

# Akutni učinak intracerebroventrikularne primjene inhibitora receptora za inkretin na pokazatelje oksidativnog stresa i inzulinske signalizacije u jetri štakorskog modela sporadične Alzheimerove bolesti

---

Joja, Mihovil

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:404629>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-02**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

**Mihovil Joja**

**AKUTNI UČINAK INTRACEREBROVENTRIKULARNE PRIMJENE  
INHIBITORA RECEPTORA ZA INKRETIN NA POKAZATELJE  
OKSIDATIVNOG STRESA I INZULINSKE SIGNALIZACIJE U JETRI  
ŠTAKORSKOG MODELA SPORADIČNE ALZHEIMEROVE BOLESTI**



**Diplomski rad**

Zagreb, 2022.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za molekularnu neurofarmakologiju na Zavodu za farmakologiju i Hrvatskom institutu za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorskim vodstvom prof.dr.sc. Melita 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**“ (šifra projekta HRZZ-IP-2018-01-8938, voditelj projekta prof.dr.sc. Melita Šalković-Petrišić) i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2020./2021.

# Sadržaj

## Vsebina

Uvod .....	1
Alzheimerova boleost .....	1
Uloga jetre u patogenezi sporadične Alzheimerove bolesi .....	2
Životinjski model sporadične Alzheimerove bolesi .....	2
Inkretini u neurodegenerativnim bolestima .....	3
Hipoteza.....	5
Opći i specifični ciljevi rada .....	5
Opći cilj .....	5
Materijali i metode.....	6
Eksperimentalni model sAB.....	6
Središnja inhibicija GIP receptora.....	6
Žrtvovanje i pohrana tkiva.....	6
Mjerenje koncentracije proteina.....	7
Lipidna peroksidacija .....	8
Aktivnost superoksid dismutaze .....	8
Niskomolekularni tioli i sulfhidrilne skupine proteina .....	8
Nitrocelulozna redoks permanganometrija .....	9
Ukupni oksidacijsko-redukcijski potencijal.....	9
Elektroforeza proteina i western blot .....	9
Koncentracija inzulina, GIP-a i aktivnog fragmenta GIP-a u plazmi.....	11
Koncentracija glukoze u plazmi .....	11
Statistička analiza.....	12
Etička dopusnica istraživanja.....	12
Rezultati.....	13
Promjene parametara oksidativnog stresa u jetri .....	13
Promjene inzulinske signalizacije u jetri .....	13
Ekspresija proteina koji sudjeluju u regulaciji metabolizma .....	18
Ekspresija proteina programirane stanične smrti .....	18
Koncentracija glukoze, inzulina, aktivnog i ukupnog GIP-a u plazmi.....	18
Rasprava .....	19
Zaključci.....	22
Zahvale .....	23
Životopis .....	23
Popis literature.....	24
Sažetak.....	30
Summary .....	31

## Popis kratica:

AB - Alzheimerova bolest (prema engl. *Alzheimer's disease*)

Apo E - apolipoprotein E

A $\beta$  - amiloid  $\beta$

APP - amiloidni prekursor protein (prema engl. *amyloid precursor protein*)

BBB - krvno-moždana barijera (prema engl. *blood-brain barrier*)

COX IV - četvrta podjedinica citokrom C oksidaze (prema engl. *cytochrome C oxidase subunit IV*)

fAB - obiteljski oblik Alzheimerove bolesti (prema engl. *familial Alzheimer Disease*)

GLP-1 - glukagonu sličan peptid 1 (prema engl. *glucagon like peptide 1*)

GIP - o glukozu ovisan inzulintropni polipeptid (prema engl. *glucose-dependent insulinotropic peptide*)

icv - intracerebroventrikularno

IDE - enzim koji razgrađuje inzulin (prema engl. *insulin degrading enzyme*)

IR - inzulinski receptor

IRBS - inzulinska rezistencija u mozgu (prema engl. *insulin resistant brain state*)

LMWT - niskomolekularni tioli (prema engl. *low-molecular weight thiols*)

NRP - nitrocelulozna redoks permanganometrija

pAMPK - fosforilirana adenozin monofosfatom aktivirana protein kinaza (prema engl. *phosphorylated AMP-activated protein kinase*)

pIRS 1 - fosforilirani supstrat inzulinskog receptora 1 (prema engl. *phosphorylated insulin receptorsubstrate*)

PBS - fosfatni pufer (prema engl. *phosphate-buffered saline*)

sAB - sporadičan oblik Alzheimerove bolesti (prema engl. *sporadic Alzheimer's disease*)

SAD - Sjedinjene Američke Države

SH - sulfhidrili

SOD - superoksid dizmutaza

STZ - streptozotocin

TBARS - tvari koje reagiraju s tiobarbiturnom kiselinom (prema engl. *thiobarbituric acid reactive substance*)

WHO - svjetska zdravstvena organizacija (prema engl. *World Health Organization*)

# Uvod

## Alzheimerova bolest

Pojam demencije označava progresivan nepovratan gubitak kognitivnih funkcija. Najčešći uzrok demencije je Alzheimerova bolest (AB - prema engl. *Alzheimer's disease*) na koju otpada 50% do 70% svih demencija (Qiu, Kivipelto, i von Strauss 2009). Bolest je dobila ime po njemačkom patologu i neurologu Aloisu Alzheimeru koji je 1909. godine povezao opaženo propadanje intelektualnih sposobnosti 51-godišnje pacijentice s histološkim nalazom tzv. senilnih plakova i neurofibrilarnih vretena. Danas je poznato da senilni plakovi nastaju agregacijom proteina beta amiloida ( $A\beta$ ) u izdancima (neuritima) neurona dok neurofibrilarna vretena odgovaraju nakupinama fosforiliranog protein tau.  $A\beta$  krovni je pojam koji označava peptide od 36-

43 aminokiseline koji u svojoj strukturi sadrže beta ploču, a nastali su proteolitičkom razgradnjom transmembranskog amiloidnog prekursora proteina (APP – prema engl. *amyloid precursor protein*) (Kametani i Hasegawa 2018). U fiziološkim uvjetima preko 90 % APP razgrađuje alfa sekretaza dok ostatak razgrađuju beta i gama sekretaza. Prema amiloidnoj hipotezi u Alzheimerovoj demenciji dolazi do pojačane razgradnje APP beta sekretazom te posljedičnog pojačanog stvaranja hidrofobnih  $A\beta$  42 fragmenata sklonih stvaranju vlaknastih struktura i taloženju (Kametani i Hasegawa 2018). Smatra se da amiloidna hipoteza vjerno opisuje etiopatogenetske procese vezane uz obiteljski oblik Alzheimerove bolesti (fAB – prema engl. *familial Alzheimer Disease*) koji je najčešće uzrokovan mutacijama gena za APP, presenilin 1 i presenilin. Međutim, na fAB otpada tek 5% svih zabilježenih slučajeva AD dok ostatak čini tzv. sporadična Alzheimerova bolest (sAB) (Wang i Ding 2008). Incidencija sAB u Europi iznosi oko 4.4% u osoba starijih od 65 godina (Lobo i sur. 2000), a ekstrapolacijom na Hrvatsku populaciju broj oboljelih iznosi oko 80 000 (Hrvatski zavod za javno zdravstvo bez dat.). Svjetska zdravstvena organizacija (WHO - prema engl. *WorldHealth Organization*) procjenjuje da će ukupni broj oboljelih u svijetu 2050. doseći 131 milijun ljudi, a troškovi liječenja 1.1 milijardu američkih dolara (Stefanacci 2011). Unatoč nedvojbenom biomedicinskom i ekonomskom značaju trenutne su spoznaje o etiopatogenezi sAB manjkave, što za posljedicu ima nezadovoljavajuće dijagnostičke i terapijske strategije. Nesklad važnosti sAB i nedostatnih znanstvenih spoznaja o procesima nastanka bolesti jasno opisuje činjenica da je posljednji lijek (uz izuzetak kontroverznog adukanumaba, nedavno uvjetno odobrenog od strane Američke agencije za hranu i lijekove (Mullard 2021)) odobren prije gotovo 20 godina te da niti jedan lijek razvijen na ideji modulacije poremećene homeostaze  $A\beta$  nije pokazao učinkovitost u kliničkim istraživanjima. Alternativne hipoteze sAB naglašavaju važnost patofizioloških procesa poput pojačane fosforilacije proteina tau, neuroupage, poremećaja funkcije mitohondrija, nedostatnosti krvožilnog sustava, upalnih stanja uslijed prodora patogenih mikroorganizama, poremećaja metabolizma, te neosjetljivosti na inzulin, a posljednje spoznaje govore u prilog složenoj etiopatogenezi određenoj istovremenim doprinosom više patofizioloških procesa (Armstrong 2013). Nove spoznaje također upućuju da periferni organi značajno doprinose održavanju složenih fizioloških procesa u mozgu što govori u prilog važnosti razumijevanja uloge perifernih organa u održavanju fizioloških procesa

središnjeg živčanog sustava u zdravlju i bolesti. Primjerice, patološka stanja koja za posljedicu imaju razvoj upale mogu utjecati na središnji živčani sustav prolaskom monocita ili lipofilnih upalnih posrednika (npr. prostaglandina) kroz krvno-moždanu barijeru (BBB - prema engl. *blood-brain barrier*), učinkom na vagus ili cirkumventrikularne organe koji nisu zaštićeni BBB-om, ili narušavanjem integriteta same BBB (Takeda, Sato, i Morishita 2014). Probavni sustav posebno je važan u regulaciji fizioloških i patofizioloških procesa povezanih s nastankom sAB. Jetra i crijeva značajan su izvor A $\beta$  (Bassendine i sur., bez dat.; Sun i sur. 2020), predstavljaju ključnu branu upalnim posrednicima i patološkim mikroorganizmima čime neposredno sudjeluju u regulaciji upale (Borsom, Lee, i Cope 2020; Giovannini i sur. 2021), te upravljaju apsorpcijom, preraspodjelom i metabolizmom hranjivih tvari.

### **Uloga jetre u patogenezi sporadične Alzheimerove bolesti**

U sAB je opisano smanjenje klirensa A $\beta$  iz središnjeg živčanog sustava. Otprilike 50% moždanog A $\beta$  dospije u krv i iz tijela ga odstranjuju manjim dijelom bubrezi, a većim jetra putem žuči (Roberts i sur. 2014). Smatra se da moždani A $\beta$  u krv može doći odstranjenjem putem glimfatičkog sustava ili aktivnim transportom preko krvno-moždane barijere posredovanim proteinom povezanim s receptorom za lipoprotein niske gustoće (LRP1 - prema engl. *low density lipoprotein receptor-related protein 1*, koji služi kao transmembranski receptor za endocitozu lipoproteina) i receptorom za lipoprotein niske gustoće (LPLR - prema engl. *lipoprotein lipase receptor*). Oba receptora posreduju i prijenos A $\beta$  u hepatocite, a topljiva forma LRP1 receptora glavni je transportni protein A $\beta$  u plazmi (Bassendine i sur., bez dat.). Polimorfizmi LRP1 gena povezani su s umjerenim nakupljanjem A $\beta$  u mozgu (Bassendine i sur., bez dat.). U jetri, LRP1 funkcionira zajedno s LPLR u čišćenju čestica koje sadrže Apolipoprotein E (ApoE) koje cirkuliraju u plazmi. Polimorfizmi ApoE alela glavni su genetski rizični čimbenik za razvoj sAB (Genin i sur. 2011) što se objašnjava smanjenim kapacitetom za uklanjanje A $\beta$ . Sukladno tomu, u homogenatima hepatocita oboljelih od AB *ex vivo* je pronađena smanjena razgradnja A $\beta$  (Maarouf i sur. 2018). Podaci iz epidemioloških studija neizravno podupiru ulogu jetre u razvoju sAB gdje su nealkoholni steatohepatitis, ciroza, te omjer aspartat aminotransferaze i alanin aminotransferaze prepoznati kao rizični čimbenici za razvoj i progresiju bolesti (Estrada i sur. 2019). Osim toga, jetra je ključni glukoregulatorni organ koji sudjeluje u razvoju i napredovanju inzulinske rezistencije i šećerne bolesti tipa 2 koji su prepoznati kao važni rizični čimbenici za razvoj sAB (Hsieh i Hsieh 2011).

### **Životinjski model sporadične Alzheimerove bolesti**

Životinjski modeli koji što vjernije oponašaju bolest u ljudi neophodni su za razjašnjenje etiopatogeneze bolesti i ključna su stepenica u translacijskim istraživanjima potencijalnih terapija. Najčešće korišteni model u istraživanju Alzheimerove bolesti su transgenični miševi s genetskom manipulacijom koja dovodi do pojačanog stvaranja A $\beta$  (Duyckaerts, Potier, i Delatour 2008). Iako genetska manipulacija metabolizma A $\beta$



daje vrijedan uvid u fiziološku funkciju  $A\beta$  i njegovu ulogu u nastanku familijarnog oblika bolesti, transgenični životinjski modeli nisu pogodni za proučavanje patoloških mehanizama povezanih s nastankom sAB. Jedan od najkorištenijih modela sAB štakorski je model dobiven primjenom streptozotocina (STZ) u lateralne moždane komore (STZ-icv, prema engl. *streptozotocin intracerebroventricular*) (Melita Salkovic-Petrisic i sur. 2013). STZ je betacitotoksična tvar koja perifernom primjenom visokih doza u glodavaca dovodi do deplecije  $\beta$ -stanica gušterače što se koristi za dobivanje eksperimentalnog modela dijabetesa tipa 1 (jednokratna visoka doza STZ) dok višekratne niže doze STZ oštećuju signalizaciju inzulinskog receptora u drugim perifernim tkivima (posebno mišićima) i dovode do dijabetesa tipa 2 (Szkudelski 2001). Primjena niske doze STZ u lateralne komore štakora dovodi do progresivnog oštećenja kognitivno-bihevioralnih funkcija. U STZ-icv modelu opisane su neuropatološke promjene u vidu izražene neuroupale (A. Knezovic i sur. 2017), kolinergičkog deficita, nakupljanja  $A\beta$  u hipokampusu, hipotalamusu i korteksu (Biasibetti i sur. 2017), hiperfosforilacija proteina tau te amiloidne angiopatije (Knezovic i sur. 2015). Navedene promjene i postepeni razvoj kognitivnog deficita u modelu slične su onima u ljudi oboljelih od sAB (M. Salkovic-Petrisic i Hoyer 2007). Opisane su promjene ekspresije proteina u signalnom putu inzulinskog receptora što se tumači kao stanje neosjetljivosti mozga na inzulin (IRBS - prema engl. *insulin-resistant brain state*) (Correia i sur. 2011) iako neki istraživači smatraju da definicija IRBS-a nije posve jasna (Grieb 2016).

## **Inkretini u neurodegenerativnim bolestima**

Inkretini su skupina metaboličkih hormona koji se primarno luče iz stanica probavnog sustava uslijed obroka te potiču izlučivanje inzulina iz gušterače i time sudjeluju u regulaciji metabolizma glukoze. U inkretine spadaju glukagonu sličan peptid-1 (GLP-1, prema engl. *glucagon-like peptide-1*) i o glukozu ovisan inzulintropni polipeptid (GIP - prema engl. *glucose-dependent insulinotropic polypeptide*). Ključna glukoregulatorna uloga inkretina prepoznata je te iskorištena za razvoj novih inkretinskih analoga (primjerice liraglutid - acilirani derivat fragmenta peptida-1 nalik GLP-1) i lijekova koji inhibiraju metabolizam inkretina (primjerice sitagliptin - kompetitivni antagonist enzima dipeptidil peptidaze-4 (DPP-4) koji razgrađuje GLP-1 i GIP), koji se danas koriste u terapiji šećerne bolesti tipa 2. U posljednje vrijeme intenzivno se istražuju neuroprotektivni učinci inkretina te lijekova koji djeluju na inkretinski sustav posebno u kontekstu neurodegenerativnih bolesti (Hölscher 2014). Iako mehanizmi koji posreduju neuroprotektivne učinke inkretina još nisu u potpunosti poznati, istraživanja pokazuju da bi modulacija IRBS-a, smanjenje oksidativnog stresa, učinak na homeostazu  $A\beta$ , te učinci na apoptozu, proliferaciju i diferencijaciju stanica i funkciju sinapsi mogli imati važnu ulogu (Hölscher 2014). Osim toga, uzevši u obzir inzulinsku rezistenciju i periferni metabolizam u nastanku sAB i drugih neurodegenerativnih bolesti, inkretini bi mogli ostvarivati neuroprotektivni učinak i očuvanjem periferne metaboličke homeostaze.

Preliminarni rezultati koji pokazuju da je inkretinski sustav narušen u STZ-icv modelu sAB su:

- i. dugotrajna primjena oralne galaktoze dovela je do poboljšanja kognitivne funkcije u štakorskom modelu sAB, što je bilo praćeno povećanjem endogenog GLP-1 (Knezovic i sur. 2018)
- ii. neosjetljivost crijeva na farmakološku modulaciju aktivnosti GLP-1 receptora u mozgu (Jan Homolak, Babić Perhoč, Knezovic, Osmanovic, i Salkovic-Petrisic 2021)
- iii. icv primjena inhibitora GIP receptora [Pro<sup>3</sup>]-GIP-a izaziva promjene crijeva vezane uz oksidativni stres, programiranu smrt stanica te integritet crijevne barijere koju su moderirane STZ-icv modelom (Jan Homolak, Babić Perhoč, Knezovic, Osmanovic, Koc, i sur. 2021)

S obzirom na ove spoznaje, cilj ovog istraživanja bio je istražiti patofiziološke promjene u jetri u štakorskom STZ-icv modelu sAB, te ispitati moderira li stanje izazvano primjenom STZ-icv učinak središnje primjene [Pro<sup>3</sup>]-GIP-a na jetru.

## Hipoteza

Akutni učinak intracerebroventrikularne primjene inhibitora GIP receptora mijenja oksidativne i metaboličke parametre jetre u štakorskom modelu sAB.

## Opći i specifični ciljevi rada

### Opći cilj

Ispitati izaziva li središnja primjena [Pro<sup>3</sup>]-GIP-a oksidativni stres i metaboličke promjene u jetri štakora te jesu li učinci očuvani u štakorskom modelu sAB.

### Specifični ciljevi

- 1) Ispitati akutni učinak [Pro<sup>3</sup>]-GIP-a na parametre oksidativnog stresa i metaboličkih signalnih puteva u jetri.
- 2) Ispitati akutni učinak [Pro<sup>3</sup>]-GIP-a na koncentraciju inzulina i GIP-a u plazmi.
- 3) Ispitati učinak intracerebroventrikularne primjene streptozotocina (model sAB) na parametre oksidativnog stresa i metaboličku signalizaciju u jetri.
- 4) Ispitati akutni učinak [Pro<sup>3</sup>]-GIP-a na parametre oksidativnog stresa i metaboličku signalizaciju u jetrištakorskog modela sAB.

## Materijali i metode

U pokusu su korišteni tri mjeseca stari mužjaci Wistar štakora (n = 40) uzgojeni na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Životinje su boravile po dvije ili tri u kavezu uz regulaciju perioda svjetla i tame u ciklusima od 12 sati (7 sati - 19 sati). Vlažnost štale održavana je između 40 i 70%, a temperatura u rasponu od 21° do 23 °C. Hrana i voda bili su dostupni *ad libitum*. Stelja je mijenjana dva puta tjedno.

### Eksperimentalni model sAB

Za uspostavu štakorskog modela sAB korištena je intracerebroventrikularna primjena streptozotocina (STZ-icv) prema standardnom postupku utemeljenom od strane mentorice i istraživačkog tima Laboratorija za molekularnu neurofarmakologiju (Melita Salkovic-Petrisic i sur. 2013). Životinje su bile nasumično raspoređene u kontrolnu (označavana s CTR) skupinu ili skupinu tretmana streptozotocinom (STZ). 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 µL) te je u obje lateralne komore aplicirana otopina 1,5 mg/kg streptozotocina otopljenog u 0,05 M citratnom puferu (pH 4,5) u volumenu od 2 µL po komori. Kontrolne životinje prošle su isti postupak kao i eksperimentalne, ali s primjenom otapala bez streptozotocina. Isti postupak ponovljen je nakon 48 sati te su životinje u STZ skupini ukupno primile 3 mg/kg streptozotocina.

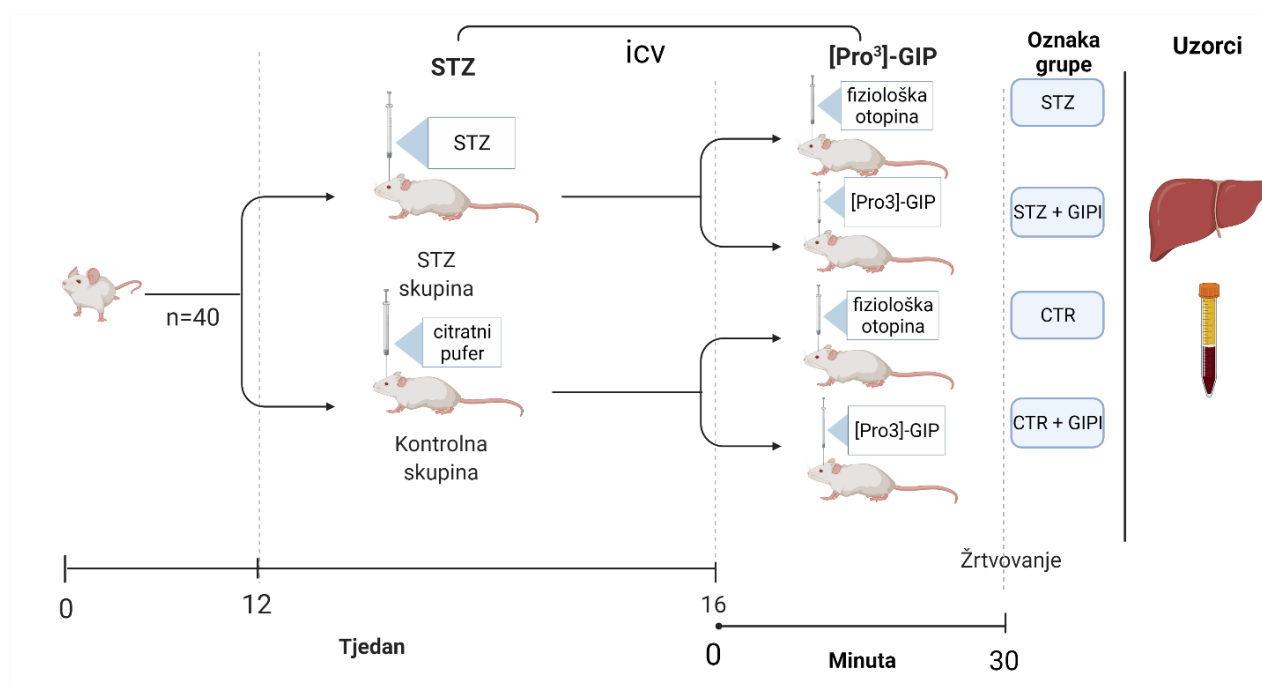
### Središnja inhibicija GIP receptora

Moždani GIP receptori farmakološki su inhibirani primjenom kompetitivnog antagonista [Pro<sup>3</sup>]-GIP-a. Mjesec dana nakon STZ-icv tretmana sve životinje iz kontrolne i eksperimentalne skupine nasumično su raspoređene u podskupine za jednokratnu bilateralnu intracerebroventrikularnu primjenu [Pro<sup>3</sup>]-GIP-a (85 µg/kg; 2 µL po komori) ili otapala (fiziološka otopina; 2 µL po komori).

### Žrtvovanje i pohrana tkiva

Za potrebe uzorkovanja tkiva za biokemijske analize, šest životinja iz svake skupine (preostale 4 životinje po skupini perfundirane su fiksativom za potrebe histoloških analiza koje nisu predmet ovog istraživanja) eutanazirano je i dekapitirano u općoj anesteziji pola sata nakon primjene [Pro<sup>3</sup>]-GIP-a ili otapala. Središnji jetreni režanj diseciran je, ispran u fosfatnom puferu (PBS - prema eng. *phosphate-buffered saline*). Tkivo je smrznuto u tekućem dušiku i pohranjeno na -80°C. Nakon odmrzavanja uzorci su ultrazvučno

homogenizirani na ledu u 500  $\mu$ L pufera za lizu (10 mM HEPES, 1mM EDTA, 100 mM KCl, 1% Triton X-100, mješavina inhibitora proteaza (Sigma-Aldrich, USA) i inhibitori fosfataza (PhosSTOP, Roche, Switzerland) (pH = 7.5)) u tri ciklusa. Homogenati su centrifugirani 10 minuta na 4°C i 13 000 okretaja u minuti. Dobiveni supernatant odvojen je i pohranjen na -20°C do daljnje analize. Uzorci plazme (n = 10 po skupini jer su prikupljeni iz svih životinja prije žrtvovanja) izdvojeni su iz pune krvi dobivene punktiranjem retro-orbitalnog sinusa, centrifugiranjem u hepariniziranim tubicama tijekom 10 minuta na 3600 okretaja u minuti na 4°C. U sve uzorke dodan je inhibitor dipeptidil peptidaze-4 u volumnom omjeru 1:100 kako bi se spriječila razgradnja GIP-a do daljnje analize.



**Slika 1. Plan izvođenja pokusa.** Na slici je prikazan vremenski slijed razdvajanja štakora u eksperimentalne skupine s pripadajućim tretmanom. U desnoj strani slike nalaze se oznake za grupe i slike uzetih uzoraka nakon žrtvovanja. **STZ** - streptozotocin; **icv** - intracerebroventrikularno **CTR** - kontrolna skupina; **[Pro<sup>3</sup>]-GIP** - inhibitor receptora o glukozni ovisnog inzulinotropnog polipeptida (GIP-a); **GIPI** - oznaka za skupinu koja je dobila GIP inhibitor.

## Mjerenje koncentracije proteina

Koncentraciju proteina u homogenatima jetre određena je metodom po Lowryju (Lowry i sur. 1951). 10  $\mu$ L homogenata pomiješano je s 2 mL reagensa bakrova sulfata (49 mL otopine 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> u 0,1 M NaOH i 1 mL otopine dobivene miješanjem 500  $\mu$ L 1% CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O i 500  $\mu$ L 2% NaK tartarata). Nakon 10 minuta dodano je 0,2 mL folin reagens (H<sub>2</sub>O i Folin-Ciocalteu, 2:1) i ostavljeno na sobnoj temperaturi 30 minuta. Apsorbancija plavog kolorimetrijskog produkta izmjerena je pri valnoj duljini od 750 nm na spektrofotometru

(Iskra HPV 220, Slovenija). Koncentracija proteina izračunata je iz standardne krivulje otopine albumina goveđeg seruma. Kao slijepa proba korištena je 0,1 M klorovodična kiselina (10 µL).

### **Lipidna peroksidacija**

Lipidna peroksidacija procijenjena je mjerenjem koncentracije tvari koje reagiraju s tiobarbiturnom kiselinom (TBARS - prema eng. *thiobarbituric acid reactive substances*) čime se mjeri koncentracija malondialdehida (MDA) i drugih reaktivnih aldehida koji nastaju peroksidacijom polinezasićenih masnih kiselina (Prabhakar isur. 2012). TBARS esej zasniva se na reakciji tiobarbiturne kiseline (TBA - prema eng. *thiobarbituric acid*) i MDA čiji adukt apsorbira vidljivu svjetlost na 540 nm. Supernatanti tkivnih homogenata (12 µL) pomiješani su sa 120 µL TBA-TCA (trikloctena kiselina) reagensa i 70 µL ddH<sub>2</sub>O. TBA-TCA reagens sastoji se od 0,375% TBA otopljene u 15% trikloroctenoj kiselini. Pripremljeni uzorci premješteni su u perforirane epruvete volumena 1,5 mL te inkubirani 20 minuta na 95 °C u bloku za grijanje. TBA-MDA adukt izdvojen je u 220 µL n-butanola. Apsorbancija otopljene frakcije adukta u butanolu izmjerena je na 540 nm u čitaču mikropločica Infinite F200 PRO (Tecan, Švicarska). Koncentracija adukta procijenjena je na temelju molarnog ekstinkcijskog koeficijenta od  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  te puta svjetlosti od 0,5 cm.

### **Aktivnost superoksid dismutaze**

Enzim superoksid dismutaza (SOD) katalizira dismutaciju superoksida ( $\text{O}_2^-$ ) u vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) čime štiti stanicu od oštećenja reaktivnim slobodnim radikalima. Aktivnost SOD izmjerena je indirektno analizom autooksidacije pirogalola u prisutnosti homogenata jetre (Li 2012). Pirogalolol je benezentriol (1,2,3-trihidroksibenzen) s izraženim svojstvom autooksidacije posredovane superoksidnim radikalima u neutralnom puferu što je moguće spriječiti dodavanjem SOD-a. U reagens (15 µL 60 mM pirogalola otopljenog u 1 mM HCl s 1000 µL TRIS-HCl i 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA (pH = 8.2)) dodano je 10 µL homogenata jetre, te je promjena apsorbancije na 325 nm zabilježena tijekom 150 s. Za procjenu maksimalne autooksidacije pirogalola istim protokolom snimljena je apsorbancija jednakog volumena reagensa bez uzorka. Aktivnost SOD izražena je omjerom apsorbancije pirogalola s uzorkom i bez njega, što označava postotak inhibicije autooksidacije.

### **Niskomolekularni tioli i sulfhidrilne skupine proteina**

Mjerenje koncentracije niskomolekularnih tiola (LMWT - prema eng. *low-molecular weight thiols*) i koncentracija sulfhidrilnih skupina (SH) proteina zasniva se na reakciji 5'-ditio-bis(2-nitrobenzojeve kiseline) (DTNB) sa slobodnim tiolnim skupinama uz nastajanje 5-tio-2-nitrobenzojeva kiselina (TNB) koja se detektira spektrofotometrijski na 405 nm (Van der Plancken, Van Loey, i Hendrickx 2005). Uzeto je 25 µL homogenata jetre i inkubirano s 25 µL 4 % sulfosalicilne kiseline na ledu tijekom sat vremena. Uzorci su centrifugirani

10 minuta na 10 000 okretaja u minuti na 4 °C. Dobiveni supernatant odvojen je u zasebne epruvete za određivanje LMWT. Zaostali talog korišten je za mjerenje slobodnih SH u proteinskoj frakciji. U obje epruvete dodano je 35 µL DTNB-a (4 mg/mL u 5% natrijevom citratu). Nakon 10 minuta reakcije izmjerena je apsorbancija pomoću čitača mikropločica Infinite F200 PRO (Tecan, Švicarska). Za izračun koncentracije SH i LMWT korišten je molarni ekstinkcijski koeficijent od  $14\ 150\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Izmjerene vrijednosti korigirane su dijeljenjem s ukupnom koncentracijom proteina u uzorku.

### **Nitrocelulozna redoks permanganometrija**

Nitrocelulozna redoks permanganometrija (NRP) korištena je za određivanje ukupnog reduktivnog kapaciteta jetrenog tkiva (Homolak i sur. 2020). Na nitroceluloznu membranu nanoseno je 1 µL uzorka i ostavljeno da se osuši na sobnoj temperaturi. Suha membrana uronjena je u otopinu NRP reagensa dobivenog otapanjem 0,3 mg  $\text{KMnO}_4$  u 30 mL  $\text{ddH}_2\text{O}$ . Nakon 30 sekundi membrana je isprana u  $\text{dH}_2\text{O}$  čime je prekinuta redukcija kalijeva permanganata ( $\text{KMnO}_4$ ) u manganov dioksid ( $\text{MnO}_2$ ). Precipitirani  $\text{MnO}_2$  izmjereno je digitalizacijom slike uredskim skenerom (SP 4410SF, RICOH, USA) i računanjem integrirane gustoće signala u programu FIJI (NIH, USA). Dobivene vrijednosti denzitometrije korigirane su dijeljenjem s vrijednostima koncentracije ukupnih proteina u uzorku.

### **Ukupni oksidacijsko-redukcijski potencijal**

Ukupni oksidacijsko-redukcijski potencijal (ORP) jetrenih homogenata izmjereno je pomoću 6230N mikroprocesorskog mjerača (Jenco Instruments, San Diego, USA) i mikrosenzora ORP-146S (Shelf Scientific, Lazar Research Laboratories, USA) koji se sastoji od platinaste elektrode spregnute s referentnom Ag/AgCl elektrodom u KCl-u (Cao i sur. 2016). 5 µL homogenata jetre inkubirano je u 5 µL stabilizacijske otopine za elektrodu (0,1 M  $\text{I}_2$  i 0,4 M KI) na sobnoj temperaturi u mraku tijekom sat vremena. U svaki je uzorak dodano 40 µL  $\text{ddH}_2\text{O}$  kako bi se postigao zadovoljavajući mjerni volumen. Srednja vrijednost ORP pojedinog uzorka dobivena je naizmjeničnim uranjanjem platinaste elektrode u epruvete s uzorcima nasumičnim redoslijedom. Mjerni raspon sustava nalazio se od -1500 do + 1500 mV, a preciznost sustava bila je  $\pm 0.5$  mV.

### **Elektroforeza proteina i western blot**

Relativna ekspresija pojedinih proteina od interesa u uzorcima jetre izmjerena je pomoću razdvajanja proteina natrij dodecil sulfat poliakrilamid gel elektroforezom (SDS-PAGE) te analizom na nitroceluloznu membranu prenesenih proteina pomoću western blot metode. Odabrani proteini s pripadajućim primarnim protutijelima navedeni su u tablici.

**Tablica 1. Odabrani proteini i primarna protutijela korištena u western blot metodi.**

Protein	Primarno protutijelo	Proizvođač
Beta podjedinica inzulinskog receptora (IR - prema engl. <i>insulin receptor</i> )	Anti-Insulin Receptor mouse Antibody, beta subunit	Merck Millipore (SAD)
Fosforilirani supstrat inzulinskog receptora 1 (pIRS 1 – <i>phosphorylated insulin receptor substrate</i> ) na poziciji 307	Phospho-IRS-1 (Ser307) Rabbit Antibody	Cell Signalling (SAD)
Enzim koji razgrađuje inzulin (IDE - prema engl. <i>insulin degrading enzyme</i> )	IDE Mouse Monoclonal Antibody	Cell Signalling (SAD)
Fosforilirana o adenozin mono fosfatom aktivirana protein kinaza (pAMPK - prema engl. <i>phosphorylated AMP-activated protein kinase</i> )	Phospho-AMPK $\alpha$ (Thr172) Rabbit mAb	Cell Signalling (SAD)
Četvrta podjedinica citokrom c oksidaze (COXIV- prema engl. <i>Cytocrome C oxidase subunit IV</i> )	COX IV Antibody #4844	Cell Signalling (SAD)
Kaspaza 3	Cleaved Caspase-3 (Asp175) (5A1E) Rabbit mAb	Cell Signalling (SAD)
Citokrom C	Cytochrome C (D18C7) Rabbit mAb	Cell Signalling (SAD)

Homogenati tkiva pomiješani su s jednakim volumenom pufera za nanošenje na gel (prema engl. *sample buffer* ([2 mL glicerola; 6 mL 10% SDS; 2,5 mL 1 M Tris (pH 6,7); 3 mg bromfenol plavila] i 20%  $\beta$ -merkaptioetanol)). Uzorci za analizu kaspaze 3 i na fosforilirane 5'adenozin monofosfat aktivirana protein kinaza grijani su na 95°C tijekom 10 minuta. Na TGX Stain-Free FastCast 12% poliakrilamidni gel za elektroforezu (Bio-Rad, USA) priređen po uputama proizvođača nanoseno je 30  $\mu$ g proteina svakog uzorka u volumenu izračunatom na temelju prethodno izmjerenih koncentracija proteina po Lowryju. Elektroforeza je trajala između 45 i 60 minuta uz napon od 140 V. Gelovi s razdvojenim proteinima aktivirani su i uslikani pomoću uređaja ChemiDoc MP Imaging System UV transilluminator (Bio-Rad, USA). Analiza UV prosvijetljenih gelova korištena je za daljnje postupke korekcije signala dobivenih western blotom. Razdvojeni proteini preneseni su na nitroceluloznu membranu postupkom polusuhog prijenosa. Nitrocelulozna membrana pažljivo je naslonjena na gel položen na celulozne filtere natopljene puferom za prijenos proteina te je pokrivena drugim setom istih filtera i fiksirana u sustav za polusuh prijenos



Trans-Blot Turbo (Bio-Rad, USA). Korišten je protokol u trajanju od 7 minuta uz napon od 25 V i jakost struje 2 - 2,5 mA. Membrana je isprana u otopini 1% Ponceau S u 4% octenoj kiselini tijekom 1 minute s ciljem kontrole prijenosa proteina i inhibicije ostatne aktivnosti peroksidaza koja može utjecati na intenzitet signala. Membrane su isprane u puferu za ispiranje s niskom koncentracijom soli (LSWB - prema eng. *low-salt washing buffer*, (pH 7,5; 12,11g Trisa i 8,766 g NaCl u 1 L H<sub>2</sub>O) tijekom 5 minuta te inkubirane u puferu za blokiranje (1 g nemasnog mlijeka u prahu; 20 mL LSBW; 100 µL Tween 20) preko noći. Nakon tri serije ispiranja po pet minuta u LSBW-u membrana je inkubirana s primarnim protutijelom. Kod svih membrana primarno protutijelo razrijeđeno je u puferu za blokiranje u volumnom omjeru 1:500, a membrane su inkubirane u otopini primarnog protutijela tijekom 24 h na 4°C. Sekundarno protutijelo pripremljeno je u istom puferu u volumnom omjeru 1:1000, a inkubacija je provedena tijekom 1 h na sobnoj temperaturi. Tijekom inkubacije i slikanja, membrana se nalazila između dvije polivinil-klorid (PVC) folije kako bi se osigurala ravnomjerna raspodjela protutijela. Isprane membrane inkubirane su u kemiluminiscentnom reagensu SuperSignal™ West Pico/Femto po uputama proizvođača (Thermo-Fisher Scientific, USA) i snimljene MicroChemiDoc kamerom (DNR BioImaging Systems Ltd., Israel). Snimke membrana i ukupnih proteina analizirane su u programu FIJI (NIH, USA) korištenjem *Gel Analyzer* protokola (Miller 2010). Rezultat denzitometrije izražen je kao omjer relativne integrirane gustoće pojedinog proteina i koncentracije ukupnih proteina u pojedinom uzorku.

### **Koncentracija inzulina, GIP-a i aktivnog fragmenta GIP-a u plazmi**

Koncentracija inzulina u plazmi izmjerena je pomoću komercijalnog imunoenzimskog testa (Merck, USA) sendvič metodom po uputama proizvođača. U jažice prekrivene mišjim monoklonskim protutijelima specifičnim za štakorski inzulin nanoseno je 10 µL plazme. Nakon vezanja inzulina na adsorbirana monoklonska protutijela, ostatak plazme ispran je puferom za ispiranje, a adsorbirani inzulin inkubiran je u otopini poliklonalnih protutijela na štakorski inzulin. Nakon ponovnog ispiranja u jažice je nanosena otopina sekundarnih protutijela spregnutih s peroksidazom iz hrena (HRP - prema eng. *horseradish peroxidase*). Koncentracija inzulina procijenjena je na temelju kvantifikacije kolorimetrijskog produkta koji nastaje reakcijom 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina s HRP-om. Apsorbancija na 450 nm te 590 nm (za korekciju) izmjerena je na čitaču mikropločica (Tecan, Švicarska). Koncentracija ukupnog i aktivnog GIP-a izmjerena je komercijalnim imunoenzimskim testovima (Merck, USA) koji se zasnivaju na istom principu.

### **Koncentracija glukoze u plazmi**

Glukoza je izmjerena u 10 µL uzorka plazme standardnom kolorimetrijskom Trinder metodom koristeći glukozu oksidazu i 4-amino-antipirin u komercijalnom kompletu (Greiner Diagnostic, Njemačka). Apsorbancija je očitana na čitaču mikropločica Infinite F200 PRO (Tecan, Švicarska) na 570 nm.

## Statistička analiza

Sve izmjerene vrijednosti (zavisne varijable) analizirane su svaka u zasebnom generalnom linearnom modelu sa skupinom kao nezavisnom kategorijskom varijablom s četiri razine (četiri skupine): i) intracerebroventrikularna (icv) primjena citratnog pufera + icv primjena fiziološke otopine (označeno kao kontrola, CTR); (ii) icv primjena STZ + icv primjena fiziološke otopine (označeno kao STZ); (iii) icv primjena citratnog pufera + icv primjena [Pro<sup>3</sup>]-GIP-a (označeno kao CTR + GIPI); (iv) icv primjena STZ + icv primjena [Pro<sup>3</sup>]-GIP-a (označeno kao STZ + GIPI). Rezultat analize su razlike srednjih vrijednosti zavisnih varijabli između neke dvije skupine („kontrast“) podešene za vrijednosti u ostalim skupinama (tzv. razlike srednjih vrijednosti procijenjene metodom najmanjih kvadrata). Analizom se željelo odgovoriti na sljedeća pitanja:

1. Ima li icv primijenjeni STZ učinka (tj. razlikuju se životinje sa sAB od zdravih životinja)? Odgovor se temelji na razlici izmjerenih vrijednosti u skupini CTR i skupini STZ (označeno kao CTR – STZ); 2. Ima li icv primijenjeni [Pro<sup>3</sup>]-GIP učinka u zdravih životinja? Odgovor se temelji na razlici izmjerenih vrijednosti u skupini CTR i skupini CTR + GIPI (označeno kao CTR – CTR+GIPI); 3. Ima li icv primijenjeni [Pro<sup>3</sup>]-GIP učinak u životinja predtretiranih streptozotocinom, tj. životinja sa sAB? Odgovor se temelji na razlici izmjerenih vrijednosti u skupini STZ+GIPI i skupini STZ (razlika STZ+GIPI – STZ); 4. Razlikuju li se učinci [Pro<sup>3</sup>]-GIP-a u zdravih životinja i u životinja s sAB? To se pitanje može izreći i kao je li STZ (tj. sAB) moderator učinka [Pro<sup>3</sup>]-GIP-a? Odgovor se temelji na razlici dviju razlika: (CTR – CTR+GIPI) – (STZ+GIPI – STZ). Formalni test ove razlike je test interakcije (što se može izreći i kao test međudjelovanja STZ [sAB] i [Pro<sup>3</sup>]-GIP-a). Rezultati analize prikazani su kao razlike (podešenih) srednjih vrijednosti uz pripadajuće p-vrijednosti. Za test interakcije nije prikazana razlika između razlika, već samo p-vrijednost pripadajuća testu interakcije između STZ i [Pro<sup>3</sup>]-GIP-a. Interakcija nije testirana za sve mjerene pokazatelje, već za one za koje je vizualna inspekcija kutijastih dijagrama naznačila moguću razliku učinaka [Pro<sup>3</sup>]-GIP-a u kontrolnih životinja i životinja sa sAB. Razina greške tipa 1 u svim testovima iznosila je 0,05, a u svakom je modelu učinjena korekcija Sidak metodom za broj testova. Statistička analiza podataka rađena je u programskom jeziku R (verzija 4.0.5)

## Etička dopusnica istraživanja

Pokusi su provedeni u sklopu istraživanja na projektu Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ IP-2018-01-8938) za koji je dobivena etička dopusnica Ministarstva poljoprivrede i Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (04-1343-2006). *In vivo* postupke na životinjama (icv primjena STZ i GIP inhibitora, žrtvovanje i uzorkovanje) provodili su istraživači na HRZZ projektu zaposleni u Laboratoriju za molekularnu neurofarmakologiju na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu koji posjeduju etičke dopusnice za rad s laboratorijskim životinjama. Svi *in vivo* postupci na životinjama provedeni su sukladno smjernicama Zakona o zaštiti životinja (NN 102/17) i Pravilnika o zaštiti životinja koja se koriste u znanstvene svrhe (NN32/19).

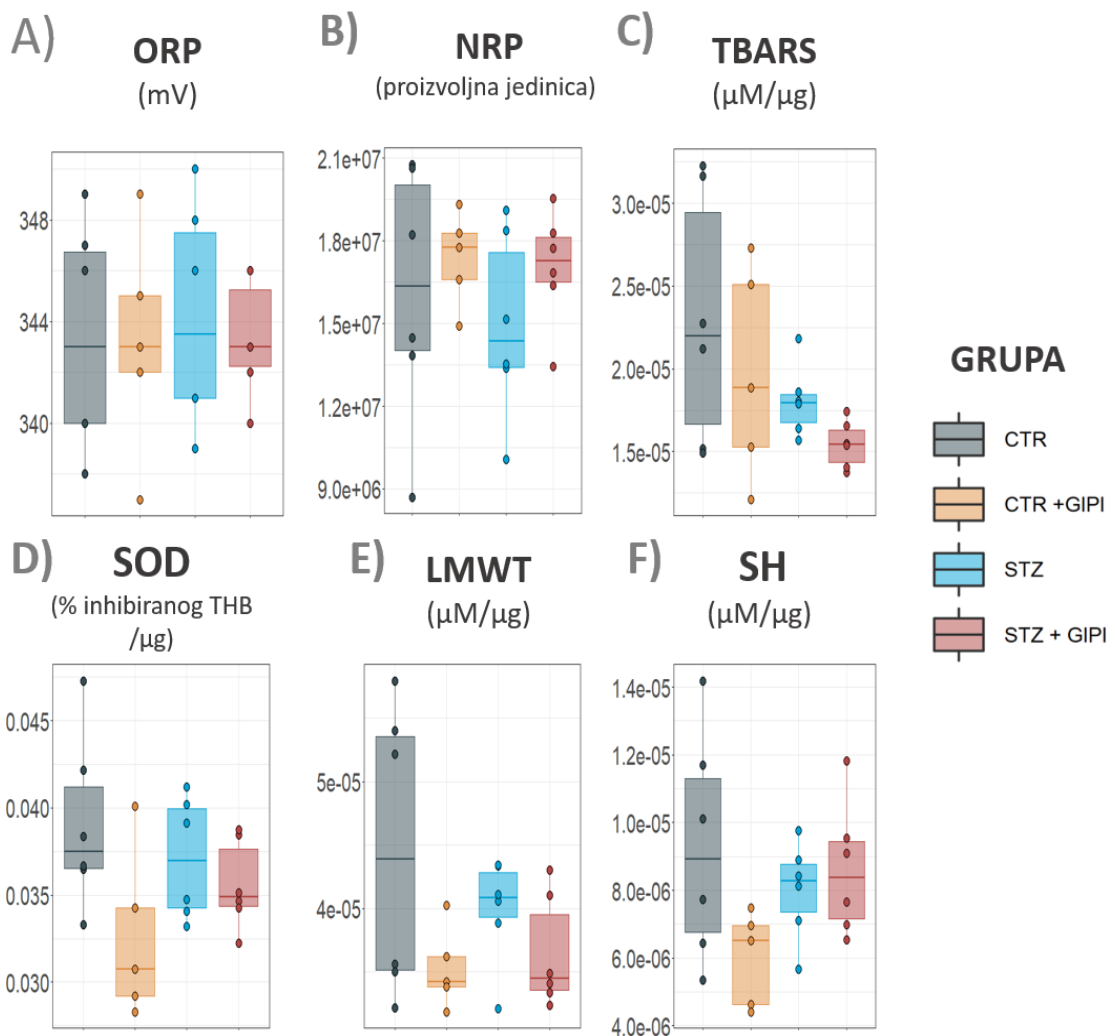
## Rezultati

### Promjene parametara oksidativnog stresa u jetri

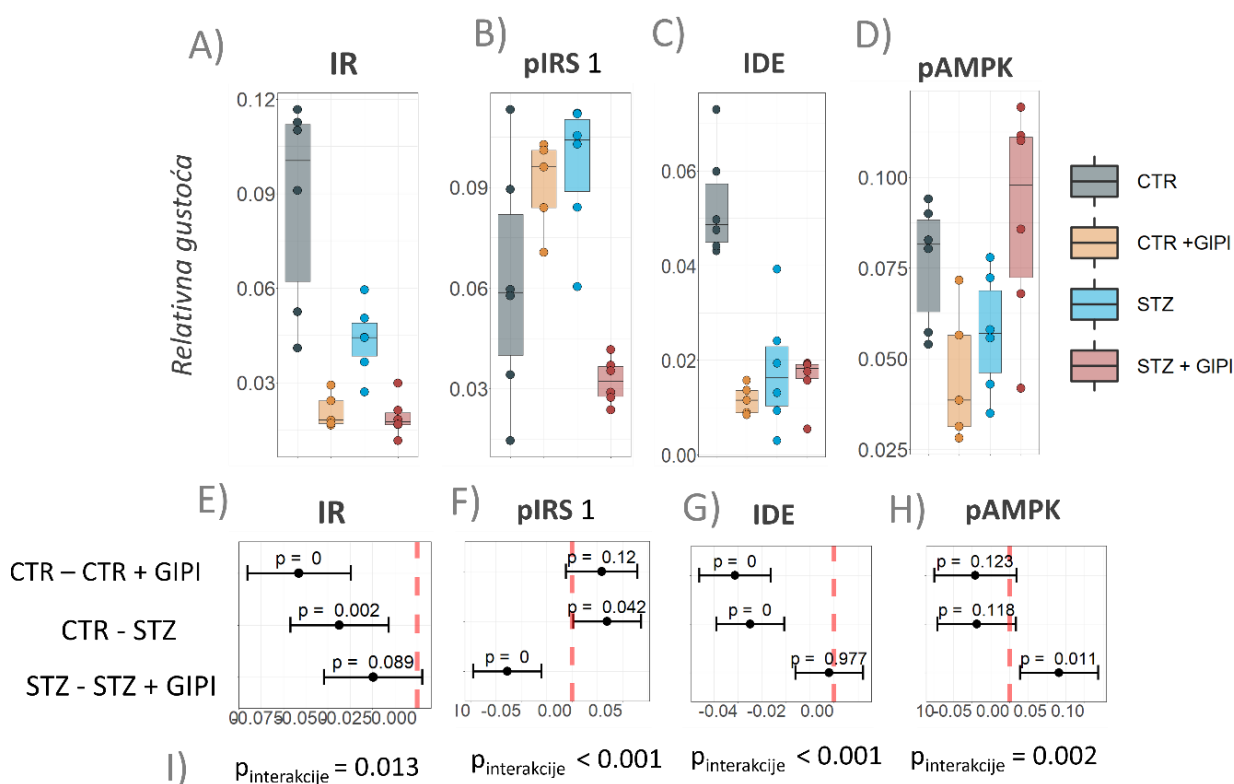
Oksidativni stres u jetrenom tkivu štakora ispitan je pomoću više komplementarnih metoda kako bi se dobio pouzdani uvid u tkivnu redoks homeostazu (Slika 2). Rezultati analize ORP i NRP odražavaju ukupni reduktivni (antioksidativni) kapacitet tkiva te nisu uočene promjene redoks homeostaze niti u jednoj skupini životinja u usporedbi s kontrolom (Slika 2 A, B). Koncentracija MDA (označno kao TBARS) također se nije značajno promijenila uslijed tretmana STZ-om niti [Pro<sup>3</sup>]-GIP-om (Slika 2.C). Vizualnim prikazom raspodjele izmjerenih vrijednosti LMWT, SH i SOD (Slika 2 D, E, F) uočen je trend smanjenja u skupini kontrolnih životinja tretiranih [Pro<sup>3</sup>]-GIP-om (CTR+GIPI) u odnosu na kontrolnu skupinu treniranu fiziološkom otopinom (CTR) koji zbog malog broja životinja i velike varijance nije statistički značajan ( $p > 0.05$ ) (nije prikazano).

### Promjene inzulinske signalizacije u jetri

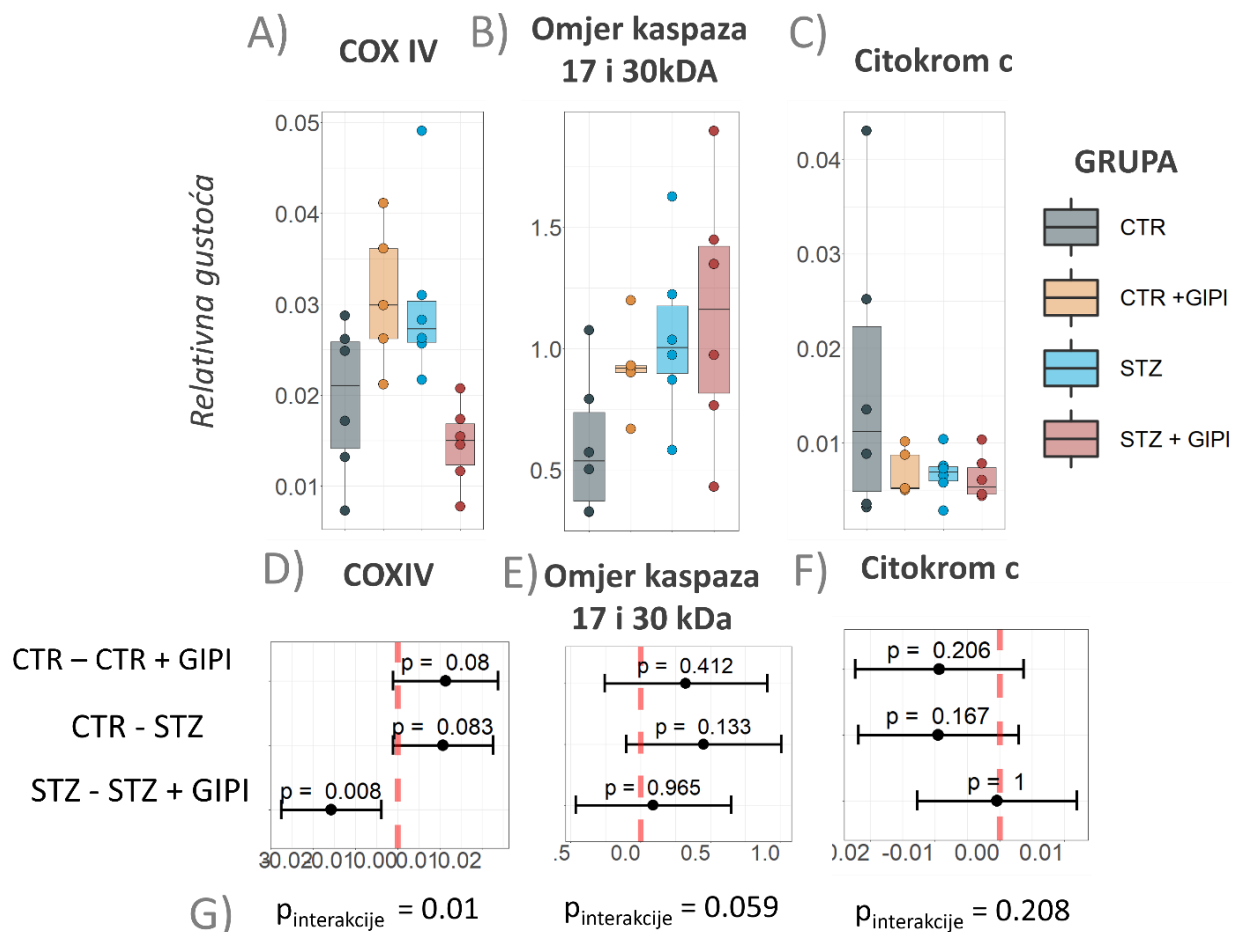
Podaci o relativnoj ekspresiji proteina dobiveni denzitometrijskom analizom western blotova prikazani su na slici 3. Proteini koji sudjeluju u inzulinskoj signalizaciji (IR i pIRS 1) i razgradnji IDE značajno se razlikuju među grupama (Slika 3. A, B, C). Skupine štakora u tretmanu STZ-icv kao i akutnom tretmanu [Pro<sup>3</sup>]-GIP-om imaju smanjenu ekspresiju IR ( $p < 0,001$ ; Slika 3.A) i IDE ( $p < 0,001$ ; Slika 3.C) u odnosu na kontrolnu skupinu. Ekspresija pIRS 1 pokazuje suprotan trend (Slika 3.B), zbog velikog rasapa vrijednosti u kontrolnoj skupini statistički nije značajan ( $p > 0,05$ ; Slika 3. G). Ekspresija pAMPK (Slika 3.D) nije se značajno promijenila u akutnom tretmanu [Pro<sup>3</sup>]-GIP-om ( $p = 0,123$ ; Slika 3.H) kao ni u STZ-icv tretmanu ( $p = 0,118$ ; Slika 3.H). Predtretman streptozotocinom značajno moderira ( $p$  interakcije  $< 0,05$ ) učinak akutnog tretmana [Pro<sup>3</sup>]-GIP-om na ekspresiju svih mjerenih proteina inzulinskog signalnog puta. Kod ekspresije IR i IDE moderacija je kvantitativna, a kod pIRS 1 i pAMPK kvalitativna.



**Slika 2. Pokazatelji oksidativnog stresa u jetri nakon akutne intracerebroventrikularne primjene  $[\text{Pro}^3]\text{-GIP-a}$  u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti.** Izmjerene vrijednosti šest različitih parametara (A - F) prikazane su kutijastim i raspršenim grafikonom (svaka točka predstavlja jednu životinju). N = 6 životinja po skupini uz izuzetak CTR + GIPI = 5. N = 6 životinja po skupini uz izuzetak CTR + GIPI = 5; **ORP** - oksidacijsko-redukcijski potencijal; **NRP** - nitrocelulozna redoks permanganometrija; **TBARS** - tvari koje reagiraju s tiobarbiturnom kiselinom; **SOD** - superoksid dismutaza (y os  $\times 10^3$ ); **THB** - 1,2,3-trihidroksibenzen; **LMWT** - nisko molekularni tioli; **SH** - tiolne skupine proteina; **CTR** - kontrolna skupina; **STZ** - skupina sa streptozotocinom; **GIPI** - oznaka za inhibitor o glukozi ovisnog inzulintropnog peptida (GIP-a)



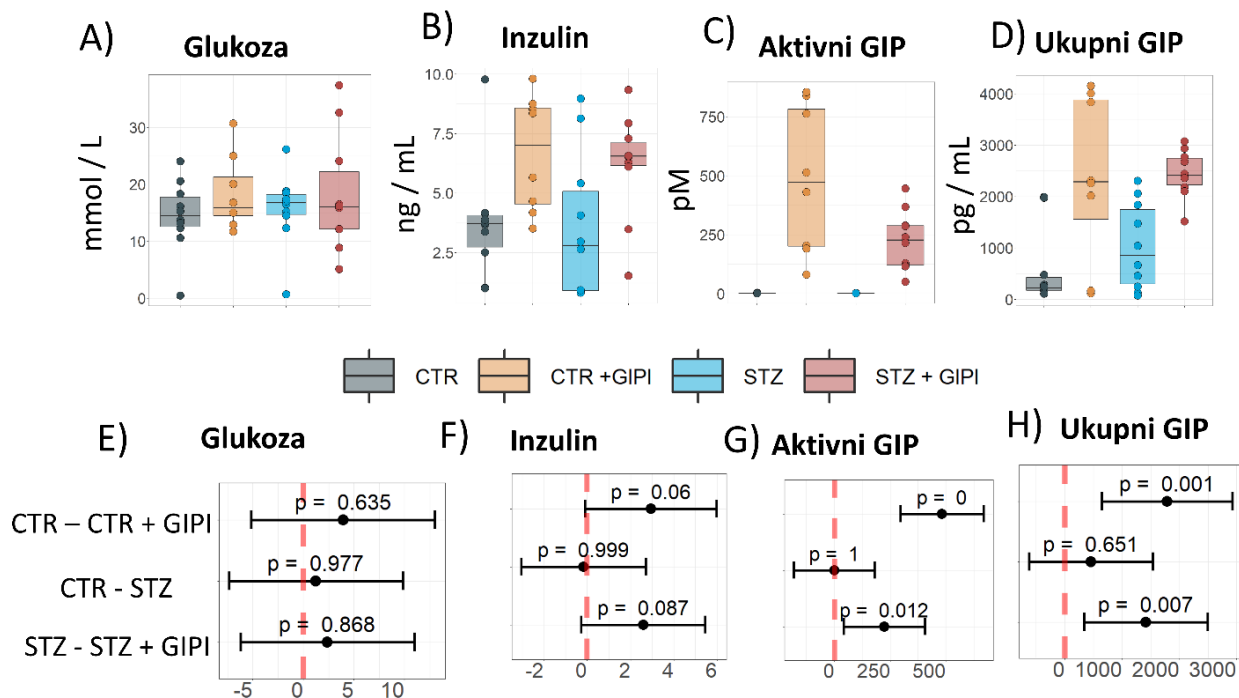
**Slika 3. Učinak središnje primjene [Pro<sup>3</sup>]-GIP- a na ekspresiju jetrenih proteina povezanih s regulacijom inzulinske signalizacije štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti.** Vrijednosti denzitometrije western blota prikazane su kombinacijom raspršenog (svaka točka predstavlja jednu životinju) i kutijastog grafikona po grupama (A-D). Ispod kutijastih grafikona nalaze se grafikoni učinka (prema eng. *effect plot*) za pojedini protein (E-H). Grafikon učinka prikazuje učinak streptozotocina (CTR – STZ) i [Pro<sup>3</sup>]-GIP-a (CTR – CTR + GIPI) na ekspresiju pojedinog proteina. Učinak je izračunat kao razlika srednjih vrijednosti između grupa podešena za vrijednosti drugih grupa, a grafički je prikazan kao točka (eng. *point estimate*) s 95% intervalom pouzdanosti (CI - prema eng. *confidence interval*). Isprekidana vertikalna crvena linija označava nepostojanje razlike između skupina. Ako interval pouzdanosti ne siječe crvenu liniju učinak tretmana smatra se značajnim. Iznad intervala pouzdanosti prikazana je p vrijednost učinka. Ispod grafikona učinka nalazi se p vrijednost interakcije tretmana STZ i [Pro<sup>3</sup>]-GIP-om (I). N = 6 životinja po skupini uz izuzetak CTR + GIPI = 5. **IR** – inzulinski receptor; **pIRS 1** – fosforilirani supstrat inzulinskog receptora 1; **IDE** – enzim koji razgrađuje inzulini; **pAMPK** – fosforilirana AMP-om aktivirana kinaza; **CTR** – kontrolna skupina; **STZ** – skupina tretirana streptozotocinom; **GIPI** – inhibitor receptora o glukozu ovisnog inzulintropnog peptida (GIP-a)



**Slika 4. Učinak središnje primjene [Pro<sup>3</sup>]-GIP- a na ekspresiju jetrenih proteina povezanih s apoptozom i funkcijom mitohondrija u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti.**

Vrijednosti denzitometrije western blota prikazane su kombinacijom raspršenog (svaka točka predstavlja jednu životinju) i kutijastog grafikona po grupama (**A-C**). Ispod kutijastih grafikona nalaze se grafikonu učinka (prema eng. *effect plot*) za pojedini protein (**D-F**). Grafikon učinka prikazuje učinak streptozotocina (CTR – STZ) i [Pro<sup>3</sup>]-GIP-a (CTR – CTR+GIPI) na ekspresiju pojedinog proteina. Učinak je izračunat kao razlikasrednjih vrijednosti između grupa podešena za vrijednosti drugih grupa, a grafički je prikazan kao točka (eng. *point estimate*) s 95% intervalom pouzdanosti (CI - prema eng. *confidence interval*).

Isprekidana vertikalna crvena linija označava nepostojanje razlike između skupina. Ako interval pouzdanosti ne siječe crvenu liniju učinak tretmana smatra se značajnim. Iznad intervala pouzdanosti prikazana je p vrijednost učinka. Ispod grafikona učinka nalazi se p vrijednost interakcije između [Pro<sup>3</sup>]-GIP-a i predtretmana STZ-om (**G**). N = 6 životinja po skupini uz izuzetak CTR + GIPI = 5; **COX IV** – četvrta podjedinica citokrom c oksidaze **CTR** – kontrolna skupina; **STZ** – skupina tretirana streptozotocinom; **GIPI** – inhibitor receptora oglukozi ovisnog inzulotropnog peptida (GIP-a).



**Slika 5. Koncentracije glukoze, inzulina, aktivnog i ukupnog GIP-a u plazmi kontrolnih i STZ- icv štakora 30 minuta nakon icv primjene [Pro<sup>3</sup>]-GIP-a.** Vrijednosti koncentracije prikazane su kombinacijom raspršenog (svaka točka predstavlja jednu životinju) i kutijastog grafikona (**A-D**). Ispod kutijastih grafikona nalaze se grafikoni učinka (eng. *effect plot*) za pojedini protein (**E-H**). Grafikon učinka prikazuje učinak streptozotocina (CTR - STZ) i [Pro<sup>3</sup>]-GIP-a (CTR - CTR + GIPI) na ekspresiju pojedinog proteina. Učinak je izračunat kao razlika srednjih vrijednosti između grupa podešena za vrijednosti drugih grupa, a grafički je prikazan kao točka (eng. *point estimate*) s 95% intervalom pouzdanosti (CI - prema eng. *confidence interval*). Isprekidana vertikalna crvena linija označava nepostojanje razlike između skupina. Ako interval pouzdanosti ne siječe crvenu liniju učinak tretmana smatra se značajnim. Iznad intervala pouzdanosti prikazana je p vrijednost učinka. N = 10 životinja po skupini. **CTR** - kontrolna skupina; **STZ** - skupina tretirana streptozotocinom; **GIP** - o glukozi ovisan inzulinotropni peptid; **GIPI** - skupina tretirana GIP inhibitorom ([Pro<sup>3</sup>]-GIP-om); **icv** - intracerebroventrikularno

### **Ekspresija proteina koji sudjeluju u regulaciji metabolizma**

Za uvid u promjene jetrenog metabolizma izmjerena je aktivacijska fosforilacija AMPK (Slika 3. D). Tretmani od istraživačkog interesa (STZ i [Pro3]-GIP) nisu uzrokovali značajnu promjenu ( $p > 0.05$ ) ekspresije u odnosu na kontrolu. Pretretman STZ doveo je do značajne kvalitativne moderacije učinka GIP inhibitora ( $p = 0.002$ ). Mjerena je četvrta podjedinica citokrom c oksidaze (COXIV), mitohondrijskog enzima koji je dio respiracijskog lanca (Slika 4. A). U grupama životinja tretiranih STZ-icv i [Pro3]-GIP-om uočen je trend povećanja ekspresije u odnosu na kontrolu koji nije statistički značajan ( $p = 0.052$ ). Međutim predtretman STZ značajno moderira učinak [Pro3]-GIP-om što je vidljivo u različitom smjeru pomaka ekspresije kod STZ-icv životinjama tretiranih [Pro3]-GIP-om u odnosu na kontrolne životinje tretirane [Pro3]-GIP-om ( $p = 0.01$ ).

### **Ekspresija proteina programirane stanične smrti**

Ekspresija citokroma c i kaspaze-3 (Slika 4. B, C) analizirana je kako bi se dobio uvid u proteine koji sudjeluju u procesu apoptoze. Aktivacija kaspaze-3 (Slika 4. B) prikazana je kao omjer ekspresije aktivne kaspaze od 17 kDa i pro-kaspaze od 30 kDa. U oba proteina ne nalaze se značajne razlike među grupama ( $p > 0.05$ ).

### **Koncentracija glukoze, inzulina, aktivnog i ukupnog GIP-a u plazmi**

Koncentracija glukoze u plazmi ne razlikuje se među grupama (Slika 5. A). Koncentracije inzulina, aktivnog i ukupnog GIP-a pokazuju isti obrazac. Eksperimentalne grupe kojima je administriran [Pro3]-GIP (CTR+GIPI i STZ+GIPI) imaju statistički značajan porast inzulina, aktivnog i slobodnog GIP-a u plazmi (Slika 5. B, C, D). Istovremeno ne nalaze se značajne razlike u navedenim parametrima između kontrolnih i STZ-icv štakora.



## Rasprava

Relativno je malo poznato o učinku STZ-icv na periferne organe. U prvim radovima na štakorskom STZ-icv modelu sAB mogući periferni učinci odbačeni su na temelju nepromijenjenih vrijednosti glukoze u plazmi i acidobaznih parametara (Duelli i sur. 1994; Nitsch i sur. 1991). Iako nepostojanje izraženih promjena glukoregulacije i acido-baznog statusa jasno pokazuje da postoji značajna razlika između učinaka parenteralne primjene (primjerice intraperitonealno) te središnje primjene dostavljanjem STZ-a izravno u moždane komore, isti ne isključuju mogućnost patofizioloških promjena perifernih organa obzirom da i) STZ-icv uzrokuje disregulaciju inzulinske signalizacije u mozgu koja je uključena u regulaciju perifernog metabolizma; ii) STZ-icv ostvaruje znatne učinke na hipotalamus koji je ključno središte integracije metaboličkih signala u središnjem živčanom sustavu.

U prilog izraženih učinaka STZ-icv na periferna tkiva govore i nalazi smanjene razine inzulina u plazmi, ali ne i u cerebrospinalnoj tekućini mjesec dana nakon primjene STZ-icv (Knezovic i sur. 2018), promjene koncentracije aktivnog GLP-1 u plazmi 3 mjeseca nakon tretmana (Holst 2019), te promjene koncentracije kortikosterona (WASAD Abstracts 2019) i markera oksidativnog stresa u plazmi. Osim toga, preliminarni rezultati perifernih promjena opisani su u crijevu i bubregu STZ-icv štakora (Klann i sur. 2020; Jan Homolak i sur. 2021).

Svega su dvije grupe znanstvenika istraživala jetru u STZ-icv modelu. Bloch i sur. opisali su razvoj pretilosti, masnu jetru, i povećane koncentracije inzulina i leptina u plazmi u Lewis štakora 3 mjeseca nakon STZ-icv (Bloch i sur. 2017). Bazalne vrijednosti glukoze nisu se razlikovale među grupama, ali su STZ štakori imali povišene vrijednosti glukoze u intraperitonealnom testu opterećenja glukozom. Nalaz masnih promjena jetre i smanjene tolerancije na glukozu opisane su i u Wistar štakora iste starosti (3 mjeseca nakon tretmana) (Stavrovskaya i sur. 2019) što bi moglo upućivati da učinak možda nije ovisan o soju štakora.

U ovom istraživanju nije bilo promjene koncentracije inzulina i glukoze u plazmi mjesec dana nakon STZ-icv tretmana što se djelomično razlikuje od prethodnog istraživanja istovjetnog dizajna gdje je izmjereno umjereno smanjenje inzulina i nepromijenjena glukoza (Knezovic i sur. 2018). Povećane koncentracije inzulina u istraživanju Bloch i sur. mogle bi upućivati da su promjene u plazmi ovisne o vremenu nakon icv primjene STZ .

U jetri STZ-icv štakora došlo je do smanjenja ekspresije IR, IDE i povećanja ekspresije pIRS1 što vjerojatno nije posredovano inzulinom i aktivnim GIP-om čije su vrijednosti nepromijenjene (Slika 4. B,C) Promjena inzulinske signalizacije u jetri povezana je, između ostalog, s nastankom nealkoholne masne promjene jetre (NAFLD - prema eng. *non-alcoholic fatty liver disease*) (Birkenfeld i Shulman 2014) . Budući da su Bloch i sur. opisali steatozu jetre bilo bi zanimljivo istražiti nastaju li masne promjene kao posljedica dugotrajne inzulinske rezistencije u jetri STZ-icv štakora.

Osim direktnih promjena izazvanih STZ-om (Slike 3. A-C), periferne promjene metaboličke regulacije neizravno se mogu iščitati i iz kvantitativnih i kvalitativnih promjena učinaka [Pro<sup>3</sup>]-GIP-a (Slika 3. A-F).

Svi proteini inzulinske signalizacije pokazuju moderaciju učinka STZ što dodatno naglašava da nađene direktne promjene nisu slučajan nalaz (Slika 3 A-C). Drugi metabolički proteini (Slika 4 A) mijenjaju smjer ekspresije u predtretmanu STZ-om što je potencijalno odraz cjelokupne metaboličke disregulacije koja bi mogla biti posredovna oštećenjem hipotalamusa. Tomu u prilog govore i nalazi smanjene periventrikularne mijelinizacija te gubitak ependimalnih stanica u području hipotalamusa (Shoham i sur. 2003), promjene cirkadijanog ritma, te smanjeni unos glukoze u hipotalamusu STZ-icv životinja izmjeren pozitronskom emisijskom tomografijom (Knezovic i sur. 2018).

Zanimljivo je da za razliku od nađenih metaboličkih promjene, u jetri STZ-icv tretiranih štakora nema oksidativnog oštećenja. Ovu tvrdnju podupire činjenica da niti jedan od pet različitih parametara koji opisuju oksido-reduktivnu homeostazu nije promijenjen. Svega nekoliko studija mjerilo je oksidativne promjene jetre u icv-STZ modelu dajući kontradiktorne rezultate. U mišjem modelu izmjereno je povećanje lipidne peroksidacije (TBARS metodom) i niskomolekularnih tiola te smanjenje aktivnosti katalaze dok SOD nije bio promijenjen (Klann i sur. 2020). Različiti rezultati mogli su proizaći iz navedenog: **i)** za uspostavu modela primijenjen je veći volumen otopine STZ-a (5  $\mu$ l) koji je možda izazvao volumnu traumu malog mišjeg ventrikula **ii)** upitan je i izračun doze STZ-a korigiran na cjelokupnu tjelesnu masu zbog različite relativne proporcije tijelo-mozak između miša i štakora. Kod Sprague-Dawley štakora izmjereno je povećanje LMWT, SH, i MDA 7 tjedana nakon STZ-icv (Huang i sur. 2016). Međutim, u ovom istraživanju model sAB uspostavljen je jednokratnom injekcijom STZ-icv uz kroničnu supkutanu primjenu D-galaktoze koja uzrokuje oksidativni stres što bi moglo objasniti opažene promjene. Uzevši u obzir da osim nepromijenjenih parametara oksidativnog stresa nisu nađene promjene ekspresije proteina apoptoze, izgledno je da STZ-icv izravno ne oštećuje hepatocite u danoj dozi.

Drugi dio ovog istraživanja bavio se učinkom akutne središnje primjene [Pro<sup>3</sup>]-GIP-a na serumske proteine i jetru. GIP receptori nađeni su u brojnim regijama mozga (npr. olfaktornom bulbusu, hipokampusu, septalnim jezgrama, mamilarnim tjelešcima i dr.) u kojima njihova fiziološka uloga još nije razvidna. Djelomično je objašnjeno djelovanje GIP u području hipotalamusa. Nakon obroka bogatog ugljikohidratima povećana koncentracija GIP-a djelovanjem na hipotalamus povećava osjećaj sitosti, smanjuje unos hrane i poboljšava glukoregulaciju (Adriaenssens i sur. 2019). Rezultati ovog pokusa donose prve spoznaje o promjenama uzrokovanim intracerebroventrikulatnom primjenom [Pro<sup>3</sup>]-GIP-a. U danoj dozi [Pro<sup>3</sup>]-GIP-a doveo je do stotrukog povećanja GIP-a u plazmi uz što je zabilježen porast inzulina u plazmi. Porast inzulina donekle je logičan budući da je opisana funkcija GIP-a na pospješavanje lučenja inzulina. Promjene u plazmi kao odraz centralne primjene [Pro<sup>3</sup>]-GIP-a mogle bi se tumačiti kao:

- i) Dana doza [Pro<sup>3</sup>]-GIP-a uzrokuje jaku inhibiciju tonusa GIP-a u mozgu što neuralnim mehanizmom povratne sprege dovodi do povećanja GIP-a u plazmi.
- ii) [Pro<sup>3</sup>]-GIP-a mogao bi djelovati kao parcijalni agonist (što je opisano na *in vitro* kulturama stanica glodavaca (Sparre-Ulrich i sur. 2016)) te bi u uvjetima niske koncentracije GIP-a u mozgu djelovao kao agonist GIP receptora.

Potonja hipoteza intuitivno je kontradiktorna jer upućuje da bi GIP u fiziološkim uvjetima mehanizmom centralne pozitivne povratne sprege pojačavao vlastito lučenje iz crijeva. Međutim jedna grupa istraživača opisala je povećanje koncentracije GIP-a i inzulina u plazmi nakon intracerebroventrikularne primjene GIP-a (Yavropoulou i Yovos 2010). Za odgovor na postavljena pitanja trebalo bi ponoviti pokus s primjenom različitih doza GIP-a, [Pro<sup>3</sup>]-GIP-a i drugog inhibitora za koji je antagonizam neovisan o koncentraciji. Opisane promjene jetre potrebno je sagledati u kontekstu promjena u plazmi jer pružaju direktnu mehanicističku poveznicu. Stoga bi opisana promjena inzulinske signalizacije u jetri mogla biti posljedica povećane koncentracije i efikasnosti inzulina. Budući da nije opisana ekspresija GIP receptora na hepatocitima štakora (Usdin i sur. 1993) povećana koncentracija GIP-a u plazmi vjerojatno je indirektno pridonijela djelovanju inzulina nepoznatim mehanizmom (Keyhani-Nejad i sur. 2020).

## Zaključci

1. Akutna intracerebroventrikularna primjena [Pro<sup>3</sup>]-GIP-a nije uzrokovala promjene parametara oksidativnog stresa u jetri zdravih štakora dok su proteini inzulinskog signalnog puta bili značajno promijenjeni u smjeru moguće inzulinske rezistencije (smanjena ekspresija IR, povećana fosforilacija IRS1, snižena razina IDE).
2. Akutna intracerebroventrikularna primjena [Pro<sup>3</sup>]-GIP-a praćena je povećanjem koncentracije GIP-a i inzulina u plazmi što bi moglo objasniti promjenu inzulinske signalizaciju
3. Parametri oksidativnog stresa nisu značajno promijenjeni u jetri štakorskog modela sporadične Alzheimerove bolesti.
4. Učinak akutne primjene [Pro<sup>3</sup>]-GIP-a na inzulinsku signalizaciju u jetri kvalitativno je različit u štakora s eksperimentalnom sAB u odnosu na zdrave životinje (bez značajnih promjena izražaja IR i IDE te smanjene fosforilacije IRS1).
5. Učinak akutne primjene [Pro<sup>3</sup>]-GIP-a na parametre oksidativnog stresa u jetri ne razlikuje se u štakora s eksperimentalnom sAB i zdravih životinja.
6. Nisu opisane promjene ekspresije proteina programirane stanične smrti i enzima respiracijskog lanca u eksperimentalnom modelu sAB.

## Zahvale

Prije svega hvala mom ocu Marinu i majci Neli jer bez njihove potpore, ljubavi i razumijevanja ništa nebi bilo moguće, jer oni su ti koju su cijeli moj život stajali uz mene.

Hvala mojoj braći i sestrama Kristini, Jakovu, Anđeli i Filipu što su bili uz mene i trpili moje nervozne trenutke dok san mahnito učio rokove.

Hvala *didu* Tomi i baki Tereziji što su mislili na mene tijekom cijelog mog školovanja.

Hvala mojoj rodbini, obitelji Prpić i Kaštela što su predivnim druženjima uljepšavali moje studentske dane i bili mi podrška.

Veliko hvala prof.dr.sc. Meliti Šalković-Petrišić, voditeljici laboratorija za molekularnu neurofarmakologiju, na prilici da kao student učim u njenom laboratoriju i ispravljanju i diskusiji tijekom pisanja rada.

Neizmjereno hvala prof.dr.sc Vladimiru Trkulji (poznatom kao *Profesor*) na kritičkoj korekciji rukopisa i puno životnih iskustava upijenih tokom boravka u kuhinji Katedre za Farmakologiju (pri tome ne mislim na kuhanje *carbonare*)

Za ovaj rad se ipak najviše moram zahvaliti Janu Homolaku na svom strpljenju za moje propale pokušaje u laboratoriju i na pomalo „životnom“ mentoriranju u kasnim satima u sobi 225. Štoviše, hvala na svim „dobrim“ forama i na ustrajnosti da me pobjedi u stolnom tenisu.

Hvala Davoru i Kokiju na pomoć pri formatiranju rada 10 minuta prije prijave Rektorove nagrade.

Hvala mojim zadranima Lemi, Duli i Vrkenzu za sve dišpete.

Na kraju, ne smijem zaboraviti zahvaliti se svim prijateljima koje sam stekao na studiju koji su ovu dugu plovidbu učinili mirnijom (znat će oni koji su) i svim članovima grupe Pelinjo na bajkovito lipom završetku studija.

## Životopis

Rođen sam 07.01.1998. godine u Zadru gdje sam završio Gimnaziju Frane Petrića. Već sada davne jeseni 2016. godine upisao sam Medicinski fakultet u Zagrebu kojeg sam završio 2022. godine.

Još prije upisa na fakultet gajio sam interes prema znanosti koji se konačno kanalizirao u posljednje dvije godine studija, kada sam puno popodneva (a ponekad i noći) provodio u Laboratoriju za molekularnu neurofarmakologiju pri Katedri za Farmakologiju pod vodstvom profesorice Melite Šalković-Petrišić. Sudjelovao sam u izvođenju eksperimnata koju su se bavili proučavanjem učinaka galaktoze u štakorskom modelu Parkinsonove bolesti, a najviše sam se bavio proučavanjem promjena crijeva u štakorskim modelima Alzheimerove i Parkinsonove bolesti. Rezultate rada u laboratoriju prezentirao sam na četiri studentska kongresa i usput sudjelovao u pisanju nekoliko publikacija. Nagrađen sam Dekanovom nagradom za uspjeh 2019. godine.

## Popis literature

- Adriaenssens, Alice E., Emma K. Biggs, Tamana Darwish, John Tadross, Tanmay Sukthankar, Milind Girish, Joseph Pollex-Wolf, i sur.. 2019. „Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide Receptor-Expressing Cells in the Hypothalamus Regulate Food Intake“. *Cell Metabolism* 30 (5): 987-996.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.07.013>.
- Armstrong, R. A. 2013. „What Causes Alzheimer’s Disease?“ *Folia Neuropathologica* 51 (3): 169-88. <https://doi.org/10.5114/fn.2013.37702>.
- Bassendine, Margaret F., Simon D. Taylor-Robinson, Michael Fertleman, Michael Khan, i Dermot Neely. bez dat. „Is Alzheimer’s Disease a Liver Disease of the Brain?“ *Journal of Alzheimer’s Disease* 75 (1): 1-14. <https://doi.org/10.3233/JAD-190848>.
- Biasibetti, Regina, João Paulo Almeida Dos Santos, Leticia Rodrigues, Krista Minéia Wartchow, Lucas Zingano Suardi, Patrícia Nardin, Nicholas Guerini Selistre, Dandara Vázquez, i Carlos-Alberto Gonçalves. 2017. „Hippocampal Changes in STZ-Model of Alzheimer’s Disease Are Dependent on Sex“. *Behavioural Brain Research* 316 (siječanj): 205-14. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.08.057>.
- Birkenfeld, Andreas L., i Gerald I. Shulman. 2014. „Nonalcoholic Fatty Liver Disease, Hepatic Insulin Resistance, and Type 2 Diabetes“. *Hepatology* 59 (2): 713-23. <https://doi.org/10.1002/hep.26672>.
- Bloch, Konstantin, Irit Gil-Ad, Alexey Vanichkin, Shay Henry Hornfeld, Nickolay Koroukhov, Michal Taler, Pnina Vardi, i Abraham Weizman. 2017. „Intracerebroventricular Streptozotocin Induces Obesity and Dementia in Lewis Rats“. *Journal of Alzheimer’s Disease: JAD* 60 (1): 121-36. <https://doi.org/10.3233/JAD-161289>.
- Borsom, Emily M., Keehoon Lee, i Emily K. Cope. 2020. „Do the Bugs in Your Gut Eat Your Memories? Relationship between Gut Microbiota and Alzheimer’s Disease“. *Brain Sciences* 10 (11): 814. <https://doi.org/10.3390/brainsci10110814>.
- Cao, Tinghui, Min He, Tianyu Bai, i Hui Liu. 2016. „Establishment of a Method for Measuring Antioxidant Capacity in Urine, Based on Oxidation Reduction Potential and Redox Couple I2/KI“. *Bioinorganic Chemistry and Applications* 2016 (prosinac): e7054049. <https://doi.org/10.1155/2016/7054049>.
- Correia, Sónia C, Renato X Santos, George Perry, Xiongwei Zhu, Paula I Moreira, i Mark A Smith. 2011. „Insulin-Resistant Brain State: The Culprit in Sporadic Alzheimer’s Disease“. *Ageing Research Reviews* 10 (2): 264-73. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2011.01.001>.
- Duelli, Roman, Helmut Schröck, Wolfgang Kuschinsky, i Siegfried Hoyer. 1994. „Intracerebroventricular Injection of Streptozotocin Induces Discrete Local Changes in Cerebral Glucose Utilization in Rats“.

*International Journal of Developmental Neuroscience* 12 (8): 737-43. [https://doi.org/10.1016/0736-5748\(94\)90053-1](https://doi.org/10.1016/0736-5748(94)90053-1).

Duyckaerts, Charles, Marie-Claude Potier, i Benoît Delatour. 2008. „Alzheimer Disease Models and Human Neuropathology: Similarities and Differences“. *Acta Neuropathologica* 115 (1): 5-38. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0312-8>.

Estrada, Lisbell D., Pablo Ahumada, Daniel Cabrera, i Juan P. Arab. 2019. „Liver Dysfunction as a Novel Player in Alzheimer's Progression: Looking Outside the Brain“. *Frontiers in Aging Neuroscience* 11. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00174>.

Genin, E., D. Hannequin, D. Wallon, K. Sleegers, M. Hiltunen, O. Combarros, M. J. Bullido, i sur.. 2011. „APOE and Alzheimer Disease: A Major Gene with Semi-Dominant Inheritance“. *Molecular Psychiatry* 16 (9): 903-7. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.52>.

Giovannini, Maria Grazia, Daniele Lana, Chiara Traini, i Maria Giuliana Vannucchi. 2021. „The Microbiota-Gut-Brain Axis and Alzheimer Disease. From Dysbiosis to Neurodegeneration: Focus on the Central Nervous System Glial Cells“. *Journal of Clinical Medicine* 10 (11): 2358. <https://doi.org/10.3390/jcm10112358>.

Grieb, Paweł. 2016. „Intracerebroventricular Streptozotocin Injections as a Model of Alzheimer's Disease: In Search of a Relevant Mechanism“. *Molecular Neurobiology* 53 (3): 1741-52. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9132-3>.

Hölscher, Christian. 2014. „The Incretin Hormones Glucagonlike Peptide 1 and Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide Are Neuroprotective in Mouse Models of Alzheimer's Disease“. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* 10 (1 Suppl): S47-54. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2013.12.009>.

Holst, Jens Juul. 2019. „The Incretin System in Healthy Humans: The Role of GIP and GLP-1“. *Metabolism* 96 (srpanj): 46-55. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2019.04.014>.

Homolák, J, I Kodvanj, A Babic Perhoc, D Virag, A Knezovic, J Osmanovic Barilar, P Riederer, i M Salkovic-Petrisic. 2020. „Nitrocellulose Redox Permanganometry: A Simple Method for Reductive Capacity Assessment“, lipanj. <https://doi.org/10.1101/2020.06.16.154682>.

Homolák, Jan, Ana Babić Perhoč, Ana Knezovic, Jelena Osmanovic, Fatma Koc, Catherine Stanton, R. Ross, i Melita Salkovic-Petrisic. 2021. *Disbalance of the intestinal epithelial cell turnover and apoptosis in a rat model of sporadic Alzheimer's disease*. <https://doi.org/10.1101/2021.04.22.440947>.

- Homolak, Jan, Ana Babić Perhoč, Ana Knezovic, Jelena Osmanovic, i Melita Salkovic-Petrisic. 2021. *Failure of the brain glucagon-like peptide-1-mediated control of intestinal redox homeostasis in a rat model of sporadic Alzheimer's disease*. <https://doi.org/10.1101/2021.03.22.436453>.
- Hrvatski zavod za javno zdravstvo. bez dat. „Alzheimerova bolest“. Pristupljeno 27. lipanj 2021. <https://www.hzjz.hr/aktualnosti/alzheimerova-bolest/>.
- Hsieh, Po-Shiuan, i Yen-Ju Hsieh. 2011. „Impact of liver diseases on the development of type 2 diabetes mellitus“. *World Journal of Gastroenterology: WJG* 17 (48): 5240-45. <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i48.5240>.
- Huang, Han-Chang, Bo-Wen Zheng, Yu Guo, Jian Zhao, Jiang-Yan Zhao, Xiao-Wei Ma, i Zhao-Feng Jiang. 2016. „Antioxidative and Neuroprotective Effects of Curcumin in an Alzheimer's Disease Rat Model Co-Treated with Intracerebroventricular Streptozotocin and Subcutaneous D-Galactose“. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 52 (3): 899-911. <https://doi.org/10.3233/JAD-150872>.
- Kametani, Fuyuki, i Masato Hasegawa. 2018. „Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease“. *Frontiers in Neuroscience* 12 (siječanj): 25. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00025>.
- Keyhani-Nejad, Farnaz, Renate Luisa Barbosa Yanez, Margrit Kemper, Rita Schueler, Olga Pivovarova-Ramich, Natalia Rudovich, i Andreas F. H. Pfeiffer. 2020. „Endogenously Released GIP Reduces and GLP-1 Increases Hepatic Insulin Extraction“. *Peptides* 125 (ožujak): 170231. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2019.170231>.
- Klann, Isabella Pregardier, Franciele Martini, Suzan Gonçalves Rosa, i Cristina Wayne Nogueira. 2020. „Ebselen Reversed Peripheral Oxidative Stress Induced by a Mouse Model of Sporadic Alzheimer's Disease“. *Molecular Biology Reports* 47 (3): 2205-15. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05326-5>.
- Knezovic, A., A. Loncar, J. Homolak, U. Smailovic, J. Osmanovic Barilar, L. Ganoci, N. Bozina, P. Riederer, i Melita Salkovic-Petrisic. 2017. „Rat Brain Glucose Transporter-2, Insulin Receptor and Glial Expression Are Acute Targets of Intracerebroventricular Streptozotocin: Risk Factors for Sporadic Alzheimer's Disease?“ *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)* 124 (6): 695-708. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1727-6>.
- Knezovic, Ana, Jelena Osmanovic Barilar, Ana Babic, Robert Bagaric, Vladimir Farkas, Peter Riederer, i Melita Salkovic-Petrisic. 2018. „Glucagon-like Peptide-1 Mediates Effects of Oral Galactose in Streptozotocin-Induced Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease“. *Neuropharmacology* 135 (lipanj): 48-62. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.02.027>.



- Knezovic, Ana, Jelena Osmanovic-Barilar, Marija Curlin, Patrick R. Hof, Goran Simic, Peter Riederer, i Melita Salkovic-Petrisic. 2015. „Staging of Cognitive Deficits and Neuropathological and Ultrastructural Changes in Streptozotocin-Induced Rat Model of Alzheimer’s Disease“. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)* 122 (4): 577-92. <https://doi.org/10.1007/s00702-015-1394-4>.
- Li, Xican. 2012. „Improved Pyrogallol Autoxidation Method: A Reliable and Cheap Superoxide-Scavenging Assay Suitable for All Antioxidants“. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (25): 6418-24. <https://doi.org/10.1021/jf204970r>.
- Lobo, A., L. J. Launer, L. Fratiglioni, K. Andersen, A. Di Carlo, M. M. Breteler, J. R. Copeland, i sur.. 2000. „Prevalence of Dementia and Major Subtypes in Europe: A Collaborative Study of Population-Based Cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group“. *Neurology* 54 (11 Suppl 5): S4-9.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, i R. J. Randall. 1951. „Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent“. *The Journal of Biological Chemistry* 193 (1): 265-75.
- Maarouf, Chera L., Jessica E. Walker, Lucia I. Sue, Brittany N. Dugger, Thomas G. Beach, i Geidy E. Serrano. 2018. „Impaired Hepatic Amyloid-Beta Degradation in Alzheimer’s Disease“. *PLoS One* 13 (9): e0203659. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203659>.
- Miller, Luke. 2010. „Analyzing Gels and Western Blots with ImageJ“. 2010. <https://lukemiller.org/index.php/2010/11/analyzing-gels-and-western-blots-with-image-j/>.
- Mullard, Asher. 2021. „Landmark Alzheimer’s Drug Approval Confounds Research Community“. *Nature* 594 (7863): 309-10. <https://doi.org/10.1038/d41586-021-01546-2>.
- Nitsch, R., i S. Hoyer. 1991. „Local Action of the Diabetogenic Drug, Streptozotocin, on Glucose and Energy Metabolism in Rat Brain Cortex“. *Neuroscience Letters* 128 (2): 199-202. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(91\)90260-z](https://doi.org/10.1016/0304-3940(91)90260-z).
- Prabhakar, P. V., Utkarsh A. Reddy, S. P. Singh, A. Balasubramanyam, M. F. Rahman, S. Indu Kumari, Sachin B. Agawane, U. S. N. Murty, Paramjit Grover, i Mohammed Mahboob. 2012. „Oxidative Stress Induced by Aluminum Oxide Nanomaterials after Acute Oral Treatment in Wistar Rats“. *Journal of Applied Toxicology: JAT* 32 (6): 436-45. <https://doi.org/10.1002/jat.1775>.
- Qiu, Chengxuan, Miia Kivipelto, i Eva von Strauss. 2009. „Epidemiology of Alzheimer’s Disease: Occurrence, Determinants, and Strategies toward Intervention“. *Dialogues in Clinical Neuroscience* 11 (2): 111-28.
- Roberts, Kaleigh Filisa, Donald L. Elbert, Tom P. Kasten, Bruce W. Patterson, Wendy C. Sigurdson, Rose E. Connors, Vitaliy Ovod, i sur.. 2014. „Amyloid- $\beta$  Efflux from the Central Nervous System into the Plasma“. *Annals of Neurology* 76 (6): 837-44. <https://doi.org/10.1002/ana.24270>.

- Salkovic-Petrisic, M., i S. Hoyer. 2007. „Central Insulin Resistance as a Trigger for Sporadic Alzheimer-like Pathology: An Experimental Approach“. *Journal of Neural Transmission. Supplementum*, izd. 72: 217-33. [https://doi.org/10.1007/978-3-211-73574-9\\_28](https://doi.org/10.1007/978-3-211-73574-9_28).
- Salkovic-Petrisic, Melita, Ana Knezovic, Siegfried Hoyer, i Peter Riederer. 2013. „What Have We Learned from the Streptozotocin-Induced Animal Model of Sporadic Alzheimer's Disease, about the Therapeutic Strategies in Alzheimer's Research“. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)* 120 (1): 233-52. <https://doi.org/10.1007/s00702-012-0877-9>.
- Shoham, S., C. Bejar, E. Kovalev, i M. Weinstock. 2003. „Intracerebroventricular Injection of Streptozotocin Causes Neurotoxicity to Myelin That Contributes to Spatial Memory Deficits in Rats“. *Experimental Neurology* 184 (2): 1043-52. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2003.08.015>.
- Sparre-Ulrich, A. H., L. S. Hansen, B. Svendsen, M. Christensen, F. K. Knop, B. Hartmann, J. J. Holst, i M. M. Rosenkilde. 2016. „Species-Specific Action of (Pro3)GIP - a Full Agonist at Human GIP Receptors, but a Partial Agonist and Competitive Antagonist at Rat and Mouse GIP Receptors“. *British Journal of Pharmacology* 173 (1): 27-38. <https://doi.org/10.1111/bph.13323>.
- Stavrovskaya, A. V., D. N. Voronkov, E. A. Shestakova, A. S. Gushchina, A. S. Olshansky, i N. G. Yamshikova. 2019. „[Streptozocin-induced Alzheimer's disease as an independent risk factor for the development of hyperglycemia in Wistar rats]“. *Problemy Endokrinologii* 65 (5): 351-61. <https://doi.org/10.14341/probl12126>.
- Stefanacci, Richard G. 2011. „The Costs of Alzheimer's Disease and the Value of Effective Therapies“. *The American Journal of Managed Care* 17 Suppl 13 (studenti): S356-362.
- Sun, Yayi, Nerina R. Sommerville, Julia Yuen Hang Liu, Man Piu Ngan, Daniel Poon, Eugene D. Ponomarev, Zengbing Lu, Jeng S. C. Kung, i John A. Rudd. 2020. „Intra-gastrointestinal Amyloid- $\beta$ 1-42 Oligomers Perturb Enteric Function and Induce Alzheimer's Disease Pathology“. *The Journal of Physiology* 598 (19): 4209-23. <https://doi.org/10.1113/JP279919>.
- Szkudelski, T. 2001. „The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas“. *Physiological Research* 50 (6): 537-46.
- Takeda, Shuko, Naoyuki Sato, i Ryuichi Morishita. 2014. „Systemic Inflammation, Blood-Brain Barrier Vulnerability and Cognitive/Non-Cognitive Symptoms in Alzheimer Disease: Relevance to Pathogenesis and Therapy“. *Frontiers in Aging Neuroscience* 6: 171. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00171>.
- Uzdin, T. B., E. Mezey, D. C. Button, M. J. Brownstein, i T. I. Bonner. 1993. „Gastric Inhibitory Polypeptide Receptor, a Member of the Secretin-Vasoactive Intestinal Peptide Receptor Family, Is Widely

Distributed in Peripheral Organs and the Brain". *Endocrinology* 133 (6): 2861-70. <https://doi.org/10.1210/endo.133.6.8243312>.

Van der Plancken, Iesal, Ann Van Loey, i Marc E. G. Hendrickx. 2005. „Changes in Sulfhydryl Content of Egg White Proteins Due to Heat and Pressure Treatment“. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (14): 5726-33. <https://doi.org/10.1021/jf050289+>.

Wang, Xiao-Ping, i Hong-Liu Ding. 2008. „Alzheimer's disease: Epidemiology, genetics, and beyond“. *Neuroscience bulletin* 24 (svibanj): 105-9. <https://doi.org/10.1007/s12264-008-0105-7>.

WASAD Abstracts. 2019. „Abstracts of the WASAD Congress 2019: An International Congress of the World Association for Stress Related and Anxiety Disorders in Collaboration with the Collaborative Research Center SFB-TRR 58, Fear, Anxiety, Anxiety Disorders, Held on 3-5 October 2019 in Würzburg, Germany“. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, listopad, 1519-76. <https://doi.org/10.1007/s00702-019-02095-9>.

Yavropoulou, Maria P., i John G. Yovos. 2010. „Central Regulation of Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide Secretion“. *Vitamins and Hormones* 84: 185-201. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381517-0.00006-0>.

## Sažetak

Mihovil Joja

### **AKUTNI UČINAK INTRACEREBROVENTRIKULARNE PRIMJENE INHIBITORA RECEPTORA ZA INKRETIN NA POKAZATELJE OKSIDATIVNOG STRESA I INZULINSKE SIGNALIZACIJE U JETRI ŠTAKORSKOG MODELA SPORADIČNE ALZHEIMEROVE BOLESTI**

Incidencija demencije uzrokovane sporadičnim oblikom Alzheimerove bolesti (sAB) ima zabrinjavajući trend porasta u proteklih 20 godina te predstavlja značajan zdravstveni i ekonomski teret društava. Novije spoznaje o podlozi neurodegenerativnih promjena u sAB ukazuju na moguću ulogu perifernih organa, posebno jetre, kao jednog od čimbenika u patofiziologiji sAB. Jedan od najkorištenijih modela sAB je štakorski model dobiven intracerebroventikularnom primjenom streptozotocina (STZ-icv). Primjena inkretinskih analoga u STZ-icv životinja dovela je do poboljšanja kognitivnih funkcija i otvorila put njihovom daljnjem testiranju na ljudima. U ovom radu istraživana je akutna inhibicija receptora za inzulotropni polipeptid ovisan o glukozu (GIP) na parametre oksidativnog stresa i metaboličke signalizacije u jetri kod zdravih i STZ-icv štakora. Rezultati pokazuju da središnja inhibicija GIP sustava u zdravih životinja ne dovodi do oksidativnog stresa ali poremećuje inzulinsku signalizaciju u jetri (smanjuje izražaj IR, povećava fosforilaciju IRS1 i snižava razinu IDE), uz povećanje razine GIP-a i inzulina u plazmi. U štakora s eksperimentalnom sAB, centralna inhibicija GIP-a također nije imala učinka na oksidativni stres, ali smo primijetili promjene manjeg intenziteta u vidu inzulinske signalizacije.

Ključne riječi: Alzheimerova bolest, jetra, streptozotocin, inkretini

## Summary

Mihovil Joja

### **ACUTE EFFECT OF INTRACEREBROVENTRICULAR APPLICATION OF INCRETIN RECEPTOR INHIBITOR ON INDICATORS OF OXIDATIVE STRESS AND INSULIN SIGNALIZATION IN THE LIVER OF THE RAT MODEL OF SPORADIC ALZHEIMER'S DISEASE**

A significant medical and economic burden comes from an increasing incidence of sporadic Alzheimer's disease (sAD) that is observed over the last 20 years. Recent studies stress the importance of peripheral organs, namely the liver, in the pathophysiology of sAD. Intracerebroventricular (ICV) application of streptozotocin in rats induces Alzheimer-like changes in animals, and it is the most common sAD model in use. Incretin analogs treatment improved cognitive functions in ICV/STZ sAD model. In this study, we investigated the influence of GIP receptor inhibition treatment on oxidative stress and metabolic signaling in the liver of the ICV STZ model. Central inhibition of GIP in healthy animals did not increase oxidative stress but did disrupt insulin signaling in the liver by decreasing expression of insulin receptor and IDE, and increasing the phosphorylation of IRS1. In rats with experimental sAD, central inhibition of GIP also did not affect oxidative stress but we observed the same changes in insulin signaling to a lesser degree.

Key words: Alzheimer 's disease, liver, streptozotocin, incretins