<ul style="list-style-type: none"> <li>prisjećanje liste riječi (nakon 3') =</li> <li>prisjećanje liste riječi (nakon 1 tj) ↑ (p &lt; 0.05)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Stroop test =</li> <li>raspoloženje/afekt (smirenost ↑, samopouzdanje ↑)</li> <li>S-[Glc, Inz] =</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- subkronični IN Inz je učinkovit u ↑ dugoročnog pamćenja i raspoložena subkronični IN Inz nije učinkovit u ↑ akutne konsolidacije memorije</li> <li>- nisu zabilježene nuspojave</li> </ul>	[50] (2004)
	1X0IU 1X40IU	-		@0tj {} + crossover@1tj	<ul style="list-style-type: none"> <li>prisjećanje liste riječi (nakon 1 tj) = :O</li> </ul>	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>- IN Inz ne pokazuje akutni učinak na konsolidaciju memorije</li> </ul>	
inzulin aspart	4x0IU/d 4x40IU/d	8 tj	zdravi (CTR) 36M	@1tj,3tj,10tj {} 1 koh(PLC) → 2 koh(PLC/D) (crossover@2tj)	<ul style="list-style-type: none"> <li>prisjećanje liste riječi (nakon 1 tj) = @3tj, ↑@10tj</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>S-[Glc, Inz] =</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- subkronični IN inzulinaspart je učinkovit u ↑ dugoročnog pamćenja inzulinaspart je učinkovitiji od humanog inzulina (p &lt; 0.05)</li> </ul>	[52] (2007)
	1x0IU 1x20IU 1x40IU	-	aMCI/bAB 13MŽ+13MŽ+ 35CTR dob: 55-85	@-15' {} PLC+ stratifikacija po MŽ i APOE alelu	<ul style="list-style-type: none"> <li>prisjećanje priče (nakon 10')</li> <li>(CTR = MCI/AB')</li> <li>prisjećanje liste riječi (nakon 10')</li> <li>(CTR = aMCI/bAB; APOEε4- ↑, Ž+APOEε4+↓)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>eng. self-ordered point task =</li> <li>Stroop test =</li> <li>test vizualne pretrage =</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- IN Inz nije akutno učinkovit u memorijskoj konsolidaciji u kontroli, ali je u aMCI/bAB</li> <li>- Učinkovitost ovisi o spolu i APOEε4 statusu</li> </ul>	[51] (2006)

Lijek	Doza	ΔT	Ispitanici	Shema studije	Mjere i ishodi		Zaključak/komentar	Ref. (god)
					1'	2'		
inzulin, humani	2x0IU/d 2x20IU/d	3 tj	aMCI/bAB 12MŽ+13MŽ-1	@0tj, 3tj {} PLC+	<ul style="list-style-type: none"> <li>prisjećanje priče (nakon 20') ↑ (p &lt; 0.04)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Stroop test ↑ (p &lt; 0.04)</li> <li>ADCS-ADLi ↑</li> <li>S-[Glc, Inz] =</li> <li>S-[Aβ<sub>40</sub>] ↑, S-[Aβ<sub>42</sub>] =</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>IN Inz je subkronično učinkovit u ↑ kognicije u aMCI/bAB</li> <li>učinkovitost je vidljiva i u lab. parametrima AB</li> </ul>	[53] (2008)
inzulin, humani	0IU/d 20IU/d 40IU/d	4 mj	aMCI/bAB 30(PLC)+36(d) +38(D)	@0mj, 4mj {} PLC+ 2xsljepa [54]; stratifikacija po MŽ i APOE alelu [40]	<ul style="list-style-type: none"> <li>prisjećanje priče (nakon 20'): (d) ↑ (D) =</li> <li>reanaliza istog ishoda: (MŽ, APOEε4+: d↑D=), (M, APOEε4+: d↑D↑), (Ž, APOEε4+: d↑, D↓)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>CDR-SB: (d/D) ↑</li> <li>FDG-PET (d/D) %↑:P</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>u CDR-SB IN Inz učinkovit je pri svim dozama</li> <li>u kogniciji, IN Inz učinkovitiji je pri nižoj dozi (obrnuti U-efekt)</li> <li>reanaliza[40]: utjecaj na memoriju je bio značajno povezan sa spolom i APOEε4 statusom</li> </ul>	[54] (2012); [40] (2013)
inzulin glutuzin	1x20IU	-	9 b-uAB dob: 65-85 APOEε4+	@20' {} crossover@1tj	<ul style="list-style-type: none"> <li>psihometrijska procjena slična MoCA = (po komponentama: TMT-B ↑ (p &lt; 0.05))</li> <li>olfaktorna funkcija =</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>S-[Inz] ↓ 19%, =</li> <li>S-[Glc] =</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>IN inzulín-glutuzin ne pokazuje značajni akutni efekt na memoriju i kognitivne sposobnosti kod APOEε4+ ispitanika</li> </ul>	[55] (2014)
inzulin detemir	0IU/d 20IU/d 40IU/d	3 tj	aMCI/b-uAB 20+21+19	@0tj, 3tj {} PLC+, 2xsljepa stratifikacija po APOE alelu i InzΩ (HOMA-IR/OGTT-AUC)	<ul style="list-style-type: none"> <li>prisjećanje priče+liste riječi (nakon 0' + 20'): (d) =, (D) ↑ (p &lt; 0.05) :O:P</li> <li>korelacijska analiza za D: (APOEε4+ ↑, APOEε4- ↓: p &lt; 0.02), (+ korelira s InzΩ: p &lt; 0.02)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>verbalna i vizuospacijalna radna memorija : (d) =, (D) ↑</li> <li>Stroop test (=)</li> <li>CDR-SB (=)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>inzulin-detemir je učinkovit u ↑ memoriju i kognitivne sposobnosti u višim dozama</li> <li>učinkovitost je izraženija kod 1) APOEε4+ ispitanika, a kod APOEε4- pokazuje suprotno djelovanje; 2) inzulinski rezistentnijih ispitanika</li> </ul>	[56] (2014)

Lijek	Doza	ΔT	Ispitanici	Schema studije	Mjere i ishodi		Zaključak/komentar	Ref. (god)
					1'	2'		
inzulin, humani	0IU/d 40IU/d	4 mj	aMCI/b-uAB 12+12+12	@0mj, 2mj, 4mj {} PLC+ 2xsljjeпа	<ul style="list-style-type: none"> <li>prisjećanje priče+liste riječi (nakon 1tj) ↑ (p &lt; 0.03) :O:P</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>ADAS-Cog (=), CDR-SB (=)</li> <li>volumetrijski MRI =</li> <li>C-[τ*181/Aβ<sub>42</sub>] ↓</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>regularni IN Inz pokazao je očekivane promjene</li> <li>inzulin-defemir nije dugoročno učinkovit u ↑ memorije</li> <li>iako statistički nedovoljno snažna, studija ukazuje da inzulin-defemir je učinkovitiji u APOEε<sub>4</sub>+ ispitanika</li> </ul>	[57] (2017)
inzulin detemir					<ul style="list-style-type: none"> <li>prisjećanje priče+liste riječi (nakon 1tj) : (@2mj ↑, @4mj =) :O:P</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>ADAS-Cog (=), CDR-SB(=)</li> <li>volumetrijski MRI ↓</li> <li>C-[τ*181/Aβ<sub>42</sub>] =</li> </ul>		
inzulin, humani	0IU/d 20IU/d 40IU/d	4 mj	aMCI+bAB 56+35	@0mj, 4mj {} PLC 2xsljjeпа	<ul style="list-style-type: none"> <li>ADAS-Cog ↓ :P</li> <li>MMSE =</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>S-lpS312-IRS-1] =</li> <li>S-lpY-IRS-1] =</li> <li>koreliraju s ΔADAS-Cog</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>pozitivni efekt IN inz već pri 20IU/d</li> <li>iznos EV markera snažno korelira s ΔADAS-Cog</li> <li>korelacija je jača za APOEε<sub>4</sub>-</li> </ul>	[58] (2019)
inzulin, humani	0IU/d ili 40IU/d	12 mj + 6 mj	aMCI/b-uAB 155M+134Ž-42 dob: 55-85 IN uređaj: I109POD  aMCI/b-uAB N = 42 dob: 55-85 IN uređaj: ViaNase	V@3mj {} PLC + 2xsljjeпа (12mj) otvoren (6mj)	<ul style="list-style-type: none"> <li>ADAS-Cog = :P</li> <li>ADCS-ADLi = :P</li> <li>ishodi ponovljeni u ekstenziji studije</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>C-[Aβ<sub>40</sub>, Aβ<sub>42</sub>, Στ, τ*181, Inz] =</li> <li>volumetrijski MRI hycmp Ⓞ↓</li> <li>ishodi ponovljeni u ekstenziji studije</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>kohorta koja je koristila I109 POD uređaj za IN primjenu nije pokazala kliničku korisnost IN Inz</li> <li>kohorta koja je koristila ViaNase uređaj za IN primjenu je pokazala kliničku korisnost IN Inz, ali statistički nije moćna</li> </ul>	[59] (2020)

\*za ove kliničke studije stupac "Mjere i ishodi" treba interpretirati kao dobivene skupne rezultate studije. Inzulin se odnosi na regularni inzulin. Ako nije naznačeno koncentracije se odnose na krv/serum. Skrećenice: IN (intranazalno), M (muški), Ž (ženski) ΔT (trajanje primjene lijeka), koh (kohorta), InzΩ (inzulinska rezistencija), AB (Alzheimerova bolest), b-uAB (blagi/unjereni stadij AB), aMCI (amnestički blagi kognitivni poremećaj), PLC (placebo), CTR (kontrolni ispitanici), EV (ekstracelularne vezikule), Mr (molekularna masa), vnu (vrijeme nastupka/vršnog učinka), AUC (povišina trajanja učinka), OGTT (test opterećenja oralnom glukozom), hycmp (medijalni temporalni korteks), ADAS-Cog (eng. AD Assessment Scale - Cognitive section), ADCS-ADLi (eng. AD Cooperative Study - activities of daily living inventory), CDR-SB (eng. Clinical Dementia Rating - Sum of Boxes), FDG-PET (fluorodeoksiglukozna-pozitronska emisijska tomografija); V (svaki), {, } (mjereno), D (viša doza/lijek), d (niža doza), @ (vremenska točka), ' (minuta), d (dan), tj (tjedan), mj (mjesec), god (godina); H (hiper), S- (serum), C- (CSF), [A] (koncentracija od A), ↓ (negativna promjena), ↑ (pozitivna promjena), = (nema promjene), % (postotno), :O (u odnosu na subjekta), :P (u odnosu na placebo), → (prelazak), ++ (izraženo prisutno), + (prisutno), - (nedostaje), Ⓞ (slabo); Glc (glukoza), Στ (ukupni τ-protein), τ\*181 (181-fosfo τ-protein).

razine aktivnosti IR na molekularnoj razini, u toj studiji je razvijen konstitutivno aktivan IR te je uz pomoć 2-NBDGa (metabolizabilnog fluorescentnog glukoza-analoga) kvantificiran ulazak glukoze u stanicu i njena potrošnja u mitohondriju. Uočeno je da konstitutivna aktivnost IR na neuronima dovodi do povećanog unosa (obilježene) glukoze u stanicu putem GLUT izoforme. U tijeku su istraživanja tog tima koji bi GLUT transporter bio specifično odgovoran za taj efekt.

### 4.3 Kliničke studije intranazalne primjene inzulina

Kliničke studije ispituju primjenu nekog lijeka u ljudi. Provode se u više faza kroz koje se redosljedom pokušava utvrditi farmakokinetika i farmakodinamika nekog lijeka u određenoj populaciji, ovisnost učinaka o dozi i režimu doziranja lijeka, učinkovitost lijeka za postavljenu indikaciju, sigurnost i podnošljivost lijeka te vrsta i težina nuspojava. Svaka faza mora biti unaprijed isplanirana i dobro pripremljena da bi bila odobrena za provedbu od strane regulatornog tijela. Osim etičkog, vrlo je važan i statistički aspekt provedbe kliničkih studija. Svaka klinička studija mora biti dobro statistički potkovana, što znači da podataka mora biti dovoljno da se ostvare traženi zaključci, i ovisno o naravi podataka da ostvareni zaključci budu statistički značajni. Često puta je to vrlo teško predvidjeti, pa je moguće u sredini provođenja studije angažirati neovisnu treću stranu koja pregleda dotad skupljene podatke, njihove trendove i na osnovu dodatne statističke analize svrsishodnosti (eng. *futility analysis*) odluči preporučiti obustavu kliničke studije ili nastavak i moguće proširenje broja ispitanika, trajanja studije ili promjenu neke od mjera studije. Interimna analiza svrsishodnosti često puta je financijski bitna u redukciji troškova za istraživanje tog lijeka, jer su osim radnog materijala i ljudskih resursa u cijenu kliničkog istraživanja uključeni i novčani poticaji za ispitanike (samo za zdrave dobrovoljce u 1. fazi ispitivanja) kao i osiguranja od moguće štete.

Istraživanje inzulina nije opterećeno velikim brojem gornjih razmatranja zbog toga jer je inzulin lijek koji je već dugo na tržištu, njegove nuspojave su poznate i pokazao se kao relativno siguran lijek. Međutim, uslijed blagog učinka većine anti-AB lijekova, pa tako i IN inzulina, na kogniciju (kao što će biti komentirano) potrebni su veći brojevi ispitanika da bi statističke analize bile dovoljno snažne i značajne.

Internet-stranica [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov) je stranica baze podataka o kliničkim studijama u tijeku ili već završenim studijama. O ovome potpoglavlju prikazane su sve studije koje se mogu naći navedene u

toj bazi podataka, gotove su i javno su dostupne putem repozitorija baza znanstvenih članaka na temu primjene IN inzulina u bolesnika s MCI ili AB. Studije su pregledno navedene u Tablici 4., gdje je istaknut dizajn, mjere, ishodi i zaključci studija. Većina studija je randomizirana, dvostruko slijepa (uključuje korištenje placebo) i paralelnog je ili *crossover* dizajna. Bave se farmakokinetikom IN primjene inzulina, djelovanjem IN inzulina na zdrave i kognitivno oštećene ispitanike te učincima jednokratnog i višekratnog doziranja različitih tipova inzulina ovisno o nekim prepoznatim varijablama poput spola ili APOEε4 statusa, koje bi mogle imati utjecaja na ishod studije.

Prva studija u pregledu, **Born i suradnici (2002)** [49], jedina je dosad provedena javno dostupna klinička studija koja se bavi farmakokinetikom IN primjene neuropeptida u ljudi. Studija je provedena na 36 zdravih volontera u dobi od 25 do 41 godine kojima su IN primjenjena tri neuropeptida različitih molekularnih masa: melanokortin, vazopresin i inzulin. Ispitivana je koncentracija tih lijekova u krvi i CSFu u intervalima po 10 minuta u toku dva sata. Studija zaključuje da iako među ispitanicima postoje značajne varijacije u dozama neuropeptida u krvi i CSFu, oni ulaze u CSF unutar manje od 10 minuta. U perifernoj krvi se pojavljuje samo vazopresin i to u koncentraciji većoj nego u CSFu. Shodno tome, IN inzulin ne izaziva hipoglikemiju. Istraživači zaključuju da u slučaju melanokortina i inzulina transport u CSF ne teče preko BBB, ili je taj doprinos neznatjan. Vazopresin vjerojatnije iz nosne šupljine prelazi u krvotok i potom ulazi u CSF, pošto je nađena korelacija između povišenja bazalne CSF koncentracije vazopresina i mjerene koncentracije u krvi po primjeni vazopresina. U hipotetiziranju kojim putem se događa transport mimo BBB, istraživači zastupaju stajališta izražena u potpoglavlju 4.1, a pokazano je da je površina ispod krivulje koncentracija u CSFu tijekom vremena obrnuto proporcionalna molekularnoj masi neuropeptida. Teži spojevi daju sporiji porast i manju maksimalnu vrijednost koncentracije u CSFu. To govori u prilog procesu potaknutom slobodnom difuzijom.

Skupina **Benedict i suradnici** bavi se istraživanjem učinaka IN inzulina u zdravih pojedinaca, te je u studijama [50] i [52] istražen učinak regularnog IN inzulina i brzodjelujućeg IN inzulina-aspart na različite kognitivne mjere.

U studiji [50] prisustvovalo je zdravih 38 ispitanika kojima je kroz 8 tjedana IN primjenjivan regularni inzulin u dozi od 4x40IU/d ili placebo. Testirane su mjere deklarativne i nedeklarativne memorije, raspoloženje i biokemijske varijable u krvi bazalno i nakon 8 tjedana doziranja lijeka.

Za test deklarativnog pamćenja (funkcije hipokampusa) odabran je test prisjećanja liste od 30 riječi koje je ispitanik memorirao neposredno ili tjedan dana prije. Nedeklarativno pamćenje ispitalo



se primjenom Stroopova testa što je mjera funkcije frontalnog korteksa. Stroopov test testira koliko brzo ispitanik može odlučiti da li je diskordantna riječ ona koja je tražena. Naime, diskordantne riječi su ona imena boje koje su napisane fontom koji nije te boje. Ispitanik se nalazi u dilemi na koji podražaj, značenjski ili vizualni, treba reagirati shodno tome koji mu je zadatak dan (da li se traži žuta boja ili žuti font?). Test ispituje radnu memoriju i egzekutivnu funkciju povezanu s funkcijom održavanja pozornosti (karakteristika frontalnog korteksa).

Studija [50] zaključuje da subkronična primjena IN inzulina poboljšava mjere odgođene deklarativne memorije, ispitanike čini smirenijima i više samopouzdanima. IN inzulin nema utjecaja na prisjećanje netom memoriranih riječi, tj. ne pomaže u akutnoj konsolidaciji memorije. Subkronična primjena IN inzulina nema utjecaja na mjere nedeklarativne memorije, glikemiju ni inzulinemiju. Rezultati tog istraživanja u skladu su s pretkliničkim istraživanjima [44].

Druga studija [52] provodi slično istraživanje samo koristi brzodjelujući inzulin-aspart u istoj dozi kroz 8 tjedana na 36 zdravih ispitanika. Od mjera koristi uglavnom test prisjećanja liste riječi enkodirane prije tjedan dana, a dio studije ispituje učinak samo jednokratne primjene IN inzulina-aspart na konsolidaciju memorije. Rezultati potvrđuju rezultate prethodne studije: subkronično dozirani IN inzulin-aspart poboljšava mjere deklarativne memorije i to čini učinkovitije od regularnog inzulina. Zbog činjenice da je inzulin-aspart brzodjelujući i pokazuje bolji učinak, moglo bi se doći na pomisao da je bitan akutni učinak inzulina. Međutim, rezultati drugog kraja studije pokazuju da jednokratna primjena IN inzulina-aspart ne pomaže kod akutne konsolidacije memorije ispitanika. Teško da se iz ovakvih pokusa nešto detaljno može zaključiti kako IN inzulin ostvaruje svoje učinke, osobito uzevši u obzir da studije nisu kontrolirale koliko je inzulina ukupno/vršno dospjelo u mozak ovisno o tipu inzulina. Možemo hipotetizirati da je za učinak potrebna opetovana stimulacija neurona inzulinom ili je kroničnom inzulinorafijom neuron trajno promijenjen i bolje kapacitiran vršiti funkciju. Daljnjim istraživanjem grupe Benedict i suradnici primjećeno je da je utjecaj na deklarativnu memoriju izraženiji u žena i pretelih muškaraca, te da ovisi o vremenu davanja inzulina. [11]

**Reger i suradnici (2006)** [51] prvi provode studiju na ispitanicima sa smanjenim kognitivnim sposobnostima. U studiji je jednokratno IN primjenjivan regularni inzulin 15 minuta prije tesiranja u 26 ispitanika oboljelih od aMCI ili AB i 35 zdravih kontrola. Testiran je kognitivni učinak IN inzulina na deklarativnu odgođenu memoriju putem testa prisjećanja riječi i priče 10 minuta nakon pokušaja memoriranja i učinak na nedeklarativne tipove memorije (putem npr. Stroop testa). Rezultati pokazuju da jednokratna primjena inzulina ne izaziva konsolidacijski učinak na

deklarativnu memoriju u kontrola (sukladno ranijim studijama), ali da izaziva učinak kod oboljelih od MCI/AB. Učinak na nedeklarativnu komponentu memorije nije primijećen ni u jednoj skupini. Detaljnom stratifikacijom kohorte bolesnika prema spolu i APOE $\epsilon$ 4 statusu, uočeno je da je na testu prisjećanja liste riječi učinak inzulina učinkovitiji kod APOE $\epsilon$ 4- bolesnika, a štoviše negativno djeluje na ishode kod APOE $\epsilon$ 4+ ženskih bolesnica.

Značaj ove studije je u tome što je pokazala da je u MCI/AB bolesnika konsolidacija memorije oštećena i u tome učinkovito pomaže IN inzulin. Efektivnost tog učinka moduliran je spolom i APOE $\epsilon$ 4 statusom.

**Reger i suradnici (2008)** u novoj studiji [53] provode višekratno IN doziranje regularnog inzulina u 25 MCI/AB bolesnika kroz 3 tjedna. U studiji su primarni ishodi bili mjerenje prisjećanja priče nakon 20 minuta na početku i kraju studije. Sekundarni ishodi su bili rezultat na Stroop testu, funkcionalnoj ocjenskoj ljestvici ADCS-ADLi te biokemijski markeri AB. Studija nije uključivala zdrave kontrole. Rezultati pokazuju učinkovitost subkronične primjene IN inzulina na deklarativnu i nedeklarativnu memoriju (Stroop test) te povećanje koncentracije topivog A $\beta$ <sub>40</sub> u krvi što je marker “poboljšanja” AB. Zbog trostrukog pozitivnog učinka, ova studija služi kao dokaz koncepta IN primjene inzulina u AB koja je inspirirala daljnje istraživačke napore u ovom kontekstu.

**Craft i suradnici (2012)** proveli su studiju [54] u trajanju od 4 mjeseca na MCI/AB bolesnicima s regularnim IN inzulinom u dozama 0-20-40IU/d. Namjera studije je bila ispitati doznu ovisnost kognitivnog odgovora na IN inzulin. Mjereno na početku i kraju studije, mjere kognitivnih ishoda bile su test prisjećanja priče nakon 20 minuta od memoriranja, rezultat na CDR-SB ocjenskoj ljestvici i metabolizam glukoze mjeren s FDG—PET. Primarna analiza rezultata ove studije [54] pokazuje da IN inzulin daje pozitivne metaboličke ishode (mjereno FDG-PETom) i funkcionalne kognitivne ishode (mjereno CDR-SB ocjenskom ljestvicom) u svim primijenjenim dozama, ali je osjetljiviji test deklarativne kognitivne funkcije, test prisjećanja priče, osjetljiv na dozu inzulina. Naime, jedino inzulin od 20IU/d pokazuje poboljšanje deklarativne memorije, što je dovelo do formuliranja obratnog-“U” tipa učinkovitosti IN inzulina. Prethodno navedena studija [46] navodi na moguće objašnjenje tog učinka kako je komentirano u ranijem potpoglavlju.

Detaljnija analiza [40] iste studije preciznije je proučila obratni-“U” tip dozno-ovisne učinkovitosti IN inzulina na deklarativnu memoriju. Primijećeno je, slično studiji [51], da za APOE $\epsilon$ 4- ispitanike, neovisno o spolu, vrijedi obratno-“U” hipoteza. Za APOE $\epsilon$ 4+ ispitanike učinak inzulina na višim dozama je iznenađujuće suprotan, ovisno o spolu. Muškarcima te podskupine više



doze inzulina su učinkovitije, a u žena anti-učinkovite (smanjuju deklarativnu memoriju u odnosu na placebo). Pokušaj objašnjenja ove spolne modulacije dozno-ovisne učinkovitosti inzulina o APOE statusu može se naći u prethodno navedenom istraživanju [40], a uključuje činjenicu da je u žena nađena bolja periferna regulacija inzulina i glukoze, što bi upućivalo da žene možda imaju slabiji središnji kompenzatorni mehanizam kod poremećaja koncentracije inzulina u CSFu te omogućivalo teže posljedice u slučaju te disregulacije.

**Rosenbloom i suradnici (2014)** [55] ponovili su studiju jednokratnog učinka brzodjelujućeg IN inzulina (ovaj put inzulín-glulizina) od Regeera i suradnika [52] na 9 MCI/AB bolesnika i zaključili da brzodjelujući inzulín-glulizín ne pokazuje akutnu učinkovitost na kognitivne funkcije, mada po nekim komponentama primjenjenog kompozitnog testa (TMT-B test) pokazuje učinkovitost. Jedna komponenta nekog većeg testa se ne može uzeti kao potpuno mjerodavna samostalno tako da zaključak o neučinkovitosti IN inzulína-glulizína u akutnoj konsolidaciji memorije ostaje.

Rezultati ove studije su u suprotnosti s rezultatima studije [51], koja nalazi akutnu konsolidaciju memorije kod MCI/AB bolesnika u slučaju jednokratne IN primjene regularnog inzulína. Razlog tome vjerojatno treba tražiti u loše odabranoj metrici i maloj veličini studije [55] (N = 9).

**Claxton i suradnici (2014)** [56] proveli su studiju učinka višekratnog dugodjelujućeg IN inzulína-detemira na kognitivne ishode u MCI/AB bolesnika kroz 3 tjedna. Na 60 bolesnika, kombinirana kognitivna mjera prisjećanja liste riječi i priče pokazuje učinkovitost inzulína-detemira na dozama od 40IU/d, što je veća doza nego što bi studije s obrnutom-”U” hipotezom pretpostavile. Korelacijska analiza stratificiranih kohorti ispitanika po spolu i APOE4 statusu pokazala je da je ta učinkovitost efektivnija za APOEε4<sup>+</sup> i inzulín rezistentne ispitanike. Prateća studija od Craft i suradnika [57] koja proučava taj učinak inzulína-detemira u razdoblju od 4 mjeseca, pokazuje da on gubi svoju učinkovitost s vremenom, ali sugerira da ju zadržava u APOEε4<sup>+</sup> podskupini.

Potencijalno objašnjenje ovog učinka može se naći u studiji [30] koja sugerira da APOEε4<sup>+</sup> ispitanici vremenski dulje zadržavaju IR u endocitotičnim vezikulama, pa bi produljena stimulacija s inzulínom-detemirom mogla objasniti njegovu pojačanu efikasnost u aktiviranju inzulínske kaskade.

**Mustapic i suradnici (2019)** donose zanimljivu studiju [58] u svijetlu rezultata jedne od prethodnih studija [56] da inzulínski rezistentniji ispitanici pokazuju efikasniji učinak IN inzulína-detemira i kliničko-patološke korelacije bolesnika s AB. Naime, u toj je kliničkoj studiji [58]

proučavan učinak 20IU/d i 40IU/d regularnog IN inzulina u trajanju od 4 mjeseca na 91 MCI/AB bolesniku. Na početku i kraju studije mjereno je kognitivna funkcija pomoću ADAS-Cog upitnika i u svim je doznim skupinama nađeno poboljšanje kognitivnog stanja u odnosu na placebo, što je očekivani rezultat.

Međutim, u ovom istraživanju provedene su dodatne analize u krvi ispitanika i mjereni novi potencijalni markeri inzulinske rezistencije mozga - pS312-IRS-1 i pY-IRS-1. To su posebno inhibitorno fosforilirani IRS-1 proteini, komponente inzulinske signalizacijske kaskade kao što je to ranije spomenuto u poglavlju 3. Oni su u krvi bili vezni za izvanstanične vezikule neuronalnog porijekla te mogu pružiti informaciju o inzulinskoj rezistenciji mozga. Mjereno na početku i kraju studije nije nađena promjena u koncentraciji pS312-IRS-1 i pY-IRS-1, ali pokazano je da promjena ADAS-Cog rezultat snažno korelira s navedenim biomarkerima, što upućuje da bi inzulinska rezistencija mozga na razini IRS-1 mogla biti podloga mehanizma djelovanja IN inzulina u MCI/AB bolesnika.

Nedavno su objavljeni rezultati velike kliničke studije **Craft i suradnika (2020)** [59] na 247 MCI/AB bolesnika u kojih je ispitan učinak IN primijenjenog regularnog inzulina. Mjereno ADAS-Cog i ADAS-ADLi ocjenskim ljestvicama rezultati ne pokazuju značajan učinak IN inzulina na kognitivne ishode bolesnika s MCI/AB. Međutim, studija je zbog poteškoća s uređajem za IN primjenu lijeka u početku razbijena u dvije kohorte, jednu manju koja koristi dosada korišteni uređaj ViaNase i veću s novim uređajem I109POD. Manja kohorta je pokazala učinkovitost IN inzulina na 42 bolesnika, ali naravno to nije očekivani cilj ove studije koja se trebala promatrati u studije faze 3 s još većim brojem sudionika.

Razlozi ovih promjena plana ispitivanja su neizvjesni, posebice zato jer se isti sporni uređaj uspješno koristi za IN primjenu oksitocina, a kao što je viđeno u ranije komentiranim pretkliničkim i kliničkim studijama, i obični sprej je dovoljan za uspješnu IN primjenu. Postavlja se pitanje mogućeg razloga zbog čega bi prethodne kliničke studije uvjerljivo pokazivale učinkovitost IN inzulina. Jedan od ponuđenih odgovora mogao bi se tražiti u efektivnom odsljepljivanju kliničkih studija s obzirom da ekscipiensi raznih inzulina uključuju m-krezol, i s njim specifičan miris koji ispitanika upućuje da je dobio placebo. [29]

U tijeku je još jedna druga klinička studije koje istražuje učinkovitost IN inzulina u DMT2 bolesnika na kognitivne i neurološke ishode. Osim konkretnog cilja studije (učinkovitost), dokaz učinkovitosti mogao bi pojasniti središnje-perifernu kauzalnost inzulinske rezistencije u AB

bolesnika. [29]

U ovim kliničkim studijama, pokazano je da je kognitivni učinak ishod koji je komplicirano pouzdano mjeriti, te da je potencijalna učinkovitost IN inzulina kompleksno modulirana spolom i APOEε4 statusom. Farmaceutska tehnologija i farmakologija suočene su poteškoćama u razvoju individualiziranog pristupa terapiji IN inzulinom koji se čini potreban da bi se optimalno kalibrirao učinak IN inzulina. S druge strane, možda je takva kalibracija potrebna samo za klinička istraživanja i pouzdanu procjenu učinka, jer jednom kada lijek izađe na tržište pacijenti će u suradnji s liječnicima moći individualno dozirati lijek već prema individualnim subjektivnim i objektivnim pokazateljima učinkovitosti.

## 5 Zaključak

Alzheimerova bolest je neurodegenerativna bolest starije populacije za koju se smatra da će vršiti značajan ekonomski i socijalni teret na društva sutrašnjice. Klinički se može klasificirati u genetski uzrokovani rijetki familijalni tip i puno češći sporadični tip nejasne etiopatogeneze i pojave simptoma u kasnijoj dobi. Procjenjuje se da je genetski doprinos nastanku AB multifaktorijalan i iznosi 70%. Kliničku sliku AB karakterizira prodromalno stanje s blagim kognitivnim poremećajem i gubitcima epizodnog pamćenja te progresivni razvoj do potpune demencije, nepokretnosti i smrti u toku jednog desetljeća. Dosadašnja terapija indicirana za liječenje AB je simptomatska, ograničene učinkovitosti i obuhvaća samo antikolinesterazne lijekove i memantin, te novi uvjetno odobreni adukanumab, monoklonalno protutijelo koje cilja A $\beta$  plakove.

Patohistološke karakteristike AB koje, uz pozitivnu kliničku sliku, čine i zlatni standard njene dijagnoze, su A $\beta$  plakovi i  $\tau$ -proteinski neurofibrilarni snopići. Oni uzrokuju sinaptičku i citoarhitektonsku disfunkciju neurona i neurodegeneraciju, ali ishodišna etiopatogeneza posebno učestalog sporadičnog oblika AB do danas je nerazjašnjena. Postoji više teorija etiopatogeneze ove bolesti, među kojima sve više privlači novija hipoteza o metaboličkim promjenama i inzulinskom rezistencijom u mozgu. Ova se hipoteza temelji na oštećenju staničnog metabolizma glukoze i neuroprotektivnih učinaka inzulinske signalizacije u mozgu koji bi sekundarno mogli uzrokovati porast koncentracija i nakupljanje A $\beta$  te hiperfosforilaciju  $\tau$ -proteina u mozgu. Mehanizmi nastanka središnje inzulinske rezistencije su heterogenic te još nisu u razjašnjeni, a interakcija središnje i periferne inzulinske rezistencije vrlo je kompleksna.

Obzirom na postojanje inzulinske rezistencije u mozgu u AB, novija istraživanja usmjerila su se na ispitivanje lijekova odobrenih za liječenje DMT2 kao mogućih novih lijekova za AB, a nedavno su započeta i istraživanja mogućeg terapijskog potencijala intranazalne primjene inzulina. IN primjena inzulina pokazala se kao učinkovita metoda zaobilaznja krvnomoždane barijere i sistemskih učinaka inzulina s ciljem dopreme inzulina u rezistentno moždano tkivo. Pretklinička istraživanja pokazuju da su inzulini i IN primjena inzulina učinkoviti u ublažavanju biokemijskih i kliničkih značajki neurodegeneracije u animalnim modelima. Rezultati dosadašnjih kliničkih istraživanja manje su konzistentni od pretkliničkih, dijelom zbog upitne translacije rezultata s modela koji većinom ne oponašaju sporadičan oblik AB, a dijelom zbog potencijalne heterogenosti ispitivanih bolesnika uslijed nepoznate etiopatogeneze. Iako ima studija nisu pokazale povoljan učinak IN inzulina, načelno, rezultati većine provedenih kliničkih studija upućuju na moguću

terapijsku učinkovitost IN inzulina koja, čini se, ovisi o dozi, a modulirana je također vrstom korištenog inzulina, spolom, APOEε4 status i razinom inzulinske rezistencije bolesnika. Potrebna su daljnja istraživanja za pojašnjenje terapijskog potencijala i mogućih ograničenja IN primjene inzulina kao novog terapijskog pristupa u liječenju AB.

# Literatura

- [1] Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's disease. *Eur J Neurol.* 2018;25(1):59-70. doi:10.1111/ene.13439
- [2] Alzheimer's Association. 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* 2016;12(4):459-509. doi:10.1016/j.jalz.2016.03.001
- [3] Salkovic-Petrisic M, Hoyer S. Central insulin resistance as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: an experimental approach. *J Neural Transm Suppl.* 2007;(72):217-233. doi:10.1007/978-3-211-73574-9\_28
- [4] Osmanovic J, Plaschke K, Salkovic-Petrisic M, Grünblatt E, Riederer P, Hoyer S. Chronic exogenous corticosterone administration generates an insulin-resistant brain state in rats. *Stress.* 2010;13(2):123-131. doi:10.3109/10253890903080379
- [5] Maloney JA, Bainbridge T, Gustafson A, et al. Molecular mechanisms of Alzheimer disease protection by the A673T allele of amyloid precursor protein. *J Biol Chem.* 2014;289(45):30990-31000. doi:10.1074/jbc.M114.589069
- [6] Eratne D, Loi SM, Farrand S, Kelso W, Velakoulis D, Looi JC. Alzheimer's disease: clinical update on epidemiology, pathophysiology and diagnosis. *Australas Psychiatry.* 2018;26(4):347-357. doi:10.1177/1039856218762308
- [7] Li X, Song D, Leng SX. Link between type 2 diabetes and Alzheimer's disease: from epidemiology to mechanism and treatment. *Clin Interv Aging.* 2015;10:549-560. Published 2015 Mar 10. doi:10.2147/CIA.S74042
- [8] Blennow K, Zetterberg H. Cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2009;18(2):413-417. doi:10.3233/JAD-2009-1177
- [9] Popp J, Meichsner S, Kölsch H, et al. Cerebral and extracerebral cholesterol metabolism and CSF markers of Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol.* 2013;86(1):37-42. doi:10.1016/j.bcp.2012.12.007
- [10] Kao YC, Ho PC, Tu YK, Jou IM, Tsai KJ. Lipids and Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* 2020;21(4):1505. Published 2020 Feb 22. doi:10.3390/ijms21041505
- [11] Milstein JL, Ferris HA. The brain as an insulin-sensitive metabolic organ [published online ahead of print, 2021 Apr 15]. *Mol Metab.* 2021;10:1234. doi:10.1016/j.molmet.2021.101234
- [12] Mattson MP, Chan SL. Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. *Cell Calcium.* 2003;34(4-5):385-397. doi:10.1016/s0143-4160(03)00128-3
- [13] Berridge MJ. Calcium hypothesis of Alzheimer's disease. *Pflugers Arch.* 2010;459(3):441-449. doi:10.1007/s00424-009-0736-1
- [14] Hoyer S. Glucose metabolism and insulin receptor signal transduction in Alzheimer disease. *Eur J Pharmacol.* 2004;490(1-3):115-125. doi:10.1016/j.ejphar.2004.02.049
- [15] Liu Y, Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX. Deficient brain insulin signalling pathway in Alzheimer's disease and diabetes. *J Pathol.* 2011;225(1):54-62. doi:10.1002/path.2912
- [16] Cai Q, Tammineni P. Mitochondrial Aspects of Synaptic Dysfunction in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2017;57(4):1087-1103. doi:10.3233/JAD-160726
- [17] Barilar JO, Knezovic A, Perhoc AB, Homolak J, Riederer P, Salkovic-Petrisic M. Shared cerebral metabolic pathology in non-transgenic animal models of Alzheimer's and Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna).* 2020;127(2):231-250. doi:10.1007/s00702-020-02152-8
- [18] Spring CC, Hobson V, Lucas JA, Menon CV, Hall JR, O'Bryant SE. Diagnostic accuracy of the MMSE in detecting probable and possible Alzheimer's disease in ethnically diverse highly educated individuals: an analysis of the NACC database. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2012;67(8):890-896. doi:10.1093/gerona/gls006
- [19] Davis DHJ, Creavin ST, Yip JLY, Noel-Storr AH, Brayne C, Cullum S. Montreal Cognitive Assessment for the detection of dementia. *Cochrane Database of Systematic Reviews 2021, Issue 7.* Art. No.: CD010775. DOI: 10.1002/14651858.CD010775.pub3.
- [20] Monllau A, Pena-Casanova J, Blesa R, et al. Valor diagnóstico y correlaciones funcionales de la escala ADAS-Cog en la enfermedad de Alzheimer: datos del proyecto NORMACODEM. *Neurologia.* 2007;22(8):493-501.
- [21] Cintra FCMDC, Cintra MTG, Nicolato R, et al. Functional decline in the elderly with MCI: Cultural adaptation of the ADCS-ADL scale. *Rev Assoc Med Bras (1992).* 2017;63(7):590-599. doi:10.1590/1806-9282.63.07.590
- [22] Huang HC, Tseng YM, Chen YC, Chen PY, Chiu HY. Diagnostic accuracy of the Clinical Dementia Rating Scale for detecting mild cognitive impairment and dementia: A bivariate meta-analysis. *Int J Geriatr Psychiatry.* 2021;36(2):239-251. doi:10.1002/gps.5436

- [23] Dubey SK, Lakshmi KK, Krishna KV, et al. Insulin mediated novel therapies for the treatment of Alzheimer's disease. *Life Sci.* 2020;249:117540. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117540
- [24] Yan J, Bengtson CP, Buchthal B, Hagenston AM, Bading H. Coupling of NMDA receptors and TRPM4 guides discovery of unconventional neuroprotectants. *Science.* 2020;370(6513):eaay3302. doi:10.1126/science.aay3302
- [25] Rocchi A, Pellegrini S, Siciliano G, Murri L. Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: a review. *Brain Res Bull.* 2003;61(1):1-24. doi:10.1016/s0361-9230(03)00067-4
- [26] Schneider L. A resurrection of aducanumab for Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 2020;19(2):111-112. doi:10.1016/S1474-4422(19)30480-6
- [27] Pinheiro L, Faustino C. Therapeutic Strategies Targeting Amyloid- $\beta$  in Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res.* 2019;16(5):418-452. doi:10.2174/1567205016666190321163438
- [28] Wang HY, Bakshi K, Frankfurt M, et al. Reducing amyloid-related Alzheimer's disease pathogenesis by a small molecule targeting filamin A. *J Neurosci.* 2012;32(29):9773-9784. doi:10.1523/JNEUROSCI.0354-12.2012
- [29] Akhtar A, Sah SP. Insulin signaling pathway and related molecules: Role in neurodegeneration and Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* 2020;135:104707. doi:10.1016/j.neuint.2020.104707
- [30] Zhao N, Liu CC, Van Ingelgom AJ, et al. Apolipoprotein E4 Impairs Neuronal Insulin Signaling by Trapping Insulin Receptor in the Endosomes. *Neuron.* 2017;96(1):115-129.e5. doi:10.1016/j.neuron.2017.09.003
- [31] Salkovic-Petrisic M, Tribl F, Schmidt M, Hoyer S, Riederer P. Alzheimer-like changes in protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 in rat frontal cortex and hippocampus after damage to the insulin signalling pathway. *J Neurochem.* 2006;96(4):1005-1015. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03637.x
- [32] Grieb P. Intracerebroventricular Streptozotocin Injections as a Model of Alzheimer's Disease: in Search of a Relevant Mechanism. *Mol Neurobiol.* 2016;53(3):1741-1752. doi:10.1007/s12035-015-9132-3
- [33] Kahn CR, Ferris HA, O'Neil BT. Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. In: Shlomo M, Auchus RJ, Goldfine AB, Koenig RJ, Rosen CJ, ed. *Williams Textbook of Endocrinology.* 14th ed. Philadelphia: Elsevier; 2020:1354-1361.
- [34] Beale EG. Insulin signaling and insulin resistance. *J Investig Med.* 2013;61(1):11-14. doi:10.2310/JIM.0b013e3182746f95
- [35] Wakabayashi T, Yamaguchi K, Matsui K, et al. Differential effects of diet- and genetically-induced brain insulin resistance on amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 2019;14(1):15. Published 2019 Apr 12. doi:10.1186/s13024-019-0315-7
- [36] de la Monte SM. Insulin Resistance and Neurodegeneration: Progress Towards the Development of New Therapeutics for Alzheimer's Disease. *Drugs.* 2017;77(1):47-65. doi:10.1007/s40265-016-0674-0
- [37] Agrawal M, Saraf S, Saraf S, et al. Nose-to-brain drug delivery: An update on clinical challenges and progress towards approval of anti-Alzheimer drugs. *J Control Release.* 2018;281:139-177. doi:10.1016/j.jconrel.2018.05.011
- [38] Hallschmid M. Intranasal Insulin for Alzheimer's Disease. *CNS Drugs.* 2021;35(1):21-37. doi:10.1007/s40263-020-00781-x
- [39] Salameh TS, Bullock KM, Hujoel IA, et al. Central Nervous System Delivery of Intranasal Insulin: Mechanisms of Uptake and Effects on Cognition. *J Alzheimers Dis.* 2015;47(3):715-728. doi:10.3233/JAD-150307
- [40] Claxton A, Baker LD, Wilkinson CW, et al. Sex and ApoE genotype differences in treatment response to two doses of intranasal insulin in adults with mild cognitive impairment or Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2013;35(4):789-797. doi: 10.3233/JAD-122308
- [41] Ulbrich K, Knobloch T, Kreuter J. Targeting the insulin receptor: nanoparticles for drug delivery across the blood-brain barrier (BBB). *J Drug Target.* 2011;19(2):125-132. doi:10.3109/10611861003734001
- [42] Sintov AC, Levy HV, Botner S. Systemic delivery of insulin via the nasal route using a new microemulsion system: In vitro and in vivo studies. *J Control Release.* 2010;148(2):168-176. doi:10.1016/j.jconrel.2010.08.004
- [43] Kamei N, Takeda-Morishita M. Brain delivery of insulin boosted by intranasal coadministration with cell-penetrating peptides. *J Control Release.* 2015; 197:105-110. doi:10.1016/j.jconrel.2014.11.004
- [44] Salameh TS, Bullock KM, Hujoel IA, et al. Central Nervous System Delivery of Intranasal Insulin: Mechanisms of Uptake and Effects on Cognition. *J Alzheimers Dis.* 2015;47(3):715-728. doi:10.3233/JAD-150307
- [45] Rhea EM, Humann SR, Nirkhe S, Farr SA, Morley JE, Banks WA. Intranasal Insulin Transport is Preserved in Aged SAMP8 Mice and is Altered by Albumin and Insulin Receptor Inhibition. *J Alzheimers Dis.* 2017;57(1):241-252. doi:10.3233/JAD-161095
- [46] Barone E, Tramutola A, Triani F, et al. Biliverdin Reductase-A Mediates the Beneficial Effects of

- Intranasal Insulin in Alzheimer Disease. *Mol Neurobiol.* 2019;56(4):2922-2943. doi:10.1007/s12035-018-1231-5
- [47] Frazier HN, Ghoweri AO, Anderson KL, Lin RL, Porter NM, Thibault O. Broadening the definition of brain insulin resistance in aging and Alzheimer's disease. *Exp Neurol.* 2019;313:79-87. doi:10.1016/j.expneurol.2018.12.007
- [48] de la Monte SM. Intranasal insulin therapy for cognitive impairment and neurodegeneration: current state of the art. *Expert Opin Drug Deliv.* 2013;10(12):1699-1709. doi:10.1517/17425247.2013.856877
- [49] Born J, Lange T, Kern W, McGregor GP, Bickel U, Fehm HL. Sniffing neuropeptides: a transnasal approach to the human brain. *Nat Neurosci.* 2002;5(6):514-516. doi:10.1038/nn849
- [50] Benedict C, Hallschmid M, Hatke A, et al. Intranasal insulin improves memory in humans. *Psychoneuroendocrinology.* 2004;29(10):1326-1334. doi:10.1016/j.psyneuen.2004.04.003
- [51] Reger MA, Watson GS, Frey WH 2nd, et al. Effects of intranasal insulin on cognition in memory-impaired older adults: modulation by APOE genotype. *Neurobiol Aging.* 2006;27(3):451-458. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2005.03.016
- [52] Benedict C, Hallschmid M, Schmitz K, et al. Intranasal insulin improves memory in humans: superiority of insulin aspart. *Neuropsychopharmacology.* 2007;32(1):239-243. doi:10.1038/sj.npp.1301193
- [53] Reger MA, Watson GS, Green PS, et al. Intranasal insulin improves cognition and modulates beta-amyloid in early AD [published correction appears in *Neurology.* 2008 Sep 9;71(11):866]. *Neurology.* 2008;70(6):440-448. doi:10.1212/01.WNL.0000265401.62434.36
- [54] Craft S, Baker LD, Montine TJ, et al. Intranasal insulin therapy for Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment: a pilot clinical trial. *Arch Neurol.* 2012;69(1):29-38. doi:10.1001/archneurol.2011.233
- [55] Rosenbloom MH, Barclay TR, Pyle M, et al. A single-dose pilot trial of intranasal rapid-acting insulin in apolipoprotein E4 carriers with mild-moderate Alzheimer's disease. *CNS Drugs.* 2014;28(12):1185-1189. doi:10.1007/s40263-014-0214-y
- [56] Claxton A, Baker LD, Hanson A, et al. Long-acting intranasal insulin detemir improves cognition for adults with mild cognitive impairment or early-stage Alzheimer's disease dementia [published correction appears in *J Alzheimers Dis.* 2015;45(4):1269-70]. *J Alzheimers Dis.* 2015;44(3):897-906. doi:10.3233/JAD-141791
- [57] Craft S, Claxton A, Baker LD, et al. Effects of Regular and Long-Acting Insulin on Cognition and Alzheimer's Disease Biomarkers: A Pilot Clinical Trial. *J Alzheimers Dis.* 2017;57(4):1325-1334. doi:10.3233/JAD-161256
- [58] Mustapic M, Tran J, Craft S, Kapogiannis D. Extracellular Vesicle Biomarkers Track Cognitive Changes Following Intranasal Insulin in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2019;69(2):489-498. doi:10.3233/JAD-180578
- [59] Craft S, Raman R, Chow TW, 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):1099-1109. doi:10.1001/jamaneurol.2020.1840



# *Curriculum vitae*



Name and surname: Bruno Buljan

Date of birth: 16.8.1993.

Education: 21.12.2018. MSc Physics (Faculty of Science, University of Zagreb)  
11.9.2021. Medical Doctor (Faculty of Medicine, University of Zagreb)

Notable awards: 2011. Bronze medal at International Physics Olympiad, Bangkok  
2012. Honorable mention at International Physics Olympiad, Tartu  
2012. Bronze medal at International Chemistry Olympiad, Washington

Fields of interest: intersection of Endocrinology, Neurology and Psychiatry  
Anaesthesiology, Cardiology, Radiology  
Pharmaceutical R&D