

# Promjene cirkadijanog ritma u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti

---

**Virag, Davor**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:442725>

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

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



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

**Davor Virag**

**Promjene cirkadijanog ritma u štakorskom modelu  
sporadične Alzheimerove bolesti**

**Diplomski rad**



Zagreb, 2021.

**Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za molekularnu neurofarmakologiju Zavoda za farmakologiju i Hrvatskog instituta za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Melite Šalković-Petrišić, u sklopu znanstvenog projekta “Mehanizmi nutrijentom posredovanih učinaka endogenog glukagonu sličnog peptida-1 na kognitivne i metaboličke poremećaje u eksperimentalnim modelima neurodegenerativnih bolesti”, financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost, šifra projekta: IP-2018-01-8938, voditelj projekta: prof. dr. sc. Melita Šalković-Petrišić i predan je na ocjenjivanje u akademskoj godini 2020./2021.**

## Popis kratica

A $\beta$	$\beta$ -amiloidni protein (prema engl. <i><math>\beta</math>-amyloid</i> )
AB	Alzheimerova bolest
CSF	cerebrospinalna tekućina (prema engl. <i>cerebrospinal fluid</i> )
CSV	zarezom odvojene vrijednosti (prema engl. <i>comma-separated values</i> )
GLUT2	transporter za glukozu 2
I2C	međuintegrirani krug (prema engl. <i>Inter-Integrated Circuit</i> )
icv	intracerebroventrikularno
IRBS	stanje inzulinske rezistencije u mozgu (prema engl. <i>insulin-resistant brain state</i> )
MCI	blago kognitivno oštećenje (prema engl. <i>mild cognitive impairment</i> )
MDA	malondialdehid
NREM	ne-REM (prema engl. <i>non-REM</i> )
REM	brzo kretanje očiju (prema engl. <i>rapid eye movement</i> )
SCN	suprahijazmatska jezgra (prema engl. <i>suprachiasmatic nucleus</i> )
SPI	serijsko periferno sučelje (prema engl. <i>Serial Peripheral Interface</i> )
STZ	streptozotocin
SWS	sporovalni san (prema engl. <i>slow-wave sleep</i> )
sAB	sporadični oblik Alzheimerove bolesti
USB	univerzalna serijska sabirnica (prema engl. <i>Universal Serial Bus</i> )

# Sadržaj

## Sažetak

## Summary

<b>Uvod</b>	<b>1</b>
Alzheimerova bolest	1
Poremećaj cirkadijanog ritma u Alzheimerovoj bolesti	2
Štakorski model sporadične Alzheimerove bolesti izazvan intracerebroventrikularnim streptozotocinom	3
Korištene metode u istraživanju cirkadijanih ritmova u životinja	4
<b>Hipoteza</b>	<b>5</b>
<b>Opći i specifični ciljevi rada</b>	<b>5</b>
Opći cilj	5
Specifični ciljevi:	6
<b>Materijali i metode</b>	<b>6</b>
Životinje	8
Eksperimentalni model sporadične Alzheimerove bolesti	8
Sustav za praćenje aktivnosti životinja	9
<i>Hardware</i>	9
<i>Software</i>	11
Praćenje motoričke aktivnosti životinja	13
Žrtvovanje životinja i homogeniziranje tkiva	13
Analiza lipidne peroksidacije u homogenatima hipotalamusa	14
Statistička analiza	15
<b>Rezultati</b>	<b>15</b>
Procjena cirkadijanog ritma u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti pomoću razvijenog sustava za praćenje lokomotorne aktivnosti	15
Analiza lipidne peroksidacije u homogenatima hipotalamusa	18
<b>Rasprava</b>	<b>18</b>
<b>Zaključci</b>	<b>22</b>
<b>Zahvale</b>	<b>23</b>
<b>Popis literature</b>	<b>23</b>
<b>Životopis</b>	<b>28</b>

## Sažetak

# PROMJENE CIRKADIJANOG RITMA U ŠTAKORSKOM MODELU SPORADIČNE ALZHEIMEROVE BOLESTI

Davor Virag

Promjene cirkadijanog ritma potencijalno imaju etiopatogenetsku ulogu u razvoju Alzheimerove bolesti koja još nije razjašnjena, a dodatni dijagnostički i terapijski potencijal leži u činjenici da se pojavljuju i prije nastupa kognitivnog deficita. Obrasci motoričke aktivnosti štakorskog modela sporadične Alzheimerove bolesti nakon intracerebroventrikularno primijenjenog streptozotocina (STZ-icv) ispitani su novom metodom, osmišljenom za neinvazivno i longitudinalno praćenje motorike laboratorijskih životinja. U odnosu na kontrole, u životinja tretiranih streptozotocinom prisutne su promjene cirkadijanog ritma u vidu povećane motoričke aktivnosti danju te smanjene aktivnosti tijekom noći, odnosno smanjenje cirkadijanih oscilacija motoričke aktivnosti već unutar 72 sata od druge primjene streptozotocina. Jedan od mogućih mehanizama nastanka ovog poremećaja je oštećenje hipotalamusa, glavnog regulatora cirkadijanog ritma. Oksidativni stres u hipotalamusu STZ-icv životinja ispitan je esejem tvari koje reagiraju s tiobarbiturnom kiselinom, kojim je nađen povećan stupanj lipidne peroksidacije u usporedbi s kontrolom. Ovi rezultati po prvi puta pokazuju prisutnost poremećaja cirkadijanog ritma u ranoj fazi razvoja fenotipa sporadične Alzheimerove bolesti u STZ-icv modelu i kao takvo posjeduje veliki potencijal za translaciju istraživanja u klinički kontekst.

Ključne riječi: cirkadijani ritam, Alzheimerova bolest, streptozotocin, oksidativni stres

## Summary

# CHANGES OF THE CIRCADIAN RHYTHM IN THE RAT MODEL OF SPORADIC ALZHEIMER'S DISEASE

Davor Virag

Changes of the circadian rhythm have a potential etiopathogenetic role in the development of Alzheimer's disease which has not yet been completely elucidated. Patterns of motor activity in the rat model of sporadic Alzheimer's disease induced by intracerebroventricular application of streptozotocin (STZ-icv) were examined by a novel method, designed for noninvasive, continuous tracking of motor activity in test animals. For the first time, this research describes early changes of circadian rhythm in regards to increased activity by day, and reduced activity by night in animals treated with STZ-icv. One plausible mechanism of this disruption is increased oxidative stress in the hypothalamus, examined in this work by the thiobarbituric acid reactive substances assay. Circadian rhythm disruption in the early stages of Alzheimer's disease phenotype progression in the STZ-icv model point to the importance of circadian rhythm as an etiopathogenetic factor of this disease, with great potential for research translation into a clinical context.

Key words: circadian rhythm, Alzheimer's disease, streptozotocin, oxidative stress

# Uvod

## Alzheimerova bolest

Alzheimerova bolest (AB) kronična je i progresivna neurodegenerativna bolest te ujedno i najčešća vrsta demencije. Iako je povijesni naziv ove bolesti čvrsto ustaljen u primjeni, on je varljiv, jer pojam "bolest" prema definiciji zahtijeva poznavanje etiopatogeneze uz značajan stupanj pouzdanosti koja je u AB-u poznata u svega približno 5% pacijenata koji boluju od obiteljskog tipa AB (1,2). Kod ostalih, približno 95% pacijenata, koji boluju od sporadičnog oblika bolesti (sAB), etiopatogenetski procesi još nisu do kraja razjašnjeni, a smatra se da je neurodegeneracija posljedica kompleksne interakcije niza genetskih i okolišnih čimbenika. S obzirom na to da većina pacijenata boluje od sporadičnog oblika bolesti nepoznate etiologije, kauzalno liječenje ne postoji, a dostupno simptomatsko liječenje nažalost je ograničene učinkovitosti.

Alzheimerova bolest zbog značajne prevalencije, zabrinjavajućeg trenda porasta incidencije i nedostatka terapijskih mogućnosti predstavlja značajan javnozdravstveni problem. Kontinuirani porast broja ljudi koji boluju od demencije posebno zabrinjava. Primjerice, 1990. godine u svijetu je od demencija bolovalo 20,2 milijuna ljudi (3). Danas se procjenjuje da, u svijetu, samo od AB boluje 44 milijuna ljudi, a predviđa se porast broja oboljelih na 135 milijuna do 2050. godine (4). Iz navedenih epidemioloških podataka, ali i činjenice da AB značajno narušava kvalitetu života oboljelih i njihovih bližnjih (5), te predstavlja veliko ekonomsko opterećenje u smislu skrbi za pacijente (6), jasno je da je potrebno nastaviti ulagati velike napore u daljnje istraživanje ove bolesti.

Alzheimerova bolest najčešće se prezentira simptomima i kliničkim znakovima povezanim s poremećajem procesa učenja i pamćenja. Kognitivno oštećenje u ranom stadiju blagog je obliku te s progresijom bolesti kontinuirano napreduje do pojave ozbiljnih ispada funkcije. Prema Bature i suradnicima, problemi s epizodičnom memorijom jedni su od najranijih znakova bolesti te se u blagom obliku javljaju i do 12 godina prije početka AB (7). Istraživanja pokazuju da u AB postoji i niz drugih neuropsihijatrijskih i patofizioloških poremećaja čija se uloga u nastanku i progresiji bolesti aktivno istražuje te se u ovom kontekstu posebno izdvajaju depresija (8), autonomna disfunkcija (9), inzulinska rezistencija i drugi metabolički poremećaji (10) te poremećaji spavanja i cirkadijanog ritma (2,11).



Zanimljivo je da se neki od navedenih poremećaja (posebno cirkadijana i metabolička disfunkcija) javljaju rano u tijeku bolesti ili čak prije pojave kognitivnih simptoma (12), te da je u životinjskim modelima poremećaj navedenih funkcija često prisutan prije nastanka oštećenja pamćenja (13). Patobiološki značaj navedenih promjena područje je aktivnog istraživanja, no smatra se da je njihova uloga višestruka te da mogu sudjelovati kako u nastanku, tako i u progresiji AB (2). Jedna od hipoteza koje objašnjavaju ranu pojavu navedenih promjena govori u prilog ranog propadanja hipotalamusa u tijeku AB (11) što bi objasnilo poremećaj regulacije autonomnog, metaboličkog i cirkadijanog sustava s obzirom na to da se u hipotalamusu nalaze jezgre uključene u fiziološku kontrolu ovih sustava. Iz navedenih razloga, odlučio sam istražiti promjene cirkadijanog ritma u štakorskom modelu sporadične AB i moguću povezanost s promjenama hipotalamusa na razini oksidativnog stresa, stoga ću se u daljnjem tekstu posvetiti promjenama cirkadijanog ritma u AB i životinjskim modelima bolesti, te metodama koje se koriste u istraživanju ovih promjena.

## **Poremećaj cirkadijanog ritma u Alzheimerovoj bolesti**

Cirkadijana disfunkcija koja je primarno izražena kao poremećaj ciklusa budnosti i spavanja često se javlja u pacijenata oboljelih od AB. Dugi niz godina smatralo se da poremećaj cirkadijane ritmičnosti nastaje u kasnom stadiju bolesti kao posljedica neurodegenerativnih procesa, no novija istraživanja pokazuju da su poremećaji budnosti i spavanja često prisutni i u ranim stadijima bolesti prije pojave kognitivnih simptoma (14). Primjerice, podaci iz longitudinalne studije provedene u Švedskoj koje su objavili Hahn i suradnici pokazali su da se na temelju simptoma povezanih s poremećajem obrasca spavanja može predvidjeti povećanje rizika od kasnijeg obolijevanja od AB-a (15). Pacijenti oboljeli od AB-a često imaju problema s usnivanjem i ranim jutarnjim buđenjem, a karakteristična je i fragmentacija sna te često spavanje tijekom dana (14). Uz navedene promjene kod pacijenata oboljelih od AB u ranoj je fazi bolesti primijećeno smanjenje spirovalnog spavanja u usporedbi sa zdravim ljudima iste dobi te pacijentima s dijagnozom blagog kognitivnog deficita, dok u kasnijim stadijima dolazi i do gubitka stadija sna povezanog s brzim pokretima očiju (REM, prema eng. *rapid eye movement*) (2,16).

Promjene cirkadijanog ritma, u vidu povećane budnosti danju (kada se u takvih životinja očekuje san) i smanjene budnosti noću (kada se očekuje budnost), dokumentirane su i u transgeničnih miševa koji su model obiteljskog oblika AB (13,17). Istraživanja pokazuju da transgenični miševi Tg 2576 uz poremećeni obrazac budnosti i spavanja, pokazuju i poremećenu elektroencefalografsku aktivnost, te da primjena donepezila (inhibitora acetilkolinesteraze) dovodi do izraženog povećanja budnosti u manjoj dozi u kojoj nema učinka u kontrolnih životinja dok je pri primjeni veće doze učinak u transgeničnih životinja slabije izražen. U istraživanju Wisor i sur. navedeni su poremećaji zabilježeni prije nastupa kognitivnog oštećenja u transgeničnih AB miševa (13).

Promjene cirkadijanog ritma te poremećaji spavanja, nešto su slabije istraženi u ne-transgeničnim modelima AB. Svega je par istraživanja ukazalo na moguću prisutnost cirkadijane disritmičnosti i u štakorskom modelu sAB dobivenom intracerebroventrikularnom primjenom streptozotocina (STZ-icv) koji je korišten u ovom istraživanju (18–20).

### **Štakorski model sporadične Alzheimerove bolesti izazvan intracerebroventrikularnim streptozotocinom**

Jedan od najkorištenijih modela sAB bazira se na intracerebroventrikularnoj primjeni betacitotoksične tvari streptozotocina (STZ-icv) (21), koja u štakora dovodi do niza patoloških pojava nalik onima u ljudi oboljelih od sAB, kao što su nakupljanje  $\beta$ -amiloidnog proteina ( $A\beta$ ), hiperfosforilacija proteina tau, neuropala i povećan oksidativni stres (22). Mehanizam nastanka promjena izazvanih streptozotocinom, koje su nalik onima u humanoj AB, još nije razjašnjen, no smatra se da bi razvoj inzulinske rezistencije u mozgu (IRBS, prema engl. *insulin-resistant brain state*) mogao biti jedan od ključnih patoloških mehanizama koji orkestriraju neurodegenerativne promjene (23).

Promjene cirkadijanog ritma u ovom su modelu razmjerno malo ispitane, a istraživanja su uglavnom ograničena na elektroencefalografsko praćenje budnosti u ograničenom vremenskom razdoblju (najčešće unutar 24 sata (18,19)). Osim toga, vremenski tijek nastanka i progresije cirkadijane disritmičnosti nije utvrđen s obzirom na to da su ispitivanja uglavnom provođena samo u pojedinim vremenskim točkama od 7, 14, 21 ili 30 dana od posljednje injekcije STZ-icv (18–20).

Jedna od hipoteza koja nudi objašnjenje poremećaja cirkadijanog ritma u pacijenata oboljelih od AB, te u transgeničnih i ne-transgeničnih modela ove bolesti, objašnjava pojavu cirkadijane disritmičnosti poremećajem funkcija hipotalamusa koji je zadužen za kontrolu i sinkronizaciju cirkadijanog ritma mozga i cirkadijane aktivnosti perifernih sustava. U ovom je kontekstu posebno važna suprahijazmatska jezgra koja se još naziva i “centralnim satom” zbog nadzorne uloge nad cirkadijanim ritmom i sinkronizacije s vanjskim podražajima koji reguliraju kronobiološku aktivnost (“zeitgeber”) (24).

Neurodegenerativne promjene hipotalamusa prisutne su i u STZ-icv modelu sAB. 30 dana nakon primjene STZ-icv, zabilježeno je nakupljanje A $\beta$  u trenutku kada nakupljanje u hipokampusu i korteksu nije statistički značajno (25), a čini se da je tada i metabolizam glukoze najviše smanjen upravo u hipotalamusu (26). Također je zabilježeno proširenje treće komore na račun gubitka mijeliniziranih hipotalamičkih periventrikularnih vlakana (27).

## **Korištene metode u istraživanju cirkadijanih ritmova u životinja**

Na tržištu postoji nekoliko komercijalno dostupnih metoda za analizu cirkadijanog ritma eksperimentalnih životinja, no sve imaju brojne nedostatke koji mogu utjecati na životinje u pokusu.

Povijesno najstarija, ali i jedna od najkorištenijih metoda zasniva se na kotaču koji se postavlja u kavez. Kotač je spojen na mjerni uređaj koji broji okretaje kotača i bilježi kada i koliko životinja pokreće kotač. Činjenica da ova metoda zapravo mjeri voljnu motoričku aktivnost, glavni je nedostatak metode budući da, prema literaturnim podacima, u pokusu možemo očekivati različitu motivaciju za okretanjem kotača među ispitivanim skupinama životinja (28).

Modernije metode zasnivaju se na korištenju senzora koji na razne načine registriraju pokrete životinja. Uglavnom je riječ o vrlo skupim komercijalnim uređajima. Te metode uglavnom ovise o korištenju *beam break* senzora, kamere ili senzora koji su postavljeni na dnu kaveza i detektiraju kretanje životinja označenih potkožnim implantiranim čipovima (primjerice RFID - radiofrekventna identifikacija) (28). *Beam break* senzori koriste izvor i detektor (najčešće infracrvene) svjetlosti. Kretnjama po kavezu, životinja prekida komunikaciju izvora i detektora (*beam break* - prekid zrake). Ovakav tip senzora potencijalno interferira s biološkim sustavom budući da su životinje u određenoj mjeri kontinuirano osvijetljene, a sensor pruža podatke o kretanju samo na ograničenoj površini. Primjena kamere otežana je u dugoročnom praćenju

životinja jer generira veliku količina podataka koju je računalno zahtjevno analizirati, dok su sustavi bazirani na potkožnoj implantaciji čipova životinjama invazivni i iziskuju primjene opće anestezije prilikom postavljanja čipova.

Konačno, najpreciznija metoda za procjenu cirkadijanih ritmova u životinja je korištenje elektromiografije i elektroencefalografije (28). Takve su metode vrlo skupe i invazivne za životinje jer se elektrode moraju fiksirati na životinju i takav postupak zahtjeva primjenu opće anestezije. Treba imati na umu da invazivnosti ove metode također pridonosi potreba za prolongiranom implantacijom elektroda, što narušava kvalitetu života i slobodu kretanja životinje. Sve to može značajno utjecati i na različita mjerenja te bihevioralne testove koji se vrše u sklopu pokusa. Također, cijena i kompleksnost implantacije elektroda obično ograničava broj životinja na kojima se mjerenje može provesti, a same metode zahtijevaju dobro poznavanje računalnih tehnika analize i obrade kompleksnih bioloških signala za koje je potrebno stručno educirano osoblje (28).

## **Hipoteza**

U štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti izazvanom intracerebroventrikularnom primjenom streptozotocina (STZ-icv) dolazi do poremećaja cirkadijanog obrasca motoričke aktivnosti već u ranom razdoblju nakon STZ-icv primjene.

## **Opći i specifični ciljevi rada**

### **Opći cilj**

Opći cilj ovog rada bio je istražiti promjene cirkadijanog ritma u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti izazvanom intracerebroventrikularnom primjenom streptozotocina (STZ-icv).

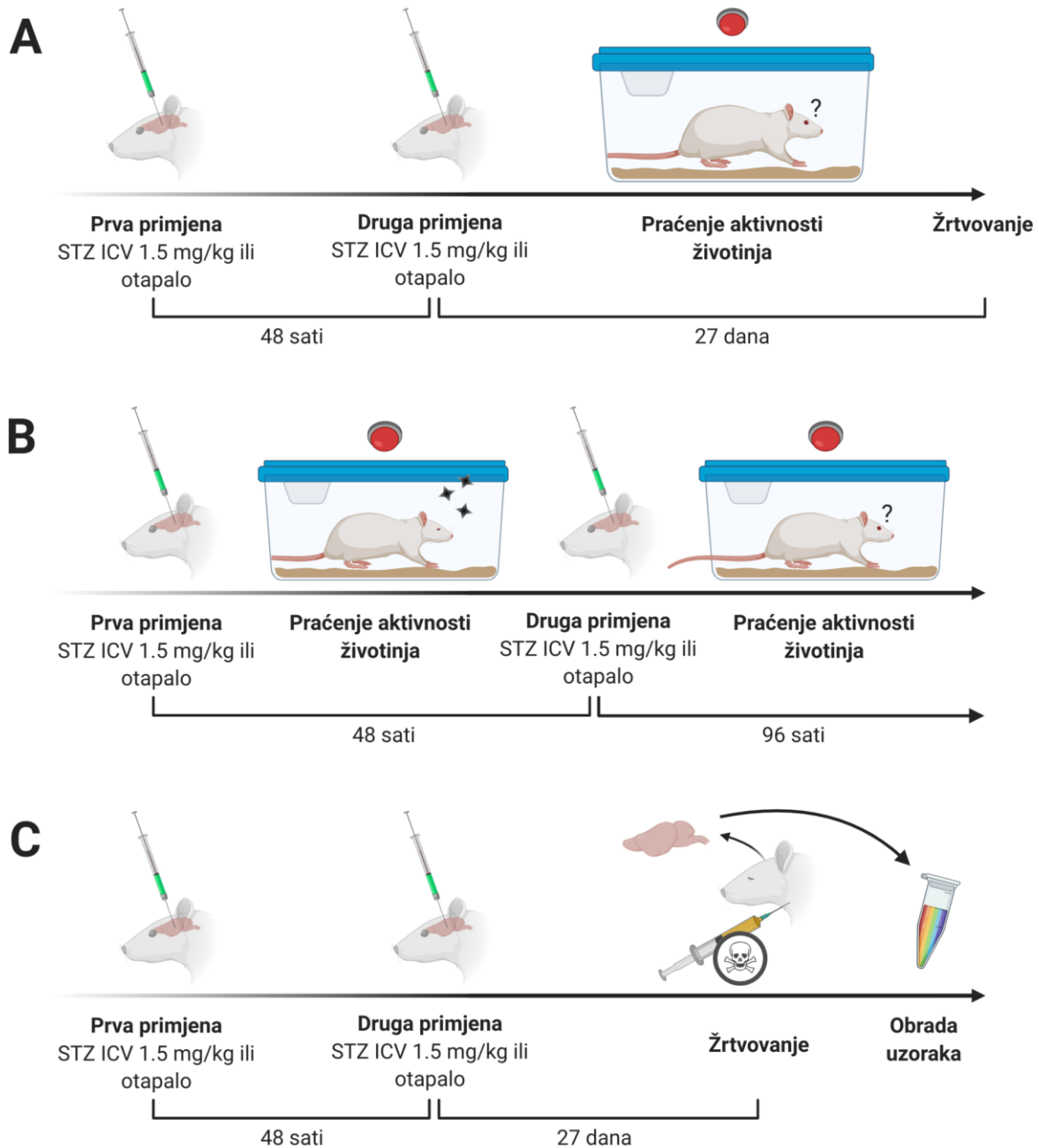
## Specifični ciljevi:

1. Istražiti razvoj i opseg promjena cirkadijanog ritma aktivnosti u štakorskom STZ-icv modelu unutar mjesec dana od icv primjene STZ.
2. Osmisliti i napraviti uređaj kojim je moguće neinvazivno, kroz dulje vremensko razdoblje monitorirati motoričku aktivnost kao mjeru praćenja promjena cirkadijanog ritma u štakorskom STZ-icv modelu.
3. Osmisliti i napraviti program za analizu podataka dobivenih ovakvim uređajem za monitoriranje motoričke aktivnost.
4. Istražiti promjene peroksidacije lipida kao parametra oksidativnog stresa u hipotalamusu štakorskog STZ-icv modela.

## Materijali i metode

Ovaj se rad sastoji od **tri pokusa** koji su provedeni u sklopu prethodno planiranih istraživanja u okviru HRZZ projekta, na životinjama koje su za potrebe projekta korištene za izradu štakorskog STZ-icv modela sAB u projektnim pokusima “HRZZ EXP2”, “HRZZ EXP4” i “HRZZ EXP5”. U **pokusu 1** praćen je kronični učinak intracerebroventrikularne injekcije streptozotocina (STZ-icv) na motoričku aktivnost životinja, kroz razdoblje od 27 dana (Slika 1A). U **pokusu 2**, praćen je akutni učinak neposredno nakon injekcije STZ-icv (Slika 1B), dok je u **pokusu 3** provedena analiza lipidne peroksidacije u hipotalamusu pomoću eseja za tvari koje stupaju u interakciju s tiobarbiturnom kiselinom (od engl. *thiobarbituric acid reactive substances assay* - TBARS) (Slika 1C).

U svim pokusima izrađenim u ovom radu mjerenja su provedena na životinjama ili tkivima koja su dio projekta Hrvatske zaklade za znanost “Mehanizmi nutrijentom posredovanih učinaka endogenog glukagonu sličnog peptida-1 na kognitivne i metaboličke poremećaje u eksperimentalnim modelima neurodegenerativnih bolesti (IP-2018-01-8938)” pod vodstvom prof.dr.sc. Melite Šalković-Petrišić.



**Slika 1. Shematski prikaz pokusa.** A) Pokus 1 - Dugoročno praćenje motoričke aktivnosti kroz 27 dana nakon druge injekcije STZ-icv. B) Pokus 2 - Kratkoročno praćenje motoričke aktivnosti neposredno nakon svake injekcije STZ-icv. C) Pokus 3 - Dobivanje bioloških uzoraka korištenih za analizu lipidne peroksidacije u hipotalamusu.

## Životinje

U ovom radu korišteni su mužjaci Wistar štakora uzgojeni na Zavodu za Farmakologiju Medicinskog fakulteta (posjeduje licenciranu nastambu za uzgoj i držanje laboratorijskih životinja, HR-POK-007).

Za dva pokusa praćenja motoričke aktivnosti, ukupno je korišteno 42 životinje iz pokusa HRZZ projekta EXP4 i EXP5, dok je za treći pokus u kojemu je analizirana lipidna peroksidacija pomoću eseja za tvori koje stupaju u interakciju s tiobarbiturnom kiselinom ukupno korišteno prethodno uzeto tkivo hipotalamusa od 11 životinja (6 kontrolnih životinja i 5 STZ-icv životinja iz pokusa HRZZ projekta EXP2). Premda je za mjerenje lipidne peroksidacije korišteno tkivo hipotalamusa životinja kojima nije prethodno mjerena motorička aktivnost, radi se o životinjama iz istog uzgoja, iste dobi i spola, te sličnih kognitivnih sposobnosti mjerenih kognitivnim testovima za potrebe HRZZ projekta. Sve su životinje bile stare 3 mjeseca, tjelesne težine od 350 do 450 grama te su dobivale vodu i hranu *ad libitum*. Stelja u kavezima mijenjana je svaka 3 dana.

Postupke na životinjama *in vivo* provodili su isključivo istraživači i tehničko osoblje Laboratorija za molekularnu neurofarmakologiju, licencirani za rad s laboratorijskim životinjama, u sklopu rada na gore spomenutom HRZZ projektu.

## Eksperimentalni model sporadične Alzheimerove bolesti

U sva tri pokusa ove studije korišten je eksperimentalni životinjski model sporadične Alzheimerove bolesti koji su u literaturi prvi opisali Hoyer i suradnici (29) i Šalković i Lacković (23,30), a koji se zasniva na intracerebroventrikularnoj primjeni betacitotoksične tvari streptozotocina (STZ-icv). Postupak STZ-icv primjene i razvoja sAB modela proveo je istraživački tim Laboratorija za molekularnu neurofarmakologiju. Životinje su u sklopu svih navedenih pokusa prvo nasumično podijeljene u dvije skupine: eksperimentalnu i kontrolnu. Nakon uvođenja životinja u opću anesteziju intraperitonealnom primjenom ketamina i ksilazina (70 mg/kg i 7 mg/kg), učinjena je trepanacija lubanje. Kroz formirani otvor uvela se Hamilton injekcijska igla modela Slimline 701N (26s ga, 10  $\mu$ L) te je u obje lateralne komore aplicirana otopina 1,5 mg/kg streptozotocina otopljenog u 0,05M citratnom puferu pH 4,5 u volumenu od 2  $\mu$ L po komori. Kontrolne životinje prošle su isti postupak kao i eksperimentalne, ali primjenom vehikula bez streptozotocina. Postupak primjene STZ-icv ponovljen je za 48 sati.

## Sustav za praćenje aktivnosti životinja

Za potrebe ovog rada, osmišljena je nova metoda s ciljem istraživanja cirkadijanih ritmova u životinja. Radi se o sustavu za praćenje lokomotorne aktivnosti životinja koji koristi infracrvene senzore i tako bilježi kretanje životinja u kavezima. Sustav je osmislio i konstruirao student-autor ovog rada u suradnji s kolegom Ivanom Kodvanjem koji je ponudio svoju pomoć u razvoju programskog paketa za vizualnu reprezentaciju rezultata. Ivan Kodvanj diplomirao je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu u 17. srpnja 2020. te je svoj doprinos ovom radu dao kao student 6. godine medicine.

### *Hardware*

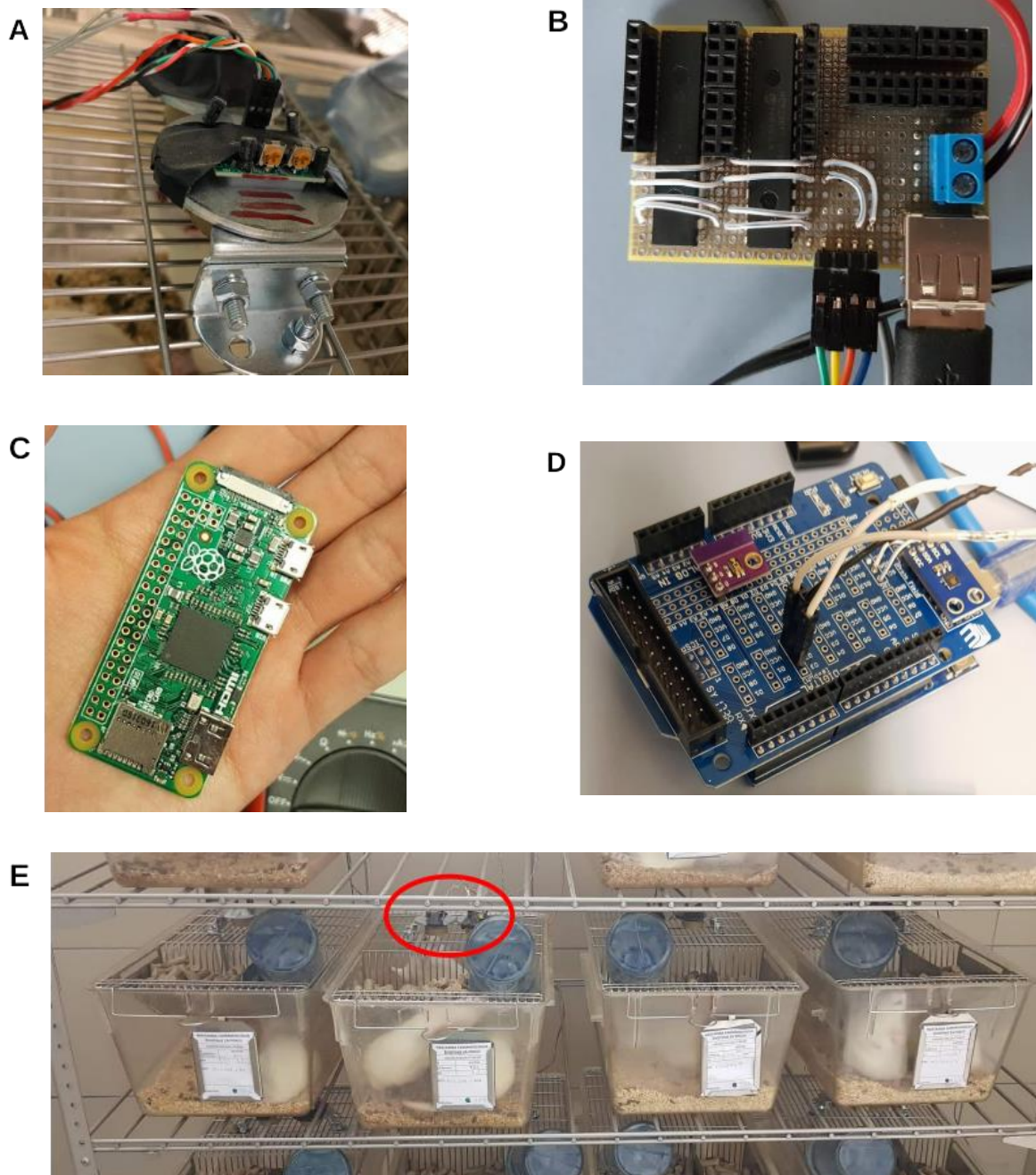
#### Senzorski moduli

Okosnica sustava su senzorski moduli *HC-SR501* u dvostrukoj konfiguraciji koji kontinuirano nadziru kretanje životinja u kavezu (Slika 2A, 2E). Specijalizirana kompozitna Fresnelova leća svakog senzorskog modula segmentira puno vidno polje te primljenu infracrvenu svjetlost svakog segmenta upućuje naizmjenice na jednu od dvije fotovoltaične ćelije, koje infracrveni svjetlosni podražaj pretvaraju u napon. Specijalizirani integrirani krug *BIS0001*, kao sastavnica svakog modula, pretvara razliku napona dvaju ćelija u binarni logički signal koji može poprimiti dva stanja - 0 ili 1. Izlazni signal poprima vrijednost 1 kada razlika napona dvaju ćelija (koja reflektira promjenu položaja životinje) dosegne prag definiran potenciometrom za podešavanje osjetljivosti senzora (31). Ovakva konverzija razlike napona u binarni signal olakšava naknadnu analizu velike količine podataka generirane pri dugoročnom kontinuiranom praćenju životinja. U dvostrukoj konfiguraciji, jedan je modul konfiguriran na visoki, a drugi na niski prag osjetljivosti. Svaki senzor također sadrži kartonski kolimator koji sprječava lažna očitavanja izvan kaveza, a sâm kavez ne propušta infracrveno svjetlo izvana koje bi dovelo do lažne aktivacije.

#### Sabirna pločica

Kako bismo omogućili istovremeno praćenje više kaveza, konstruirali smo sabirnu pločicu zasnovanu na *MCP23017* integriranim krugovima (32). Koristeći I2C sabirnicu (33), ovi integrirani krugovi komuniciraju stanje do 32 senzora kontrolnom računalu koristeći samo dvije žice za komunikaciju, uz još dvije žice za napajanje (Slika 2B).





**Slika 2. Elementi sustava za praćenje motoričke aktivnosti životinja.** A) Infracrveni senzori, montirani na poklopac kaveza u dvostrukoj konfiguraciji. B) Sabirna pločica koja djeluje kao posrednik između kontrolnog računala i senzora. C) Kontrolno računalo (*Raspberry Pi*) koje bilježi prikupljene podatke. D) Pločica za nadzor okolišnih uvjeta - temperature, vlage, svjetlosti i ulaska u prostoriju. E) Kavezi sa životinjama s montiranim infracrvenim sensorima (označeno).

### Pločica za nadzor okolišnih uvjeta

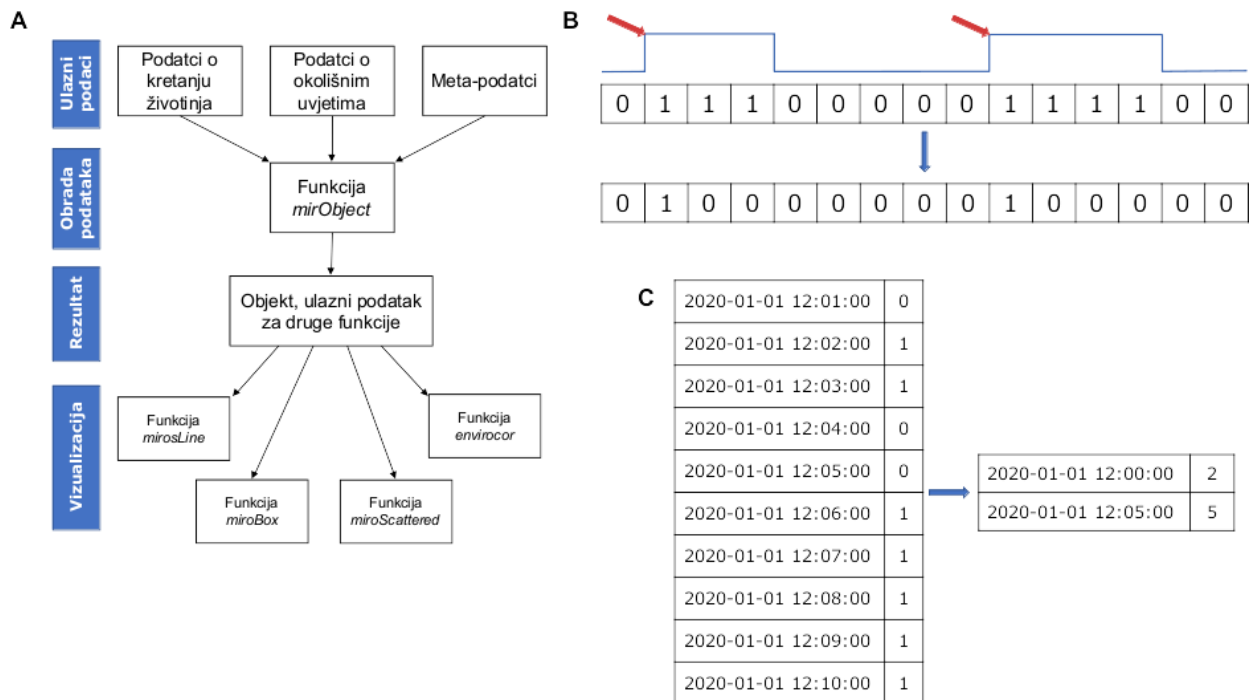
Pločica je zasnovana na *Arduino Uno* platformi pogonjenoj *ATmega328P* mikrokontrolerom i sadrži *TEMT6000* senzor za svjetlo, *HDC1080* senzor temperature i vlage te priključak za još jedan *HC-SR501* senzorski modul za praćenje ulazaka u prostoriju (Slika 2D). Pločica kontinuirano šalje serijalizirane senzorske podatke kontrolnom računalu putem USB protokola. Ovu je pločicu također moguće proširivati dodatnim senzorima koji koriste digitalne signale, analogne signale, I2C ili SPI serijske komunikacijske protokole (34).

### Kontrolno računalo

Kontrolno računalo je Raspberry Pi, model Zero (Slika 2C), s varijantom Raspbian GNU/Linux operativnog sustava prilagođenom za potrebe ove namjene. Pri paljenju, sustav automatski započinje prikupljanje senzorskih podataka pomoću skripte napisane u programskom jeziku Python. Podaci o životinjama i okolišu se bilježe na priključeni tvrdi disk, a zbog redundancije podataka, također se šalju putem mreže na udaljeno računalo u stvarnom vremenu. Na taj način podaci ostaju sačuvani i na udaljenom računalu u slučaju kvara kontrolnog računala ili bilo koje pripadajuće komponente.

### *Software*

U svrhu obrade podataka, napravljen je paket funkcija u programskom jeziku *R*. Paket sadrži 15 funkcija kojima je svrha obrada ili prikaz podataka dobivenih sustavom za praćenje životinja. Paket je razvijen s ciljem da olakša, ali i standardizira način obrade podataka kako bi rezultati mogli biti jednostavno reproducibilni. S tim ciljem napisana je i detaljna dokumentacija koja opisuje svrhu, argumente, te rezultate svake funkcije. Na Slici 3A, shematski je prikazan koncept upotrebe paketa funkcija. Ukratko, podatci o kretanju životinja, okolišnim uvjetima (promjene u temperaturi prostorije, osvjetljenju, relativnoj vlazi zraka i podatci o kretanju osoba unutar prostorije gdje se nalaze životinje), te meta-podatci (vremenski period za grupiranje podataka, vrijeme kada se pale i gase svjetla u prostoriji gdje se nalaze životinje, vremenska zona, i druge postavke funkcije koje se tiču načina obrade podataka – primjerice, moguće je obrada podataka s jednom ili više procesorskih jezgara), obrađuju se funkcijom *mirObject*, a rezultat je objekt koji je ulaz sve druge funkcije ovog paketa. U daljnjem tekstu ukratko će biti opisana obrada podataka.



**Slika 3. Shematski koncepta paketa funkcija, prikaza detekcije ruba i grupiranja podataka.**

A) Prikaz koncepta paketa funkcija. B) Detekcija ruba na sirovim podacima rezultira serijom 0 i 1, gdje 1 označava mjesto na kojem je došlo do promjene iz 0 u 1. C) Pojednostavljen prikaz grupiranja podataka po vremenskom intervalu od 5 minuta.

### Obrada podataka

Gotovo sva obrada podataka odvija se funkcijom *mirObject*. Dva bitna koraka mogu se izdvojiti prilikom izvođenja ove funkcije: detekcija ruba i grupiranje podataka. Detekcija ruba (1) ima cilj otkriti početak svakog pokreta životinja u kavezu. Budući da jedinice u podacima predstavljaju kretanje, a nule mirovanje, detekcijom ruba generirat će se podaci koji sadržavaju jedinice na onim mjestima gdje je prije bila jedinica kojoj je prethodila nula (Slika 3B). Detekcija ruba vrši se nad podacima dobivenim senzorom visoke i niske osjetljivosti. Dodatno je moguće i istražiti duljinu kretanja životinja, ali ta metoda neće biti ovdje opisana budući da nije korištena u ovom radu. Idući korak je grupiranje podataka (2). Pojednostavljeno, radi se o zbrajanju podataka po vremenskim intervalima kao što je to prikazano na Slici 3C. Zadaća korisnika je definirati duljinu vremenskog intervala. U ovom radu korišten je interval od 30 minuta što se pokazalo optimalnim s obzirom na količinu generiranih podataka.

Zaključno, iz ulaznih podataka na kraju se generira objekt koji sadržava grupirane podatke o kretanju životinja dobivene senzorom visoke i niske osjetljivosti, podatke o okolišnim uvjetima, te grupirane podatke o kretanju životinja koji su dobiveni senzorom visoke i niske osjetljivosti, a na kojima je prije grupiranja učinjena detekcija ruba, te razne meta-podatke. Takav objekt sadržava ulaze za ostale funkcije ovog paketa koje mogu poslužiti za vizualizaciju podataka na dvadesetak načina.

## **Praćenje motoričke aktivnosti životinja**

Motorička aktivnost praćena je kod životinja u dva nezavisna pokusa sustavom za praćenje motoričke aktivnosti koji je opisan u prethodnom odjeljku. Za vrijeme **pokusa 1** praćena su 3 kaveza s kontrolnim i 3 kaveza sa životinjama tretiranim STZ-icv, dok su u **pokusu 2** bila 4 kaveza s kontrolnim i 4 kaveza sa STZ-icv životinjama. U svakom kavezu nalazile su se 3 životinje. U **pokusu 1** životinje su se pratile kontinuirano kroz vremensko razdoblje od 14 dana od druge primjene STZ-icv. U **pokusu 2** kontinuirano praćenje trajalo je 6 dana, a započeto je odmah nakon prve primjene STZ-icv. Za vrijeme trajanja oba pokusa, osim motoričke aktivnosti, kontinuirano su se bilježili podaci o okolišnim uvjetima u prostoriji u kojoj su životinje boravile (prisutnost osoblja, osvjetljenje, temperatura zraka i relativna vlažnost zraka) Svi podaci o kretanju pohranjeni su u datoteke zarezom odvojenih vrijednosti (CSV, prema engl. *comma-separated values*). Svi su podaci kompletni, osim vremenskog razdoblja od 15 minuta tijekom drugog pokusa koji nedostaje zbog nestanka struje u zgradi fakulteta. Obrada podataka učinjena je paketom funkcija na način opisan u prethodnom poglavlju.

## **Žrtvovanje životinja i homogeniziranje tkiva**

Životinje su na kraju pokusa žrtvovane za potrebe dobivanja biološkog materijala za daljnju analizu (za potrebe HRZZ projekta) primjenom prekomjerne doze tiopental (50 mg/kg) i diazepama (5 mg/kg) te zatim dekapitacijom. Neposredno nakon žrtvovanja, mozgovi životinja izvađeni su i podvrgnuti anatomskej disekciji, a tkivo je pohranjeno na -80°C do analize.

U procesu homogenizacije uzoraka tkivo je podvrgnuto trima ciklusima sonifikacije (Microson Ultrasonic Cell Disruptor XL, Manassas, VA, SAD) u tri volumena pufera za lizu koji sadrži 10 mM HEPES, 1 mM EDTA, 100 mM KCl, 1% Triton X-100, koktel inhibitora proteaza

(Sigma) i inhibitor fosfataze (Roche) (pH 7,5) na ledu. Homogenati su centrifugirani 10 minuta pri 12000 obrtaja u minuti (13700g) i 4°C.

Za analitičku normalizaciju, izmjerena je proteinska koncentracija supernatanta metodom po Lowryju (35). Prvo su pripremljeni standardi goveđeg serumskog albumina (BSA, prema engl. *bovine serum albumin*) u 0,1 N HCl. U 10 µL supernatanta centrifugiranog homogenata dodano je 2 mL reagensa bakrova sulfata (49 mL otopine 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> u 0,1 M NaOH, 0,5 mL 1% CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0,5 mL 2% NaK tartarata). Nakon 10 minuta, dodano je 0,2 mL Folin reagensa (Folin-Ciocalteu i H<sub>2</sub>O, 2:1). Apsorbancija uzoraka mjerena je spektrofotometrijom pri valnoj duljini od 750 nm (Iskra HPV 220, Slovenija), a koncentracija proteina u uzorcima izračunata je na temelju krivulje dobivene mjerenjem standardnih otopina BSA.

### **Analiza lipidne peroksidacije u homogenatima hipotalamusa**

Lipidna peroksidacija u tkivu hipotalamusa procijenjena je na temelju kvantifikacije adukta malondialdehida i tiobarbiturne kiseline pomoću eseja za mjerenje količine molekula koje reagiraju s tiobarbiturnom kiselinom (engl. *thiobarbituric acid reactive substances assay*; TBARS) (36). Ukratko, 36 µl tkivnog homogenata pomiješano je s 400 µl TBARS-TCA reagensa (0,375% tiobarbiturne kiseline u 15% trikloroacetnoj kiselini) i 165 µl ddH<sub>2</sub>O u plastičnim mikrotubicama od 1,5 ml kojima je prethodno izbušen poklopac. Uzorci su inkubirani u bloku za grijanje 95°C tijekom 20 minuta te ohlađeni na sobnu temperaturu. Mikrotubice su centrifugirane 10 sekundi kako bi se denaturirani proteini i stanični debris precipitali te je 500 µl supernatanta pomiješano s jednakim volumenom n-butanola s ciljem izdvajanja adukta malondialdehida i tiobarbiturne kiseline. Nakon izdvajanja, 200 µl frakcije butanola svakog uzorka prebačeno je u pločicu s 96 bunarića (Costar) te je izmjerena apsorbancija uzoraka na 540 nm pomoću multimodalnog čitača pločica Infinite F200 PRO (Tecan, Švicarska). Koncentracija adukta procijenjena je na temelju molarnog ekstinkcijskog koeficijenta od 1,56x10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> i puta svjetlosti od 0,5 cm. Koncentracija adukta normalizirana je na temelju otprije poznate koncentracije proteina uzoraka izmjerene metodom po Lowryju.

## Statistička analiza

Koncentracija malondialdehida u tkivu hipotalamusa kontrolnih i STZ-icv životinja uspoređena je Wilcoxonovim testom zbroja rangova za usporedbu neparametrijskih podataka iz dvije nezavisne skupine. U analizi korištena je dvostrana alternativna hipoteza. Statistički značajnom smatrali smo p vrijednost  $<0,05$ .

## Rezultati

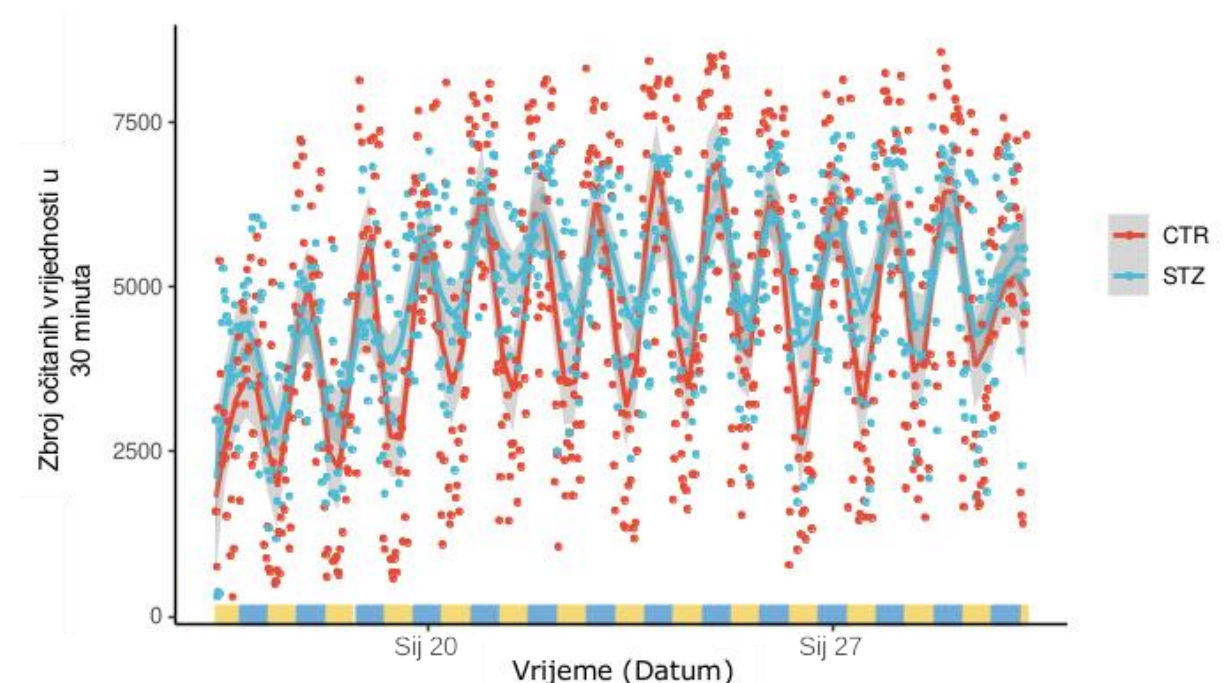
### Procjena cirkadijanog ritma u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti pomoću razvijenog sustava za praćenje lokomotorne aktivnosti

Kontrolne i životinje tretirane sa STZ-icv pratili smo u dva pokusa sustavom za praćenje motoričke aktivnosti. U **pokusu 1** praćenje motoričke aktivnosti započelo je nakon druge primjene STZ-icv. Rezultati dobiveni prethodno opisanom analizom podataka zabilježenih sustavom za praćenje motoričke aktivnosti, prikazani su na Slikama 4 i 5. Rezultati su predloženi u obliku točaka (svaka predstavlja kumulativnu vrijednost kretanja svih životinja kontrolne, odnosno STZ-icv skupine u vremenskim intervalima od 30 minuta) te linije dobivene neparametrijskom regresijom pomoću Savitsky-Golay filtera za izgladivanje rasapa na temelju lokalnih vrijednosti. Iz podataka ovog pokusa prikazanih na Slici 4, vidi se cirkadijana periodičnost unutar svake skupine u vidu povećane dnevne, a smanjene noćne motoričke aktivnosti. Razlike u amplitudama između skupina vidljive su već 2.-3. dan nakon druge primjene STZ-icv. Konkretno, može se zamijetiti da je za vrijeme noći kretanje kontrolnih životinja bilo mnogo izraženije nego kretanje životinja tretiranih sa STZ-icv, dok su životinje tretirane sa STZ-icv danju bile aktivnije od kontrolnih. Drugim riječima, kod STZ-icv tretiranih životinja smanjena je cirkadijana oscilacija u količini aktivnosti naspram kontrolne skupine.

Budući da su u pokusu 1 mjerenja počela tek nakon druge primjene STZ, a promjene su detektirane ubrzo nakon primjene, u **pokusu 2** odlučili smo pratiti životinje već od prve STZ-icv primjene i fokusirati se samo na rane promjene. Na slici 5A uočava se isti trend kao i na slici 4. U ovom smo pokusu analizirali i podatke zabilježene senzorom niske osjetljivosti (slika 5B i 5D). Takvim senzorom bilježe se samo izražena kretanja životinja (npr. trčanje po kavezu), dok male kretnje (npr. timarenje i sl.) ostaju nezabilježene. Zanimljivo, iz podataka zabilježenih takvim

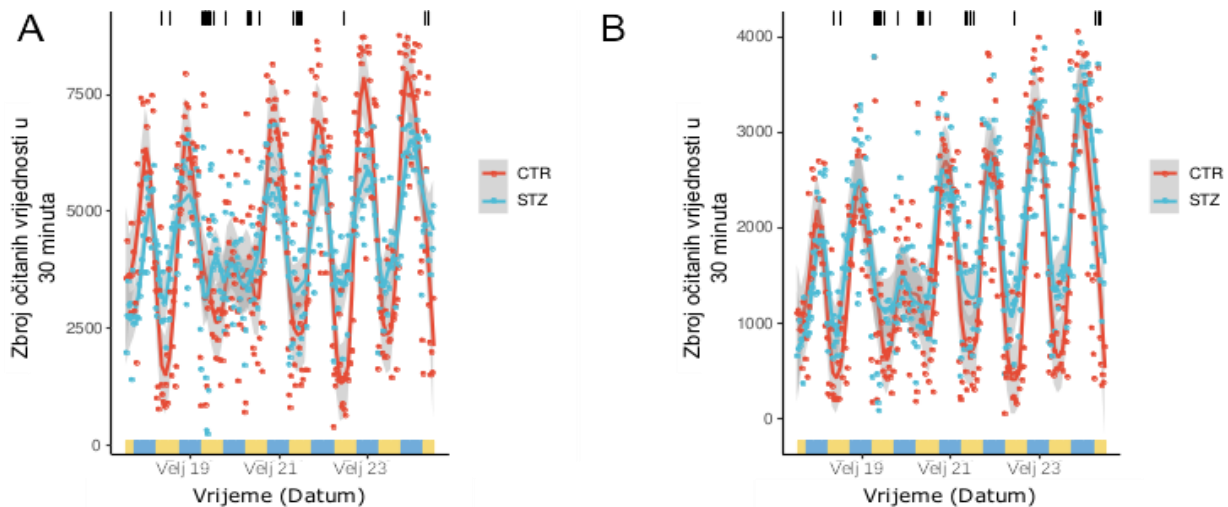
senzorom nismo zamijetili promjene između grupa za vrijeme dana, već samo za vrijeme dana kada su životinje tretirane sa STZ-icv bile aktivnije od kontrolnih životinja (Slika 5B).

Za dodatnu metriku koju smo željeli istražiti definirali smo veličinu koja označava broj započetih pokreta i zanemaruje trajanje pokreta. Rezultati ovako obrađenih podataka nakon druge primjene STZ dobiveni s obje vrste senzora pokazuju jasnu periodičnost i konzistentni su s podacima na Slici 5. Uz to, senzorom visoke osjetljivosti (koji bilježi krupne i fine pokrete), zabilježili smo naglašenije razlike u kretanju životinja uspoređujući različite kaveze koje se ne mogu opaziti u podacima zabilježenim senzorom niske osjetljivosti (koji bilježi samo krupne pokrete). Senzorom niske osjetljivosti također jasno opažamo veći broj započetih kretnji danju u STZ skupini.

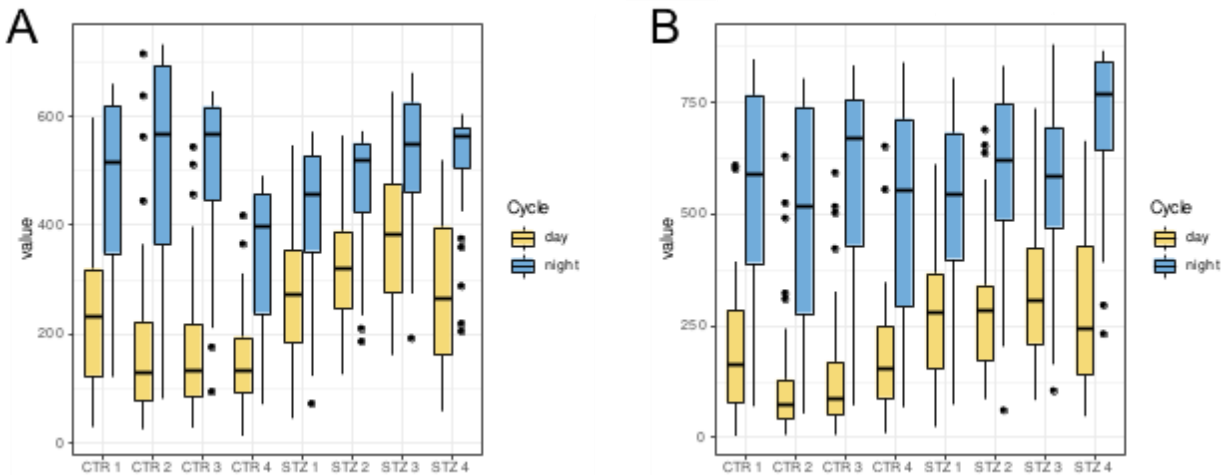


**Slika 4. Kretanja životinja u 6 kaveza, u periodu od 14 dana nakon druge primjene ICV STZ.**

Svaka točka predstavlja kumulativnu vrijednost kretanja svih životinja kontrolne, odnosno STZ-icv skupine u vremenskim intervalima od 30 minuta. Linija je dobivena neparametrijskom regresijom pomoću Savitsky-Golay filtera za izgladivanje rasapa na temelju lokalnih vrijednosti. Plave i žute crte na dnu grafikona označavaju ciklus dana (žuto) i noći (plavo). Mjerenje je provedeno tijekom siječnja 2020.



**Slika 5.** Kretanja životinja u 8 kaveza za vrijeme eksperimenta sumarno prikazano nakon grupiranja očitavanja u intervale od 30 minuta. A) Linijski grafikon kretanja životinja detektiran senzorom visoke osjetljivosti. B) Linijski grafikon kretanja životinja detektiran senzorom niske osjetljivosti. U A) i B) crne linije na vrhu grafikona označavaju ulazak osoblja u prostoriju u kojoj su se životinje nalazile, a plave i žute crte na dnu grafikona označavaju ciklus dana i noći. Mjerenja su provedena tijekom veljače 2020.

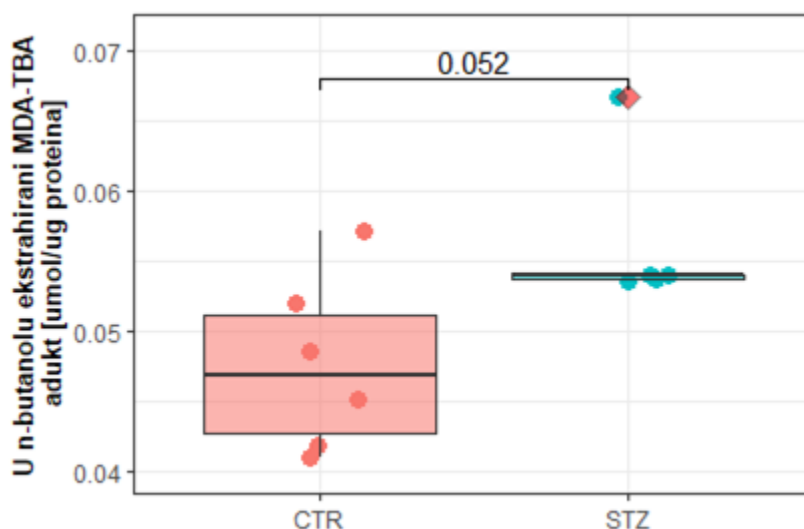


**Slika 6.** Broj započelih pokreta životinja u 8 kaveza prikazan po danima i ukupno za sve vrijednosti očitane nakon druge primjene STZ-icv. U svim podacima odbačene su vrijednosti koje su zabilježene 2 sata prije i nakon izmjene ciklusa dana i noći. A) Kutijasti grafikon koji sumarno prikazuje broj započelih pokreta životinja u pojedinom kavezu zabilježenih senzorom visoke osjetljivosti. B) Kutijasti grafikon koji prikazuje sumarno broj započelih pokreta životinja zabilježenih senzorom niske osjetljivosti. Točke predstavljaju odstupajuće vrijednosti (engl. *outliers*) pripadajućeg kaveza.



## Analiza lipidne peroksidacije u homogenatima hipotalamusa

Lipidna peroksidacija analizirana pomoću TBARS metode na temelju kvantifikacije adukta malondialdehida (MDA) i tiobarbiturne kiseline (MDA-TBA) u ukazuje na povećanu količinu malondialdehida, odnosno na povećanu lipidnu peroksidaciju i oksidativni stres u tkivu hipotalamusa STZ-icv tretiranih životinja (Slika 7).



**Slika 7. Mjera lipidne peroksidacije u hipotalamusu.** Izražena kao količina MDA-TBA adukta u mikromolima izdvojena u frakciji n-butanola, a normalizirana prema masi proteina u uzorku u mikrogramima, uspoređena između skupina Wilcoxonovim testom zbroja rangova za usporedbu neparametrijskih podataka iz dvije nezavisne skupine. Razina značajnosti iznosi  $p = 0,052$  što smo, s obzirom na činjenicu da je korištena dvosmjerna alternativna hipoteza, protumačili kao sugestiju učinka.

## Rasprava

Poremećaj cirkadijanog ritma uočen je, ali je još nedovoljno istražen u bolesnika koji boluju od sAB, posebno u presimptomatskoj fazi. Stoga je istraživanje ranih promjena ograničeno na životinjske modele sAB, o čemu postoje skromni literaturni podaci (18–20). Rezultati ovog istraživanja na štakorskom STZ-icv modelu sAB pokazali su, temeljem praćenja cirkadijane motoričke aktivnosti, da su promjene cirkadijanog ritma prisutne rano, unutar dva do tri dana po primjeni STZ-icv.

U rezultatima praćenja motoričke aktivnosti najupečatljivija je jasna cirkadijana periodičnost kretanja životinja. Pomnijom analizom grafikona lako je potom uočiti razlike između dviju promatranih skupina - kontrolne skupine i skupine tretirane STZ-icv. U odnosu na kontrolnu skupinu, kod STZ-icv skupine može se već u 3. danu nakon posljednje primjene STZ zamijetiti odstupanje od motoričkog obrasca kontrolne skupine, ponajviše u vidu povećanja dnevne aktivnosti, a smanjenja noćne. To se na grafikonu očituje kao smanjenje raspršenosti podatkovnih točaka, odnosno njihovo "zgušnjavanje" kod STZ-icv skupine što govori o ukupnom smanjenju cirkadijanih oscilacija motoričke aktivnosti. Aktivnost je postojanija i ne jenjava tijekom dana kada bismo očekivali spavanje, ali niti ne doseže razine aktivnosti kontrolne skupine tijekom noći. Ovi se pronalasci podudaraju s istraživanjima na pacijentima koji boluju od sAB (14) u kojih su izraženi problemi s usnivanjem, fragmentacija sna te učestalo spavanje danju. Dobiveni rezultati također su u skladu s istraživanjima provedenim na transgeničnim životinjskim modelima AB (13) u kojih je primijećena povećana budnost danju, a slabija aktivnost noću u životinja starosti od 5 mjeseci (pre-morbidni stadij) do 15 mjeseci (stadij s umjerenom depozicijom A $\beta$  plakova), bez korelacije s njihovom dobi.

Do sada nema studija koje su pratile razvoj poremećaja cirkadijanog ritma pomoću motoričke aktivnosti u STZ-icv modelu sAB. U jednom od rijetkih dosadašnjih istraživanja od strane Song i sur. na muškim Wistar štakorima nepoznate starosti s 8-10 životinja po skupini, najranije mjerenje rađeno je kroz 24 sata 7 dana nakon STZ-icv primjene metodom elektroencefalografije, koje je potom ponovljeno 14. i 21. dan s progresivnim smanjenjem količine sna, na račun REM (brzi pokreti očiju, prema engl. *rapid eye movement*) i NREM (ne-REM, prema engl. *non-REM*) sna u manjoj, a SWS (sporovalnog, prema engl. *slow-wave sleep*) sna u većoj mjeri za vrijeme dana. Nije nađena značajna razlika u budnosti za vrijeme noći. Elektroencefalografijom također su pronađene značajne promjene oscilatorne moždane aktivnosti u budnosti, REM i NREM snu (18). Druga studija istog tima, na 200 muških Wistar štakora nepoznate dobi, elektroencefalografskim mjerenjima 14. dana nakon administracije STZ također bilježi produljenje perioda budnosti i poremećaj sna, uz elektroencefalografske promjene istog tipa u fazama sna (19). Konačno, drugi tim također bilježi povećanje ukupne količine budnosti, ali 30 dana od primjene STZ (20).

Niti jedna od ovih studija nije pratila kontinuirani razvoj ovih promjena, najvjerojatnije zbog prethodno opisanih nedostataka elektroencefalografske metode praćenja ciklusa budnosti u vidu visoke cijene, tehnički zahtjevnog postavljanja elektroda i potrebe za kompleksnom analizom dobivenih podataka. S druge strane, razdoblja izostanka motoričke aktivnosti pokazala su se kao

dobar surogat za nadziranje budnosti (37), a ovdje opisana metoda korištenja pasivnih infracrvenih senzora je jeftina, ne uključuje implantate i daje bogate, ali strojno lako obradive podatke naspram elektroencefalografije. Ove karakteristike su nam omogućile kontinuirano nadziranje životinja između, i neposredno nakon dvije primjene STZ te time prve podatke koji pokazuju da poremećaj cirkadijanog ritma nastaje već nakon 48-72 sata od druge icv primjene ove tvari. Ovako rana pojava poremećaja cirkadijanog ritma, čak i prije razvoja kognitivnih deficita, podudara se s ranom pojavom ovih poremećaja u pacijenata sa sAB (14) i transgeničnim modelima AB (13) relativno vremenu nastupa drugih simptoma.

Glavni uzrok promjena cirkadijanog ritma u STZ-icv modelu u prvim danima nakon STZ-icv primjene tek treba biti razjašnjen te će to biti i jedan od fokusa naših daljnjih istraživanja. Jedan od mogućih mehanizama kojim STZ-icv uzrokuje poremećaj cirkadijanog ritma mogao bi biti oštećenje hipotalamusa budući da se u hipotalamusu nalazi SCN (suprahijazmatska jezgra, prema engl. *suprachiasmatic nucleus*) koja je zadužena za organizaciju i sinkronizaciju cirkadijane ritmičnosti. Oštećenje hipotalamusa u STZ-icv modelu mogla bi objasniti pomoću ekspresija GLUT2, proteina koji se smatra glavnim transporterom za unos streptozotocina u stanicu, a čija je ekspresija posebno izražena u hipotalamusu i cirkumventrikularnim organima (38), gdje GLUT2 sudjeluje u regulaciji unosa hrane (39). Druga istraživanja također sugeriraju da primjena STZ-icv uzrokuje funkcionalne ispade hipotalamičkih funkcija. Bloch i suradnici opisali su rani gubitak tjelesne mase štakora nakon STZ-icv u Lewis štakora nakon kojeg je uslijedio nagli porast tjelesne mase i niz perifernih metaboličkih promjena. Ove su promjene objasnili citotoksičnim učinkom na hipotalamus za koji su zaključili da je glavna meta STZ-icv (40). Motzko-Soares i sur. pokazali su da STZ-icv uzrokuje autonomnu disfunkciju i poremećaj termoregulacije, funkcije koje su također fiziološki usko povezane s hipotalamusom (41). U prilog tome govore istraživanja koja su pokazala značajno nakupljanje A $\beta$  u hipotalamusu 30 dana nakon primjene STZ-icv, u trenutku kada nakupljanje u hipokampusu i korteksu nije statistički značajno (25), a čini se da je tada i metabolizam glukoze najviše smanjen upravo u hipotalamusu (26), što bi također moglo ponuditi podlogu objašnjenja zašto se poremećaji cirkadijanog ritma pojavljuju značajno prije nastupa kognitivnog deficita. STZ-icv model karakteriziraju i druge patološke promjene karakteristične za sAB u vidu neuroupale (22) i oksidativnog stresa (42) koji također doprinose progresivnom razaranju moždanih struktura. S time na umu, izmjerili smo povećanu lipidnu peroksidaciju kao parametar oksidativnog stresa u tkivu hipotalamusa metodom kvantifikacije adukta malondialdehida i tiobarbiturne kiseline pomoću TBARS eseja. Povećan

oksidativni stres u hipotalamusu svakako govori u prilog ovom mehanizmu kao potencijalnom faktoru koji igra ulogu u nastanku zamijećenog poremećaja cirkadijanog ritma.

U ljudi koji boluju od sAB, čini se da cirkadijani ritam ima dvosmjernu ulogu u patogenezi i razvoju same bolesti (2). Ipak, kako je cirkadijani ritam razmjerno malo istražen u STZ-icv modelu sAB, a poremećaji istog su očiti u STZ-icv modelu, smatramo da je daljnje proučavanje neophodno, pogotovo u vidu vrlo ranog nastanka poremećaja nakon posljednje injekcije STZ i ove nove mogućnosti neinvazivnog, dugoročnog praćenja.

Neke značajke ove studije možda se mogu translirati i u klinički kontekst. Trenutno ne postoji liječenje koje bi utjecalo na tijek sAB, no vrlo brzo se pojavljuju naznake novih terapija koje počivaju na hipotezi IRBS-a, s pozitivnim djelovanjem na neke čimbenike povezane s progresijom kognitivnog oštećenja u sAB, poput metabolizma glukoze u mozgu (43). Kako je za očekivati da će terapija biti efikasnija što se ranije primijeni, pogotovo s obzirom na uznapreovalost neurodegenerativnih procesa, postoji potreba za jasnom karakterizacijom ranih znakova sAB koji bi omogućili razvoj testova probira i postavljanje sumnje već u stadiju blagog kognitivnog oštećenja ili i prije. Daljnje istraživanje razvoja ranih stadija sAB u životinjskom modelu također potencijalno otvara vrata mogućnosti ispitivanja različitih farmakoterapijskih pristupa ciljano u ranom stadiju sAB, što trenutno nije moguće s preciznošću.

Poremećaj cirkadijanog ritma zasad ima sporednu ulogu u ovom kontekstu, vjerojatno zbog nedovoljno spoznaja, ali i iz razloga što je, u izostanku drugih simptoma, teško tražiti krivca u poremećaju cirkadijanog ritma samom po sebi kao nespecifičnom simptomu, pogotovo u današnje vrijeme kada je incidencija vjerojatno u porastu uslijed novog načina života prepunim plavog svjetla ekrana (44), radom u noćnim smjenama (45) i slično. Ipak, poremećaji cirkadijanog ritma obuhvaćaju bezbroj mogućih obrazaca sna i motoričke aktivnosti, među kojima može postojati i niz samo suptilnih razlika, što je već i u ovom radu oprimjerila analiza započelih pokreta kao nova, izdvojena metrika koja bi mogla početi bolje rasvjetljivati motorički fenotip životinje. Jasno je da se, što se tiče analize podataka, radi o iznimno velikom pothvatu koji će zahtijevati kompleksno, oprezno statističko modeliranje, a u jednom trenutku svakako i napredne tehnologije poput strojnog učenja (46), no vidimo da se sirovi podaci već sada mogu skupljati na neinvazivan način u laboratorijskih životinja. Skupljanje ljudskih podataka je kompleksnije, no također je već danas moguće pomoću mobilnih uređaja i pametnih satova, od kojih danas gotovo svi posjeduju ugrađeni akcelerometar kao izvor motoričkih podataka (47).

Važno je naglasiti da nova metoda predstavljena ovdje nadilazi primjenu u modelu sAB te se može primijeniti u praćenju motoričke aktivnosti drugih životinja i u modelima drugih bolesti, kontinuirano, kroz dulji period vremena. Postoje i neka ograničenja ove metode - za razliku od EEG-a, direktno praćenje faza sna nije moguće te nije moguće razabrati kretnje pojedinih životinja u jednom kavezu, ako ih je u kavezu više od jedne. Ipak, daljnjom analizom dobivenih podataka i prikupljanjem novih postoji potencijal za otkrivanje novih surogat parametara, slično kako se to pokazalo slučajem za video nadzor životinja, iz kojeg je moguće procijeniti REM i NREM faze sna (48). Bogatstvo dobivenih podataka i potreba za iscrpnom i stručnom analizom očituje se, primjerice, već i u spomenutoj dodatnoj, izvedenoj mjeri ukupnog broja aktivacija senzora, neovisno o trajanju aktivacije (Slika 6). Ona zapravo govori o broju započetih pokreta i utoliko bi potencijalno mogla poslužiti kao surogat mjeri impulzivnosti. Činjenica da danju postoji jasno povećanje broja započetih pokreta u štakora tretiranih STZ-icv, ali samo mjerljivo senzorom visoke osjetljivosti, govori da se radi o novom parametru, različitom od ukupne količine kretanja što opravdava njegovu daljnju, zasebnu karakterizaciju. Kako su svi ovi podaci novi oblik praćenja motoričke aktivnosti životinja, novi načini obrade istih i prepoznavanja potencijalno važnih obrazaca predmet su našeg daljnjeg istraživanja.

## Zaključci

1. U štakorskom STZ-icv modelu sAB prisutan je poremećaj cirkadijanog ritma temeljen na praćenju kontinuirane motoričke aktivnosti tijekom mjesec dana nakon STZ-icv primjene.
2. Do poprimanja karakterističnog motoričkog obrasca u STZ-icv štakora, koji je različit od onog u kontrolnih životinja (veća aktivnost tijekom dana, smanjena tijekom noći), dolazi već 2. do 3. dan nakon posljednje primjene STZ-icv.
3. Značajne razlike prisutne su u intenzitetu motoričke aktivnosti ali su manje razlike koje se mogu detektirati samo najosjetljivijom konfiguracijom senzora, prisutne i u načinu kretanja detektiranom kao broj započetih pokreta.
4. Neinvazivno dugoročno praćenje obrazaca motoričke aktivnosti laboratorijskih životinja moguće je i izvedivo pomoću sustava opisanog u ovom istraživanju.
5. Obzirom da je u hipotalamusu STZ-icv životinja nađena povećana lipidna peroksidacija, moguće je da su poremećaji cirkadijanog ritma u ovom modelu sAB posredovani oksidativnim stresom.

## Zahvale

Zahvaljujem mentorici prof.dr.sc. Meliti Šalković-Petrišić na strpljivoj i temeljitoj pomoći i savjetima te ukazanom povjerenju da pokušam materijalizirati ideju u njezinom laboratoriju.

Ivanu Kodvanju posebno zahvaljujem na pomoći u izradi specijaliziranog R paketa funkcija za obradu prikupljenih podataka i na pomoći i savjetovanju pri korištenju i opisivanju istog. Dr. Janu Homolaku posebno zahvaljujem na strpljivom uvođenju u problematiku kojom se bavi u Laboratoriju za molekularnu neurofarmakologiju, što je pokrenulo moju radoznalost i interes za znanost. Uz to, i Ivanu, i Janu zahvaljujem na nesebičnoj pomoći i potpori te nebrojenim satima razgovora i diskusije kroz koje sam stekao pregršt znanja, ali i energije i odvažnosti *pokušati*.

Svima navedenima i ostalim suradnicima u Laboratoriju za molekularnu neurofarmakologiju te djelatnicima Zavoda za farmakologiju zahvaljujem što su svojom toplinom i srdačnošću Zavod učinili mjestom gdje uvijek dolazim s osmijehom.

## Popis literature

1. Calvo F, Karras BT, Phillips R, Kimball AM, Wolf F. Diagnoses, syndromes, and diseases: a knowledge representation problem. AMIA Annu Symp Proc AMIA Symp. 2003.;802.
2. Homolak J, Mudrovčić M, Vukić B, Toljan K. Circadian Rhythm and Alzheimer's Disease. Med Sci Basel Switz. 21. lipanj 2018.;6(3).
3. GBD 2016 Dementia Collaborators. Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. Lancet Neurol. siječanj 2019.;18(1):88–106.
4. Prince M, Guerchet M, Prina M. Policy Brief: The Global Impact of Dementia 2013–2050". Alzheimer's Dis Int. 2013.;(<https://www.alz.co.uk/research/GlobalImpactDementia2013.pdf>. Pristupljeno 26).
5. Banerjee S, Smith SC, Lamping DL, Harwood RH, Foley B, Smith P, i ostali. Quality of life in dementia: more than just cognition. An analysis of associations with quality of life in dementia. J Neurol Neurosurg Psychiatry. veljača 2006.;77(2):146–8.
6. Davidson M, Schnaider Beerli M. Cost of Alzheimer's disease. Dialogues Clin Neurosci. lipanj 2000.;2(2):157–61.

7. Bature F, Guinn B-A, Pang D, Pappas Y. Signs and symptoms preceding the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic scoping review of literature from 1937 to 2016. *BMJ Open*. 28. kolovoz 2017.;7(8):e015746.
8. Ownby RL, Crocco E, Acevedo A, John V, Loewenstein D. Depression and risk for Alzheimer disease: systematic review, meta-analysis, and metaregression analysis. *Arch Gen Psychiatry*. svibanj 2006.;63(5):530–8.
9. Tulbă D, Cozma L, Popescu BO, Davidescu EI. Dysautonomia in Alzheimer's Disease. *Med Kaunas Lith*. 08. srpanj 2020.;56(7).
10. Cai H, Cong W, Ji S, Rothman S, Maudsley S, Martin B. Metabolic dysfunction in Alzheimer's disease and related neurodegenerative disorders. *Curr Alzheimer Res*. siječanj 2012.;9(1):5–17.
11. Ishii M, Iadecola C. Metabolic and Non-Cognitive Manifestations of Alzheimer's Disease: The Hypothalamus as Both Culprit and Target of Pathology. *Cell Metab*. 03. studeni 2015.;22(5):761–76.
12. Musiek ES, Bhimasani M, Zangrilli MA, Morris JC, Holtzman DM, Ju Y-ES. Circadian Rest-Activity Pattern Changes in Aging and Preclinical Alzheimer Disease. *JAMA Neurol*. 01. svibanj 2018.;75(5):582–90.
13. Wisor JP, Edgar DM, Yesavage J, Ryan HS, McCormick CM, Lapustea N, i ostali. Sleep and circadian abnormalities in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: a role for cholinergic transmission. *Neuroscience*. 2005.;131(2):375–85.
14. Musiek ES, Xiong DD, Holtzman DM. Sleep, circadian rhythms, and the pathogenesis of Alzheimer disease. *Exp Mol Med*. 13. ožujak 2015.;47:e148.
15. Hahn EA, Wang H-X, Andel R, Fratiglioni L. A change in sleep pattern may predict Alzheimer disease. *Am J Geriatr Psychiatry Off J Am Assoc Geriatr Psychiatry*. studeni 2014.;22(11):1262–71.
16. De Gennaro L, Gorgoni M, Reda F, Lauri G, Truglia I, Cordone S, i ostali. The Fall of Sleep K-Complex in Alzheimer Disease. *Sci Rep*. 03. siječanj 2017.;7:39688.
17. Mullane K, Williams M. Preclinical Models of Alzheimer's Disease: Relevance and Translational Validity. *Curr Protoc Pharmacol*. ožujak 2019.;84(1):e57.

18. Song J-Z, Cui S-Y, Cui X-Y, Hu X, Ma Y-N, Ding H, i ostali. Dysfunction of GABAergic neurons in the parafacial zone mediates sleep disturbances in a streptozotocin-induced rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Metab Brain Dis.* veljača 2018.;33(1):127–37.
19. Cui S-Y, Song J-Z, Cui X-Y, Hu X, Ma Y-N, Shi Y-T, i ostali. Intracerebroventricular streptozotocin-induced Alzheimer's disease-like sleep disorders in rats: Role of the GABAergic system in the parabrachial complex. *CNS Neurosci Ther.* prosinac 2018.;24(12):1241–52.
20. Vicente MC, Almeida MC, Bicego KC, Carrettiero DC, Gargaglioni LH. Hypercapnic and Hypoxic Respiratory Response During Wakefulness and Sleep in a Streptozotocin Model of Alzheimer's Disease in Rats. *J Alzheimers Dis JAD.* 2018.;65(4):1159–74.
21. Šalković-Petrišić 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.* veljača 2006.;96(4):1005–15.
22. Knezović A, Lončar A, Homolak J, Smailović U, Osmanović Barilar J, Ganoci L, i ostali. Rat brain glucose transporter-2, insulin receptor and glial expression are acute targets of intracerebroventricular streptozotocin: risk factors for sporadic Alzheimer's disease? *J Neural Transm Vienna Austria 1996.* lipanj 2017.;124(6):695–708.
23. Šalković-Petrišić M, Hoyer S. Central insulin resistance as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: an experimental approach. *J Neural Transm Suppl.* 2007.;(72):217–33.
24. Saper CB. The central circadian timing system. *Curr Opin Neurobiol.* listopad 2013.;23(5):747–51.
25. Santos TO, Mazucanti CHY, Xavier GF, Torráo AS. Early and late neurodegeneration and memory disruption after intracerebroventricular streptozotocin. *Physiol Behav.* 10. listopad 2012.;107(3):401–13.
26. Knezović A, Osmanović Barilar J, Babić A, Bagarić R, Farkaš V, Riederer P, i ostali. Glucagon-like peptide-1 mediates effects of oral galactose in streptozotocin-induced rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Neuropharmacology.* lipanj 2018.;135:48–62.
27. Shoham S, Bejar C, Kovalev E, Weinstock M. Intracerebroventricular injection of streptozotocin causes neurotoxicity to myelin that contributes to spatial memory deficits in rats. *Exp Neurol.* prosinac 2003.;184(2):1043–52.



28. Bains RS, Wells S, Sillito RR, Armstrong JD, Cater HL, Banks G, i ostali. Assessing mouse behaviour throughout the light/dark cycle using automated in-cage analysis tools. *J Neurosci Methods*. 15. travanj 2018.;300:37–47.
29. Mayer G, Nitsch R, Hoyer S. Effects of changes in peripheral and cerebral glucose metabolism on locomotor activity, learning and memory in adult male rats. *Brain Res*. 05. studeni 1990.;532(1–2):95–100.
30. Lacković Z, Salković M. Streptozotocin and alloxan produce alterations in rat brain monoamines independently of pancreatic beta cells destruction. *Life Sci*. 1990.;46(1):49–54.
31. Silvan Chip Electronics Tech. Co. Ltd. BIS0001 PIR Controller [Internet]. 2020 [citirano 26. kolovoz 2020.]. Dostupno na: <http://www.sc-tech.cn/en/BISS0001.pdf>.
32. Microchip Technology Inc. MCP23017/MCP23S17 Data Sheet [Internet]. 2016 [citirano 18. kolovoz 2020.]. Dostupno na: <https://ww1.microchip.com/downloads/en/DeviceDoc/20001952C.pdf>.
33. N.X.P. Semiconductors. UM10204 - I2C-bus specification and user manual. Revision 6 [Internet]. 2014 [citirano 08. kolovoz 2020.]. Dostupno na: <https://www.nxp.com/docs/en/user-guide/UM10204.pdf>.
34. Microchip Technology Inc. ATmega328P Data Sheet [Internet]. 2018 [citirano 13. kolovoz 2020.]. Dostupno na: <http://ww1.microchip.com/downloads/en/DeviceDoc/ATmega48A-PA-88A-PA-168A-PA-328-P-DS-DS40002061A.pdf>.
35. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. studeni 1951.;193(1):265–75.
36. Prabhakar PV, Reddy UA, Singh SP, Balasubramanyam A, Rahman MF, Indu Kumari S, i ostali. Oxidative stress induced by aluminum oxide nanomaterials after acute oral treatment in Wistar rats. *J Appl Toxicol JAT*. lipanj 2012.;32(6):436–45.
37. Pack AI, Galante RJ, Maislin G, Cater J, Metaxas D, Lu S, i ostali. Novel method for high-throughput phenotyping of sleep in mice. *Physiol Genomics*. 17. siječanj 2007.;28(2):232–8.
38. Grieb P. Intracerebroventricular Streptozotocin Injections as a Model of Alzheimer's Disease: in Search of a Relevant Mechanism. *Mol Neurobiol*. travanj 2016.;53(3):1741–52.

39. Stolarczyk E, Guissard C, Michau A, Even PC, Grosfeld A, Serradas P, i ostali. Detection of extracellular glucose by GLUT2 contributes to hypothalamic control of food intake. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* svibanj 2010.;298(5):E1078-1087.
40. Bloch K, Gil-Ad I, Vanichkin A, Hornfeld SH, Koroukhov N, Taler M, i ostali. Intracerebroventricular Streptozotocin Induces Obesity and Dementia in Lewis Rats. *J Alzheimers Dis JAD.* 2017.;60(1):121–36.
41. Motzko-Soares ACP, Vizin RCL, Martins TMS, Hungaro ARO, Sato JR, Almeida MC, i ostali. Thermoregulatory profile of neurodegeneration-induced dementia of the Alzheimer's type using intracerebroventricular streptozotocin in rats. *Acta Physiol Oxf Engl.* listopad 2018.;224(2):e13084.
42. Sharma M, Gupta YK. Intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats produces both oxidative stress in the brain and cognitive impairment. *Life Sci.* 19. siječanj 2001.;68(9):1021–9.
43. Gejl M, Gjedde A, Egefjord L, Møller A, Hansen SB, Vang K, i ostali. In Alzheimer's Disease, 6-Month Treatment with GLP-1 Analog Prevents Decline of Brain Glucose Metabolism: Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Clinical Trial. *Front Aging Neurosci.* 2016.;8:108.
44. Cajochen C, Frey S, Anders D, Späti J, Bues M, Pross A, i ostali. Evening exposure to a light-emitting diodes (LED)-backlit computer screen affects circadian physiology and cognitive performance. *J Appl Physiol Bethesda Md 1985.* svibanj 2011.;110(5):1432–8.
45. Kervezee L, Shechter A, Boivin DB. Impact of Shift Work on the Circadian Timing System and Health in Women. *Sleep Med Clin.* rujana 2018.;13(3):295–306.
46. Rodriguez-Morilla B, Estivill E, Estivill-Domènech C, Albares J, Segarra F, Correa A, i ostali. Application of Machine Learning Methods to Ambulatory Circadian Monitoring (ACM) for Discriminating Sleep and Circadian Disorders. *Front Neurosci.* 2019.;13:1318.
47. Balli S, Sağbaş EA, Peker M. Human activity recognition from smart watch sensor data using a hybrid of principal component analysis and random forest algorithm. *Meas Control.* siječanj 2019.;52(1–2):37–45.
48. McShane BB, Galante RJ, Biber M, Jensen ST, Wyner AJ, Pack AI. Assessing REM sleep in mice using video data. *Sleep.* 01. ožujak 2012.;35(3):433–42.

## Životopis

Rođen sam 2. prosinca 1995. u Zagrebu, gdje sam završio II. gimnaziju. Iste godine upisao sam Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. 2018. godine s kolegicom Ana-Marijom Vargantolić započeo sam edukativni neuroznanstveni projekt Radionice s Neurićima u sklopu kojeg smo održali preko 15 radionica u osnovnim i srednjim školama, na različitim sastavnicama Sveučilišta u Zagrebu te u sklopu brojnih javnozdravstvenih manifestacija. Radi se o interaktivnim radionicama simulacije moždane i živčane fiziologije i patofiziologije pomoću malih elektroničkih pločica koje sam osmislio i konstruirao za tu svrhu. Od 2019. godine naovamo učim nove stvari u Laboratoriju za molekularnu neurofiziologiju Zavoda za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof.dr.sc. Melite Šalković-Petrišić te uz dobro društvo Jana Homolaka, dr.med., Ivana Kodvanja, dr.med. i prof.dr.sc. Vladimira Trkulje uz čiju pomoć svoju znatiželju i ljubav prema novim spoznajama pokušavam pretvoriti u nešto korisno. Autor sam dva kongresna sažetka te autor i koautor ukupno 8 znanstvenih radova od kojih su 2 objavljena, 1 na postupku recenzije, a 5 u pripremi za slanje u časopis i objavljeni u *preprint* obliku.