

# Patofiziološke promjene probavnog sustava u životinjskim modelima Alzheimerove i Parkinsonove bolesti

---

Homolak, Jan

Doctoral thesis / Disertacija

2023

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:105:754088>

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**

**Jan Homolak**

**Patofiziološke promjene probavnog  
sustava u životinjskim modelima  
Alzheimerove i Parkinsonove bolesti**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2023.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Jan Homolak**

**Patofiziološke promjene probavnog  
sustava u životinjskim modelima  
Alzheimerove i Parkinsonove bolesti**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2023.

Disertacija je izrađena na Zavodu za Farmakologiju i Hrvatskom institutu za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, temeljem projekta Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ) „Razvoj karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti“ (DOK-2018-09-6526, voditeljica prof. dr. sc. Melita Šalković-Petrišić), predloženog u okviru istraživačkog HRZZ projekta „Mehanizmi nutrijentom posredovanih učinaka endogenog glukagonu sličnog peptida-1 na kognitivne i metaboličke poremećaje u eksperimentalnim modelima neurodegenerativnih bolesti“ (IP-2018-01-8938, voditeljica prof. dr. sc. Melita Šalković-Petrišić) te Znanstvenog centra izvrsnosti za temeljnu, kliničku i translacijsku neuroznanost, projekt: „Eksperimentalna i klinička istraživanja hipoksijsko-ishemijskog oštećenja mozga u perinatalnoj i odrasloj dobi“ (KK.01.1.1.01.0007“, voditelj: prof. dr. sc. Miloš Judaš).

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



Posljednjih nekoliko godina nemalo sam puta imao priliku slušati i čitati o mračnom razdoblju života protkanom tjeskobom koje obično započinje tamo negdje brzo nakon kobne odluke o upisivanju doktorata i traje bar do onog patetičnog zadnjeg slajda na obrani disertacije. Moram priznati da, iako sam ovu zahvalu ostavio za kraj, još uvijek čekam da to tmurno i teško razdoblje započne (čak i uz ove silne potrese, korone i druge strašne stvari), a usudim se vjerovati da sam ga i u potpunosti preskočio što je gotovo u cijelosti zasluga ljudi kojima sam bio okružen i kojima ovim putem želim iskreno zahvaliti. Veliko hvala mojoj mentorici prof. dr. sc. Meliti Šalković-Petrišić što mi je još kao studentu pružila priliku da se pridružim njenoj istraživačkoj grupi čime mi je omogućila da napravim svoje prve znanstvene korake i fatalno se zaljubim u romantičnu ideju traganja za istinom radi čega mi novčanik vjerojatno nikad neće biti previše težak, ali isto tako ne sumnjam da mi nikad neće biti dosadno (što nije loša trampa). Hvala što ste me znanstveno odgojili i omogućili da budem ponosan što sam (bio) znanstveni pilić baš tu gdje jesam. Ništa manju zahvalu dužan sam i ostatku ljudi iz labosa – Ani, Ani, Jeleni, Ivici, Davoru, Petri i Patriku. Hvala na znanstvenim i svim drugim savjetima, koncertima, kavama i cugama i ne manje važno neiscrpnom razumijevanju za moj nered i blesave ideje. Hvala Božici, Nevenki, Josipu, Ljiljani, Tomi, Miri, Aniti, Renati i Lani koji su u jednakoj mjeri bili žrtve mog nereda, a koji su svi, bez obzira na to, bezrezervno i nesebično pomagali u svim segmentima istraživanja. Bez vaše pomoći ovaj bi doktorat zapeo već nakon uvoda. Hvala svim profesorima što su bili izvrsni učitelji i nesebično dijelili životne, stručne i znanstvene savjete. Posebno hvala prof. Trkulji na silnoj hrani (posebno onoj intelektualnoj), svim životnim mudrostima te motivaciji i inspiraciji pažljivo zapakiranima u pitanje „Što si danas novo naučio?“ koje mi je podmetnuo gotovo svakodnevno. Veliko hvala cijeloj ekipi sa Zavoda za farmakologiju, s HIIM-a i s ostatka ovog brda. Iskreno mislim da mi je topla, ljudska i opuštana atmosfera omogućila da se bez inhibicija i sa znatiželjom posvetim znanstvenom radu radi čega će mi proteklo razdoblje ostati u jako lijepom sjećanju.

Hvala svim „mojim“ studentima koji su me proteklih godina sve živo naučili i čija su mi nesebičnost, znatiželja, zanos i energija bili neiscrpan izvor inspiracije i motivacije.

Na kraju, najveće hvala mojoj obitelji i svim prijateljima na bezrezervnoj podršci i

ljubavi. Kako kaže Maslow, da mi niste napunili do kraja vrč pripadanja, ljubavi, prijateljstva i povezanosti, nema šanse da bih se samoaktualizirao mućkanjem tamo nekih kemikalija u labosu do kasno u noć. Sori za sva kašnjenja kad bih fizički zapeo na Šalati i za sva baljezganja kad bih gore zapeo mentalno.



# SADRŽAJ

1	UVOD I SVRHA RADA .....	1
1.1.	Alzheimerova bolest.....	1
1.2.	Parkinsonova bolest.....	6
1.3.	Probavni sustav u Alzheimerovoj i Parkinsonovoj bolesti .....	10
1.4.	Životinjski modeli Alzheimerove i Parkinsonove bolesti.....	15
1.4.1.	Životinjski modeli Alzheimerove bolesti.....	17
1.4.1.1.	Netransgenični model sporadične Alzheimerove bolesti izazvan intracerebroventrikularnim streptozotocinom.....	20
1.4.2.	Životinjski modeli Parkinsonove bolesti .....	22
1.4.2.1.	Netransgenični model Parkinsonove bolesti izazvan intrastrijatalnim 6-hidroksidopaminom .....	25
1.5.	Redoks homeostaza .....	27
1.5.1.	Koncept homeostaze .....	27
1.5.2.	Redoks homeostaza.....	30
1.6.	Inkretinski sustav i neurodegenerativne bolesti .....	37
1.7.	Galaktoza.....	40
2.	HIPOTEZA.....	45
3.	CILJEVI RADA .....	47
4.	MATERIJALI I METODE.....	49
4.1.	Životinje .....	49
4.2.	Štakorski model sporadične Alzheimerove bolesti izazvan intracerebroventrikularnom primjenom streptozotocina.....	51
4.3.	Štakorski model Parkinsonove bolesti izazvan intrastrijatalnom primjenom 6-hidroksidopamina .....	52
4.4.	Inhibicija inkretinskih receptora u središnjem živčanom sustavu primjenom inhibitora inkretinskih receptora u lateralne moždane komore .....	53
4.5.	Akutni tretman oralnom galaktozom .....	54
4.6.	Kronični tretman oralnom galaktozom .....	55
4.7.	Test rotirajućeg cilindra .....	56
4.8.	Test prepoznavanja novog objekta.....	57
4.9.	Test društvene sklonosti/interakcije .....	59
4.10.	Prikupljanje i pohrana fecesa tijekom <i>in vivo</i> pokusa .....	60
4.11.	Prikupljanje uzoraka tkiva po završetku <i>in vivo</i> pokusa.....	61
4.11.1.	Prikupljanje uzoraka krvne plazme .....	61

4.11.2.	Prikupljanje uzoraka cerebrospinalnog likvora.....	61
4.11.3.	Perfuzija, fiksacija, i uklapanje tkiva probavne cijevi .....	62
4.11.4.	Prikupljanje i pohrana svježih uzoraka tkiva probavne cijevi .....	63
4.11.5.	Prikupljanje i pohrana sadržaja cekuma.....	64
4.11.6.	Prikupljanje i pohrana sadržaja sluzi iz probavne cijevi .....	64
4.12.	Prikupljanje i priprema uzoraka za <i>ex vivo</i> pokuse .....	65
4.12.1.	Testiranje odgovora tkiva na oksidativnu noksus ili bez D-galaktoze <i>ex vivo</i> 65	
4.12.2.	Testiranje odgovora vrčastih stanica crijeva na kolinergičku stimulaciju <i>ex vivo</i> 66	
4.13.	<i>In vitro</i> analiza difuzije kofeina kroz rekonstituiranu sluz .....	67
4.14.	Homogeniziranje uzoraka tkiva.....	69
4.15.	Priprema uzoraka fecesa.....	70
4.16.	Određivanje koncentracije proteina.....	71
4.17.	Analiza apsorbancijskog spektra .....	72
4.18.	Mjerenje koncentracije nepolarnih lipida fecesa .....	73
4.19.	Određivanje koncentracije glukoze .....	74
4.20.	Određivanje koncentracije galaktoze.....	75
4.21.	Određivanje koncentracije nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfata.....	76
4.22.	Određivanje koncentracije inkretina imunoenzimskim testom .....	77
4.23.	Određivanje koncentracije glutamata i cikličkog adenozin-monofosfata .....	78
4.24.	Tribometrijska analiza lubricirajućih svojstava sluzi pomoću višenamjenskog pretvarača za probirna tribometrijska mjerenja.....	79
4.25.	<i>In vitro</i> analiza sluzi pomoću fluorescencijskog spektra akridin narančastog .....	80
4.26.	Analiza pH probavne sluzi timolsulfoneftaleinom.....	81
4.27.	Biokemijske metode za mjerenje redoks homeostaze .....	82
4.27.1.	Redoks permanganometrija na nitrocelulozi tekućih uzoraka .....	82
4.27.2.	Redoks permanganometrija tkivnih preslika na nitrocelulozi.....	83
4.27.3.	Mjerenje oksidacijsko-redukcijskog potencijala.....	84
4.27.4.	Ukupni reduktivni kapacitet izmjeren pomoću metastabilnog radikal-kationa 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) .....	84
4.27.5.	Posredna procjena peroksidacije lipida kvantifikacijom spojeva koji stupaju u reakciju s tiobarbiturnom kiselinom .....	85
4.27.6.	Određivanje koncentracije slobodnih tiolnih skupina i koncentracije niskomolekularnih tiola .....	86
4.27.7.	Određivanje aktivnosti katalaza i peroksidaza .....	87

4.27.8.	Procjena disocijacije H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> posredovane citokromom c.....	89
4.27.9.	Posredno određivanje aktivnosti superoksid-dismutaza na temelju inhibicije autoksidacije 1,2,3-trihidroksibenzena .....	90
4.28.	Priprema tkivnih rezova iz parafinskih kocki pomoću mikrotoma .....	92
4.29.	Priprema tkivnih rezova iz fiksiranih i krioprezerviranih zaleđenih uzoraka pomoću kriostata	93
4.30.	Analiza mucina alcijanskim modrilom 8GX.....	94
4.30.1.	Histološka analiza mucina alcijanskim modrilom 8GX.....	94
4.30.2.	Analiza sluzi metodom otiska alcijanskim modrilom 8GX .....	95
4.31.	Otkrivanje tkivnih epitopa .....	96
4.32.	Uklanjanje tkivne autofluorescencije osvjetljavanjem .....	97
4.33.	Imunofluorescencijska analiza .....	98
4.34.	Sinteza fluorescentnih derivata tiramida kao supstrata za odlaganje fluorescentnih biljega katalizirano peroksidazom hrena.....	99
4.35.	Imunodetekcija pomoću višestrukog pojačavanja fluorescentnog signala dostavljanjem peroksidaza združivanjem avidina i biotina uz katalizirano odlaganje fluorescentnih biljega .....	100
4.36.	Analiza izražaja proteina u crijevu i mozgu Western blot metodom .....	102
4.37.	Analiza crijevnog mikrobioma .....	105
4.38.	Analiza kratkolančanih masnih kiselina i masnih kiselina razgranatog lanca u sadržaju cekuma .....	106
4.39.	Analiza pomoću epifluorescencijskog mikroskopa.....	107
4.40.	Analiza slika .....	108
4.40.1.	Morfometrijska analiza probavne barijere .....	108
4.40.2.	Procjena količine probavne sluzi.....	109
4.40.3.	Morfometrijska analiza kapi probavne sluzi <i>in vitro</i> .....	109
4.40.4.	Analiza mikroskopskih slika dobivenih imunofluorescencijom i kataliziranim odlaganjem fluorescentnih biljega.....	110
4.40.5.	Analiza luminiscentnog signala dobivenog snimanjem membrana tijekom Western blot metode .....	111
4.40.6.	Analiza signala dobivenog metodom otiska.....	112
4.40.7.	Analiza signala dobivenih pomoći HistoNRP metode.....	112
4.41.	Analiza podataka .....	113
4.41.1.	Bioinformatička analiza crijevnog mikrobioma.....	113
4.41.2.	Statistička analiza podataka .....	114
5.	REZULTATI.....	117

5.1.	Poremećaji u probavnom sustavu štakorskog modela sporadične Alzheimerove bolesti	117
5.1.1.	Crijevna redoks homeostaza narušena je u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti	117
5.1.1.1.	Poremećena redoks homeostaza probavnog sustava u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti povezana je s narušenom strukturom i funkcijom crijevne barijere	124
5.1.2.	Dishomeostaza barijere probavnog sustava povezana je s ispadom funkcije inkretinske osovine mozak-crijevo u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti	139
5.2.	Poremećaji u probavnom sustavu štakorskog modela Parkinsonove bolesti	157
5.2.1.	Štakorski model Parkinsonove bolesti izazvan intrastrijatalnom primjenom 6-hidroksidopamina nije povezan s razvojem crijevne dishomeostaze	157
5.3.	Učinci oralne galaktoze na štakorske modele sporadične Alzheimerove bolesti i Parkinsonove bolesti	166
5.3.1.	Akutno primijenjena oralna galaktoza modulira redoks homeostazu u probavnom sustavu i mozgu zdravih štakora	166
5.3.2.	Učinci tretmana D-galaktozom na redoks homeostazu u probavnom sustavu štakorskog modela sporadične Alzheimerove bolesti	186
5.3.2.1.	Učinci oralnog tretmana D-galaktozom na crijevnu mikrobiotu u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti	200
5.3.3.	Učinci oralnog tretmana D-galaktozom na probavni sustav štakorskog modela Parkinsonove bolesti	208
5.3.3.1.	Kronična oralna primjena D-galaktoze ne dovodi do poboljšanja motoričkih funkcija u 6-hidroksidopaminskom modelu Parkinsonove bolesti	208
5.3.3.2.	Niže vrijednosti inkretina povezane su s lošijom motoričkom funkcijom u 6-hidroksidopaminskom štakorskom modelu Parkinsonove bolesti	213
5.3.3.3.	Kronični oralni tretman D-galaktozom djeluje blagotvorno na homeostazu i funkciju probavnog sustava u štakorskom modelu Parkinsonove bolesti	216
6.	RASPRAVA	225
6.1.	Patofiziološke promjene probavnog sustava u modelima Alzheimerove bolesti	225
6.1.1.	Patofiziološke promjene probavnog sustava u transgeničnim modelima Alzheimerove bolesti	225
6.1.2.	Patofiziološke promjene probavnog sustava u netransgeničnim modelima Alzheimerove bolesti	227
6.1.2.1.	Patofiziološke promjene probavnog sustava u STZ-icv netransgeničnom štakorskom modelu Alzheimerove bolesti	229
6.1.2.1.1.	Promjene redoks homeostaze u probavnom sustavu STZ-icv netransgeničnog štakorskog modela Alzheimerove bolesti	229

6.1.2.1.2.	Strukturalne promjene crijevne barijere u probavnom sustavu STZ-icv netransgeničnog štakorskog modela Alzheimerove bolesti.....	230
6.1.2.1.3.	Poremećaj homeostaze vrčastih stanica i probavne sluzi u STZ-icv netransgeničnom štakorskom modelu Alzheimerove bolesti .....	233
6.1.2.1.4.	Poremećaj inkretinskog sustava osovine crijevo-mozak u STZ-icv netransgeničnom štakorskom modelu Alzheimerove bolesti .....	236
6.2.	Patofiziološke promjene probavnog sustava u modelima Parkinsonove bolesti.....	240
6.2.1.	Patofiziološke promjene probavnog sustava u transgeničnim modelima Parkinsonove bolesti.....	240
6.2.2.	Patofiziološke promjene probavnog sustava u netransgeničnim modelima Parkinsonove bolesti.....	241
6.2.3.	Poremećaj redoks homeostaze probavnog sustava u životinjskim modelima Parkinsonove bolesti.....	244
6.3.	Biološki učinci D-galaktoze .....	247
6.3.1.	Učinci akutnog oralnog tretmana D-galaktozom na redoks homeostazu u probavnom sustavu štakora .....	247
6.3.2.	Učinci akutnog oralnog tretmana D-galaktozom na sustavnu redoks ravnotežu i redoks homeostazu središnjeg živčanog sustava .....	254
6.3.2.1.	Učinci akutnog oralnog tretmana D-galaktozom na sustavnu redoks homeostazu .....	254
6.3.2.2.	Učinci akutnog oralnog tretmana D-galaktozom na redoks homeostazu hipokampusa .....	254
6.3.2.3.	Značaj jedinstvenog biokemijskog obrasca metabolizma D-galaktoze u kontekstu ograničene dostupnosti hranjivih tvari i hormetske hipoteze.....	258
6.3.3.	Akutni učinci D-galaktoze na redoks homeostazu probavnog sustava <i>ex vivo</i>	263
6.3.4.	Kronični učinci D-galaktoze u STZ-icv štakorskom modelu Alzheimerove bolesti	266
6.3.4.1.	Kronični učinci oralnog tretmana D-galaktozom na objektno pamćenje u STZ-icv štakorskom modelu Alzheimerove bolesti .....	266
6.3.4.2.	Kronični učinci oralne D-galaktoze na probavni sustav u STZ-icv štakorskom modelu Alzheimerove bolesti.....	268
6.3.4.2.1.	Kronični učinci oralne D-galaktoze na redoks homeostazu probavnog sustava u STZ-icv štakorskom modelu Alzheimerove bolesti .....	268
6.3.4.2.2.	Kronični učinci oralne D-galaktoze na cecalne kratkolančane masne kiseline i masne kiseline razgranatog lanca u STZ-icv štakorskom modelu Alzheimerove bolesti	269
6.3.4.2.3.	Kronični učinci oralne D-galaktoze na crijevni mikrobiom u STZ-icv štakorskom modelu Alzheimerove bolesti .....	270



6.3.4.2.4. Kronični učinci oralne D-galaktoze na inkretinski sustav u STZ-icv štakorskom modelu Alzheimerove bolesti .....	272
6.3.5. Kronični učinci oralne D-galaktoze u 6-OHDA štakorskom modelu Parkinsonove bolesti.....	273
6.3.5.1. Kronični učinci oralne D-galaktoze na motoričku funkciju i objektno pamćenje u 6-OHDA štakorskom modelu Parkinsonove bolesti .....	273
6.3.5.2. Kronični učinci oralne D-galaktoze na inkretinski sustav u 6-OHDA štakorskom modelu Parkinsonove bolesti.....	274
6.3.5.3. Kronični učinci oralne D-galaktoze na redoks homeostazu i funkciju probavnog sustava u 6-OHDA štakorskom modelu Parkinsonove bolesti.....	276
6.3.5.4. Kronični učinci oralne D-galaktoze na biokemijske parametre fecesa u 6-OHDA štakorskom modelu Parkinsonove bolesti .....	278
7. ZAKLJUČAK.....	281
8. KRATKI SADRŽAJ.....	285
9. SUMMARY.....	287
10. POPIS LITERATURE .....	289
11. KRATKA BIOGRAFIJA.....	353

## KRATICE

6-OHDA	6-hidroksidopamin (engl. <i>6-hydroxydopamine</i> )
AAPH	2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid
AAV	virus povezan s adenovirusima (engl. <i>adeno-associated virus</i> )
AB	Alzheimerova bolest
ABL	alcijansko modriilo (engl. <i>alcian blue</i> )
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline)(engl. <i>2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)</i> )
ACh	acetilkolin
ADHD	poremećaj pažnje s hiperaktivnošću (engl. <i>attention deficit hyperactivity disorder</i> )
AGE	proizvodi uznapredovale glikacije (engl. <i>advanced glycation end products</i> )
AO	akridin narančasto (engl. <i>acridine orange</i> )
APP	amiloidni prekursorski protein (engl. <i>amyloid precursor protein</i> )
AR	aldehid-reduktaza
ATP	adenozin-trifosfat (engl. <i>adenosine triphosphate</i> )
ATR	atropin
AZD	natrijev azid (NaN <sub>3</sub> )
Aβ	amiloid β
BACE-1	beta sekretaza 1
BBB	krvno-moždana barijera (engl. <i>blood-brain barrier</i> )
BCFA	masne kiseline razgranatog lanca (engl. <i>branched chain fatty acids</i> )
BSA	goveđi serumski albumin (engl. <i>bovine serum albumin</i> )
BSN	Bjerrum Schafer-Nielsen
cAMP	ciklički adenzin-monofosfat (engl. <i>cyclic adenosine monophosphate</i> )
CAS-3	kaspaza-3
CCh	karbakol
CD	dubina crijevnih kripta (engl. <i>crypt depth</i> )
CDK5	kinaza 5 ovisna o ciklinu (engl. <i>cyclin-dependent kinase 5</i> )

cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>complementary deoxyribonucleic acid</i> )
ChAT	kolin-acetiltransferaza (engl. <i>choline acetyltransferase</i> )
CIS	kontrolna skupina životinja tretirana intrastrijatalno vehikulom
CRD	Crohnova bolest (engl. <i>Crohn's disease</i> )
CREB	vezujući protein elementa odgovora na cAMP (engl. <i>cAMP-response element binding protein</i> )
CTR	kontrolna skupina
DADA2	algoritam za uklanjanje šuma u podacima amplikona hijerarhijskim dijeljenjem (prema engl. <i>Divisive Amplicon Denoising Algorithm</i> )
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
ddH <sub>2</sub> O	destilirana i deionizirana voda
DMF	dimetilformamid
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DPP-IV	dipeptidil-peptidaza-IV (engl. <i>dipeptidyl peptidase-IV</i> )
DTNB	5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzojeva kiselina (engl. <i>5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)</i> )
DTT	ditiotreitol (engl. <i>dithiothreitol</i> )
ECH	visina epitelnih stanica (engl. <i>epithelial cell height</i> )
ECW	širina epitelnih stanica (engl. <i>epithelial cell width</i> )
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina (engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
EOAD	Alzheimerova bolest ranog početka (engl. <i>early-onset Alzheimer's disease</i> )
EOPD	Parkinsonova bolest ranog početka (engl. <i>early-onset Parkinson's disease</i> )
Ex-9	eksendin-3(9-39) amid
F/B	omjer mnoštva <i>Firmicutes/Bacteroidetes</i>
GALE	UDP-glukoza 4-epimeraza
GALK	galaktokinaza
GALT	galaktoza-1-fosfat-uridililtransferaza
GAL-1-P	galaktoza-1-fosfat
GAPDH	gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza
GERB	gastroezofagealna refluksna bolest (engl. <i>gastroesophageal reflux disease</i> )

GFAP	kiseli vlaknasti protein glije (engl. <i>glial fibrillary acidic protein</i> )
GIP	inzulintropni polipeptid ovisan o glukozi (engl. <i>glucose-dependent insulinotropic polypeptide</i> )
GIPI	inhibitor receptora za GIP ([Pro <sup>3</sup> ]-GIP)
GLC-1-P	glukoza-1-fosfat
GLPI	inhibitor receptora za GLP-1 (eksendin-3(9-39) amid)
GLP-1	glukagonu sličan peptid-1 (engl. <i>glucagon-like peptide 1</i> )
GLP-1R	GLP-1 receptor
GO	galaktoza-oksidaza
GPx	glutation-peroksidaza
GSH	glutation
GSK-3β	glikogen-sintaza-kinaza-3β (engl. <i>glycogen synthase kinase-3β</i> )
HistoNRP	redoks permanganometrija tkivnih preslika na nitrocelulozi
HNE	4-hidroksinoneal
HRP	peroksidaza iz hrena (engl. <i>horseradish peroxidase</i> )
IBD	upalna bolest crijeva (engl. <i>inflammatory bowel disease</i> )
IBS	sindromom iritabilnog crijeva (engl. <i>irritable bowel syndrome</i> )
IGF-1	čimbenik rasta 1 sličan inzulinu (engl. <i>insulin-like growth factor 1</i> )
IL-1β	interleukin-1β
IL-10	interleukin-10
KCN	kalijev cijanid
LMWT	tioli male molekularne mase (engl. <i>low-molecular-weight thiols</i> )
LOAD	Alzheimerova bolest kasnog početka (engl. <i>late-onset Alzheimer's disease</i> )
LOPD	Parkinsonova bolest kasnog početka (engl. <i>late-onset Parkinson's disease</i> )
LRRK2	kinaza 2 s regijama bogatim leucinom (engl. <i>leucine-rich repeat kinase 2</i> )
LSWB	pufer za ispiranje s niskom koncentracijom soli (engl. <i>low-salt washing buffer</i> )
L-DOPA	levodopa; L-3,4-dihidroksifenilalanin
MAPK	protein-kinaza aktivirana mitogenima (engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i> )
MAPT	protein tau povezan s mikrotubulima (engl. <i>microtubule-associated protein tau</i> )

mastPASTA	višenamjenski pretvarač za probirna tribometrijska mjerenja (engl. <i>multifunctional adapter for screening tribometry</i> )
MCI	blago kognitivno oštećenje (engl. <i>mild cognitive impairment</i> )
MDA	malondialdehid (engl. <i>malondialdehyde</i> )
MFB	medijalni snop prednjeg mozga (engl. <i>medial forebrain bundle</i> )
MPDP+	1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridin (engl. <i>1-methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridine</i> )
MPPP	1-metil-4-fenil-4-propionpiperidin (engl. <i>1-methyl-4-phenyl-4-propionpiperidine</i> )
MPP+	1-metil-4-fenilpiridin (engl. <i>1-methyl-4-phenylpyridine</i> )
MPTP	metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (engl. <i>1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine</i> )
MR	mendelska randomizacija (engl. <i>Mendelian randomization</i> )
NAD	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADK	NAD kinaza
NADP	nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat
NFκB	jezgreni čimbenik kapa, pojačivač lakih lanaca aktiviranih B stanica (engl. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> )
NGS	normalni kozji serum (engl. <i>normal goat serum</i> )
NMDA	N-metil-D-aspartat (engl. <i>N-methyl-D-aspartate</i> )
NOR	test prepoznavanja novog objekta (engl. <i>novel object recognition test</i> )
NRP	redoks permanganometrija na nitrocelulozi (engl. <i>nitrocellulose redox permanganometry</i> )
ORP	oksidacijsko-redukcijski potencijal
PASTA	platforma za zvučno preplašivanje (engl. <i>platform for acoustic startle</i> )
PB	Parkinsonova bolest
PBS	fiziološka otopina puferirana fosfatima (engl. <i>phosphate buffered saline</i> )
PCA	analiza glavnih komponenti (engl. <i>principal component analysis</i> )
PCoA	analiza glavnih koordinata (engl. <i>principal coordinate analysis</i> )
PCR	polimerazna lančana reakcija (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
PD-1	protein 1 programirane smrti stanice (engl. <i>programmed cell death protein 1</i> )
PDGF β	trombocitni čimbenik rasta β (engl. <i>platelet-derived growth factor β</i> )

pERK	fosforilirana frakcija kinaze kontrolirane izvanstaničnim signalima (engl. <i>phosphorylated extracellular signal-regulated kinase</i> )
PERMANOVA	permutacijska multivarijatna analiza varijance (engl. <i>permutational multivariate analysis of variance</i> )
PFK-1	fosfofruktokinaza-1
PI3K	fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat-3-kinaza (engl. <i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase</i> )
PKA	protein-kinaza A
PMSF	fenil-metil-sulfonil fluorid (engl. <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i> )
PPP	put pentoza-fosfata (engl. <i>pentose phosphate pathway</i> )
PS1	presenilin-1
PS2	presenilin-2
PUD	bolest peptičkog vrieda (engl. <i>peptic ulcer disease</i> )
PVC	polivinilklorid
RCF	relativna centrifugalna sila (engl. <i>relative centrifugal force</i> )
RPM	broj okretaja u minuti (engl. <i>rotations per minute</i> )
rRNA	ribosomska ribonukleinska kiselina (engl. <i>ribosomal ribonucleic acid</i> )
sAB	sporadična Alzheimerova bolest
SBB	Sudan crno B (engl. <i>Sudan Black B</i> )
SBLB	mjerenje mrlja lipida Sudan crnim (engl. <i>Sudan Black lipid blot</i> )
SCFA	kratkolančane masne kiseline (engl. <i>short chain fatty acids</i> )
SDS	natrijev dodecil-sulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SDS-PAGE	natrijev dodecil-sulfatpoliakrilamidna gel-elektroforeza (engl. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
SH	slobodne tiolne skupine (engl. <i>sulfhydryl groups</i> )
SIBO	prekomjerni rast bakterija u tankom crijevu (engl. <i>small intestinal bacterial overgrowth</i> )
SN	crna tvar ( <i>substantia nigra</i> )
SOD	superoksid-dismutaza
STZ-icv	intracerebroventrikularna primjena streptozotocina
TBARS	spojevi koji stupaju u reakciju s tiobarbiturnom kiselinom (engl. <i>thiobarbituric acid reactive substances</i> )

TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin
THB	1,2,3-trihidroksibenzen
TIGAR	TP-53 posredovani regulator glikolize i apoptoze (engl. <i>TP-53-induced glycolysis and apoptosis regulator</i> )
TLR4	receptor 4 sličan receptoru Toll (engl. <i>Toll-like receptor 4</i> )
TMAO	trimetilamin-N-oksid (engl. <i>trimethylamine N-oxide</i> )
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (engl. <i>3,3',5,5'-tetramethylbenzidine</i> )
TNB	5-tio-2-nitrobenzojeva kiselina (engl. <i>5-thio-2-nitrobenzoic acid</i> )
TNF- $\alpha$	čimbenik nekroze tumora $\alpha$ (engl. <i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> )
UC	ulcerozni kolitis (engl. <i>ulcerative colitis</i> )
UGP	UTP-glukoza-1-fosfat uridililtransferaza
UV	ultraljubičasto (engl. <i>ultraviolet</i> )
VIP	vazoaktivni intestinalni polipeptid (engl. <i>vasoactive intestinal polypeptide</i> )
VL	duljina crijevnih resica (engl. <i>villus length</i> )
VMAT	vezikularni transporter za monoamine (engl. <i>vesicular monoamine transporter</i> )

# 1 UVOD I SVRHA RADA

## 1.1. Alzheimerova bolest

Alzheimerova bolest (AB) najčešći je tip demencije s još nerazjašnjenom etiologijom. Karakterizira ju progresivna degeneracija neurona praćena razvojem kognitivnog oštećenja i drugih često zanemarenih neuropsihijatrijskih simptoma kao što su apatija, depresija, zbunjenost i promjene u ponašanju (1). Prevalencija bolesti je u porastu, a sve veća srednja dob stanovništva jedan je od najvažnijih čimbenika koji doprinose ovom trendu. U 2011. godini procijenjeno je da oko 24 milijuna ljudi boluje od AB-a (2), a do 2016. godine broj se povećao na preko 40 milijuna (3,4). Neke projekcije pokazuju da bi se do 2050. godine taj broj mogao povećati na oko 100 milijuna. Drugim riječima, projekcije sugeriraju da će 1 od 85 osoba diljem svijeta živjeti s AB-om (3). Prethodno navedena predviđanja posebno su zabrinjavajuća s obzirom na značajan socio-ekonomski teret povezan s AB-om. Prema procjenama iz 2015., svjetski troškovi demencije iznosili su oko 818 milijuna USD-a, a očekivalo se da će dosegnuti 1 trilijun USD-a u 2018. (5).

AB se dijeli na bolest ranog početka (EOAD; engl. *early-onset Alzheimer's disease*) i kasnog početka (LOAD; engl. *late-onset Alzheimer's disease*) ovisno o tome je li dijagnosticirana prije 65. godine života (6). Otprilike 5-10% oboljelih pripada grupi EOAD. Iako se prije vjerovalo da u većine oboljelih od EOAD-a bolest nastaje kao posljedica jasne genetske predispozicije, nedavni dokazi upućuju na složeniju temeljnu biologiju jer je pozitivna obiteljska anamneza bila prisutna u samo 60% bolesnika, a autosomna dominantno nasljeđe potvrđeno je u samo 13% tih obitelji (7). Trenutačno se vjeruje da je potpuno penetrantno autosomno dominantno nasljeđe, prepoznato kao mendeljski podtip EOAD-a, uzrok razvoja bolesti u samo 0,5-1% svih slučajeva AB-a (6). U tim slučajevima, mutacije u genima za amiloidni prekursor protein (APP; engl. *amyloid precursor protein*), presenilin-1 (PS1) ili presenilin-2 (PS2) smatraju se ključnim etiopatogenetskim čimbenicima. Nasuprot tome, genetski krajobrazi nemendelskih EOAD-a i LOAD-a ostaju mnogo manje jasni i karakterizirani su složenom poligenomskom patofiziologijom i nekonzistentnim obrascima nasljeđivanja. Uzevši u obzir sve navedene činjenice, jasno je da je etiopatogenetska pozadina značajnog udjela slučajeva (~99%) trenutno nepoznata.

Danas, više od jednog stoljeća nakon otkrića bolesti (8), AB još uvijek predstavlja kronično stanje bez lijeka ili učinkovitih intervencija za odgađanje napredovanja patofizioloških



promjena i simptoma (9). Trenutačni medicinski pristupi AB-u ograničeni su na simptomatske intervencije, a složenost bolesti rezultirala je frustrirajućim ponavljanim neuspjehom mogućih terapija za AB u kliničkim istraživanjima (10). Farmakologija AB-a ograničena je na inhibitore kolinesteraze (rivastigmin, galantamin i donepezil) i memantin, koji je antagonist glutamatergičkih N-metil-D-aspartat (NMDA; engl. *N-methyl-D-aspartate*) receptora. Ovi tretmani ne mogu spriječiti ili poništiti napredovanje bolesti i često su praćeni brojnim nuspojavama, ali u kliničkim istraživanjima pokazuju blagotvorne učinke na izvršnu funkciju i kogniciju u usporedbi s placebom tijekom kronične terapije (11–13). Osim toga, simptomatsko poboljšanje kognitivnih sposobnosti povezano je sa smanjenjem opterećenja postojećim te smanjenom pojavom novih neuropsihijatrijskih simptoma što doprinosi očuvanju kvalitete života pacijenata (i njihovih obitelji) (14–16). U razvoju je i nova generacija inhibitora kolinesteraze (npr. CPC-201) koji bi trebali ostvarivati slične simptomatske blagotvorne učinke na kogniciju uz manje nuspojava (17). Trenutno su u tijeku klinička ispitivanja za nekoliko novih lijekova koji bi mogli ostvariti simptomatsko poboljšanje kognitivnih funkcija u oboljelih od AB-a (18). Oligomanat (GV-971) je nedavno odobren za liječenje AB-a u Kini od strane kineske regulatorne agencije za lijekove na temelju obećavajućih rezultata iz kliničkih pokusa u kojima je 9 mjeseci tretmana poboljšalo kognitivne sposobnosti bolesnika. Mehanizam djelovanja oligomanata je modulacija crijevnog mikrobioma uz smanjenje sustavne i neuro-upale, a trenutno je u tijeku globalna multicentrična studija faze 3 koja procjenjuje učinkovitost oligomanata (19). Antagonisti 5-HT<sub>6</sub> (intepirdin, idalopirdin i masuperdin) trenutno su u fazi 3 kliničkih ispitivanja, ali nažalost niti jedan se lijek iz ove skupine još nije pokazao superiornim u usporedbi s placebom u kontekstu liječenja kognitivnih deficita (iako su ostvareni neki sekundarni bihevioralni benefiti (npr. smanjenje agitacije))(20). Nikotinski agonisti pokazali su obećavajuće učinke u ranoj fazi ispitivanja, ali u većim studijama zasad nisu opaženi naglašeni blagotvorni učinci. Nikotinski transdermalni naljepci trenutno su u fazi 3 ispitivanja (18,21). Lijekovi koji ostvaruju učinak putem modulacije dopaminergičkog sustava pokazali su neke blagotvorne učinke u malim kliničkim ispitivanjima. Primjerice, rotigotin, dopaminergički agonist odobren za liječenje Parkinsonove bolesti (PB), pokazao je pozitivne učinke na izvršne funkcije u AB-u u fazi 2 (22), a rasagilin, inhibitor oksidaze monoamina odobren za liječenje motoričkih simptoma PB-a, nije popravio kognitivnu funkciju, ali poboljšao je metabolizam glukoze, izvršne funkcije i kvalitetu života u AB-u (23). Niz drugih lijekova (npr. inhibitori fosfodiesteraze, muskarinski modulatori poput MK-7622, antagonisti glukokortikoida poput antagonista 11-β-hidroksisteroid dehidrogenaze) nažalost nije pokazao zadovoljavajuće rezultate u nedavnim kliničkim ispitivanjima (18). Zbog

specifične neurobiološke podloge, standardna simptomatska terapija ponekad nije optimalna za kontrolu nekognitivnih simptoma AB-a te su u tijeku klinička ispitivanja s kandidatima za liječenje neuropsihijatrijskih i drugih simptoma bolesti. Primjerice, trenutno je u kliničkim ispitivanjima 8 lijekova kandidata za smanjenje simptoma agitacije u AB-u poput brekspiprazola, koji je pokazao pozitivne učinke u preliminalnim istraživanjima (24), kombinacije dekstrometorfana i kvinidina (25), te sintetičkog kanabinoida nabilona (26). Za psihozu u AB-u trenutno nema odobrenih lijekova, ali pimavanserin je pokazao obećavajuće učinke u fazi 2 (27). Metilfenidat se pokazao kao moguća učinkovita terapija za apatiju koja se smatra najčešćom manifestacijom svih demencija (uključujući i AB) (28–30). Nekoliko lijekova pokazali su se kao potencijalna učinkovita terapija za simptomatsko liječenje poremećaja spavanja i budnosti koji su značajan i prevalentan problem u AB-u sa stajališta patofiziologije i kvalitete života oboljelih (18,31,32). Suvoreksant, dualni oreksinski antagonist, pokazao se učinkovitim za smanjenje nesanice u AB-u (33), a trenutno se istražuju i lemboreksant, zopiklon i zolpidem (34,35).

Nažalost, niti jedan novi lijek nije odobren za liječenje AB-a od 2003. godine (36), uz izuzetak nedavnog uvjetnog i kontroverznog odobrenja aducanumaba, humanog monoklonskog imunoglobulin gama 1 protutijela usmjerenog na agregiranu topivu i netopivu frakciju amiloida  $\beta$  ( $A\beta$ ) za modifikaciju tijeka bolesti (37–43). Obećavajući prvi klinički rezultati doveli su do nedavnog odobrenja još jednog lijeka (lecanemaba) s potencijalom modifikacije tijeka bolesti (44,45).

Iako etiopatogeneza AB-a još nije razjašnjena, tijekom godina predložene su brojne hipoteze koje objašnjavaju nastanak i progresiju bolesti te pružaju temelje za razumijevanje patofizioloških procesa i razvoj lijekova. Najpoznatija i najviše istražena hipoteza AB-a je hipoteza amiloidne kaskade koju su izvorno predložili Hardy i suradnici na temelju rezultata koji su pokazali da mutacija gena  $A\beta$ PP može dovesti do nastanka AB-a (46–50). Amiloidna hipoteza predlaže da akutna noksa (npr. traumatska ozljeda glave) pokreće patofiziološku kaskadu koja za posljedicu ima promjenu metabolizma  $A\beta$ PP-a s povećanim stvaranjem i/ili smanjenim uklanjanjem uz odlaganje u tkivo. Nakupljanje  $A\beta$ -a dovodi do poremećaja unutarstanične homeostaze  $Ca^{2+}$  i poticanja stvaranja neurofibrilarnih snopića što dovodi do smrti stanice (49,51). Međutim, brojna istraživanja pružila su dokaze protiv amiloidne hipoteze pokazujući da prisutnost amiloidnih plakova ne uvjetuje postojanje kognitivnih deficita u starijima osoba niti u osoba s Downovim sindromom (52–60). Osim toga, istraživanja su pokazala da uklanjanje amiloidnih plakova ne sprječava progresiju AB-a, a istraživanja antiamiloidnih

terapeutika zasad su pružila razočaravajuće rezultate (9,61–64). Osim amiloidne hipoteze, predložene su i druge alternativne hipoteze. Jedna od najprominentnijih alternativnih hipoteza AB-a je kolinergička hipoteza koju su izvorno predložili Davies i Maloney 1976. godine, a na temelju koje su razvijeni lijekovi koji se danas koriste za liječenje AB-a (65,66). Brojni dokazi podupiru kolinergičku hipotezu AB-a – antikolinergički lijekovi izazivaju amneziju koju je moguće spriječiti kolinergičkim lijekovima, a analiza tkiva mozga preminulih pacijenata oboljelih od AB-a ukazuje na smanjeni izražaj kolin-acetiltransferaze (ChAT; engl. choline acetyltransferase) koji je zadužen za sintezu acetilkolina te na gubitak neurona u Meynertovoj bazalnoj jezgri koja predstavlja izvor kortikalne kolinergičke inervacije (67–77). Međutim, kolinergički lijekovi djeluju isključivo simptomatski i ne mogu spriječiti nastanak niti progresiju bolesti (78). Druga popularna alternativna hipoteza patogeneze AB-a je tau hipoteza koja u središte patofizioloških zbivanja stavlja strukturu i funkciju proteina tau povezanog s mikrotubulima koji je glavna komponenta neurofibrilarnih snopića (79–84). U hiperfosforiliranom stanju, koje po nekim istraživanjima prethodi neurodegenerativnim promjenama i nakupljanju A $\beta$ -a, narušena je interakcija tau s mikrotubulima što uzrokuje destabilizaciju i gubitak strukture citoskeleta neurona (82,85–90). Neuropatološke promjene proteina tau bolje koreliraju sa stadijem bolesti od amiloidnih plakova što govori u prilog tau hipotezi AB-a (90), međutim farmakološka modulacija tau zasad nije polučila obećavajuće rezultate u kliničkim istraživanjima (91–93). Osim navedenih hipoteza, predložene su i druge hipoteze koje stavljaju različite molekularne i stanične procese u središte patofizioloških zbivanja u AB-u. Primjerice, hipoteza mitohondrijske kaskade govori u prilog poremećaja funkcije mitohondrija kao središnjeg neuropatološkog procesa (94–100), a srodna hipoteza oksidativnog stresa govori u prilog poremećaja stanične redoks homeostaze kao glavnog zbivanja (101–109). Hipoteza neuroupale i poremećaja urođene imunosti govori u prilog nesvrshodne pretjerane aktivacije upalnog odgovora koji pokreće druge neuropatološke procese zbog izostanka rezolucije (110–118), a hipoteza poremećaja homeostaze Ca<sup>2+</sup> pretpostavlja da dugotrajna promjena signalizacije i homeostaze Ca<sup>2+</sup> u neuronima potiče pokretanje svih drugih patofizioloških kaskada (119–127). Naposljetku, hipoteza poremećaja metabolizma i inzulinske rezistencije u mozgu kao mogućeg ključnog patofiziološkog zbivanja u AB-u u posljednje je vrijeme sve više zastupljena u literaturi. Iako su prva zapažanja koja govore u prilog poremećajima kognitivnih funkcija u pacijenata s inzulinskom rezistencijom objavljena 1922. godine (128), prve hipoteze o mogućoj povezanosti AB-a i inzulinske rezistencije (51,129) i prvi rezultati koji neposredno pokazuju poremećaj neuronalne inzulinske signalizacije u AB-u objavljeni su znatno kasnije (130,131). Niz istraživanja potvrdio je

povezanost inzulinske signalizacije s brojnim patofiziološkim procesima povezanima s AB-om, a hipoteza poremećaja inzulinske signalizacije predložena je kao središnja hipoteza koja objedinjuje molekularne mehanizme u središtu drugih hipoteza etiopatogeneze bolesti (51,132). Izuzetno kompleksna neurobiologija AB-a i heterogeni simptomi i molekularni obrasci povezani s nastankom i progresijom bolesti ukazuju na mogućnost da ne postoji jedinstveni biološki mehanizam koji pokreće patofiziološke procese i neurodegeneraciju u svih oboljelih od AB-a već da postoji više endofenotipova bolesti kod kojih sličan neuropatološki proces započinje zbog različitih patoloških okidača, međutim, istraživanja endofenotipova AB-a tek su u povojima (133–138).

## 1.2. Parkinsonova bolest

PB druga je najčešća neurodegenerativna bolest za koju je karakteristično propadanje dopaminergičkih neurona supstancije nigre (SN), što uzrokuje gubitak strijatalnog dopamina te unutarstanično nakupljanje agregata  $\alpha$ -sinukleina (139). Uobičajena klinička prezentacija bolesti povezana je s motoričkim simptomima od kojih su najvažniji bradikinezija, tremor, i rigiditet, a u kasnijem stadiju bolesti često se javljaju i diskinezije, disfagija, i posturalna nestabilnost uz česte padove (139). Uz motoričke simptome, vrlo su česti i nemotorički simptomi koji se često javljaju ranije (čak do 20 godina prije pojave prvih motoričkih simptoma). Najčešći i najizraženiji nemotorički simptomi PB-a uključuju poremećaje spavanja, umor, depresiju, anksioznost, i anosmiju, a posebno je česta vrlo rana pojava simptoma vezanih uz poremećaj funkcije probavnog sustava poput konstipacije (139).

Procjenjuje se da je incidencija PB-a između 5 i 35 osoba na 100 000 godišnje, a procjena ovisi o brojnim čimbenicima, među ostalim i starosti populacije (139). Iako je bolest relativno rijetka prije 50. godine života, incidencija raste između 5 i 10 puta od šestog do devetog desetljeća života (140,141) te zahvaća 2-3 % populacije starije od 65 godina (139). U prvom desetljeću nakon postavljanja dijagnoze, mortalitet nije znatno drugačiji nego u općoj populaciji, međutim, progresijom bolesti dolazi do znatno veće smrtnosti (139). Bez obzira na to, sve veća dostupnost zdravstvenog sustava te porast prevalencije PB-a povezan uz starenje populacije, ali i pravovremenu dijagnostiku bolesti dovodi do procjena da bi se broj pacijenata s dijagnozom PB-a mogao udvostručiti između 2005. i 2030. godine (142). Trend porasta prevalencije bolesti uz znatan broj izgubljenih godina zdravog života (*disability-adjusted life years*) povezan je s daljnjim povećanjem socioekonomskog tereta PB-a (46,142–144).

Kao i AB, PB se dijeli na bolest ranog (EOPD; engl. *early-onset Parkinson's disease*) i kasnog početka (LOPD; engl. *late-onset Parkinson's disease*). Između 4 i 10% oboljelih od PB-a ima EOPB, za koji je karakterističan nastup prvih simptoma između 20. i 40. godine života (145). Slično kao i kod AB-a, većina oboljelih od EOPD-a ima člana obitelji s dijagnozom PB-a (146) i/ili genetsku etiologiju povezanu s mutacijom gena *SNCA*, *PRKN*, *PARK7*, *PINK1*, *LRRK2* ili *GBA*, koje su sve prepoznate kao mogući uzroci obiteljskog (nasljednog) tipa bolesti (147–153). Međutim, ne treba zanemariti učinak izloženosti okolišnim štetnim i zaštitnim čimbenicima koji može objasniti dio etiologije PB-a u obiteljima u kojima više članova ima dijagnozu PB-a. Primjerice, dobro je poznato da pojedini neurotoksični pesticidi povećavaju

rizik za razvoj bolesti (te se iz tog razloga koriste za modeliranje bolesti u eksperimentalnih životinja), a izloženost pesticidima (zbog posla ili blizine poljoprivrednih površina) često može biti rizični čimbenik za čitavu obitelj (154). Osim toga, poznato je da traumatska ozljeda glave može povećati rizik za razvoj bolesti, dok je on nešto manji u pušača i osoba koje konzumiraju kavu, međutim, navedeni čimbenici češće su vezani uz pojedinca nego uz obitelj (154). Većina oboljelih od PB-a (~85%) (155) boluje od sporadičnog (idiopatskog) tipa bolesti bez jasne nasljedne komponente s visokom penetracijom i obično s prvim simptomima iza 60. godine života. Etiologija sporadičnog oblika PB-a nerazjašnjena je te se smatra da bolest nastaje kompleksnom interakcijom više genetskih i okolišnih rizičnih čimbenika (139,156,157).

Još nije razvijena učinkovita neuroprotektivna terapija koja mijenja tijek bolesti i sprječava proces neurodegeneracije u PB-u. Kao i kod ostalih neurodegenerativnih bolesti, učinkovita neuroprotektivna terapija trebala bi biti započeta u ranoj fazi bolesti dok je ostatni funkcionalni kapacitet relativno očuvan, što je zbog nerazjašnjene patogeneze PB-a izuzetno zahtjevno, a tijek i prezentacija su heterogeni te ne postoje pouzdani i osjetljivi biomarkeri progresije bolesti (157). Sva dvostruko slijepa, placebom kontrolirana ispitivanja mogućih lijekova za modifikaciju tijeka bolesti su, nažalost, pružila razočaravajuće rezultate (158). Inhibitori monoamino-oksidge, selegilin i rasagilin, bili su kandidati za terapiju s potencijalom mijenjanja tijeka bolesti, međutim, istraživanja su pokazala da je odgoda dostizanja završne točke (potreba za uvođenjem terapije levodopom (L-DOPA)) posredovana blagim simptomatskim antiparkinsoničnim i antidepresivnim djelovanjem lijeka i metabolita (159,160). Trenutno se razvija niz antisinukleinskih terapeutika (monoklonskih protutijela i cjepiva) za koje mnogi smatraju da bi mogli omogućiti mijenjanje tijeka bolesti, međutim, još uvijek ne postoje dokazi da će ovakav tip terapije biti učinkovit i siguran u ljudi (157,160–164). Iako ne postoji terapija koja bi spriječila napredovanje bolesti, dostupan je cijeli niz simptomatskih terapijskih opcija koje značajno poboljšavaju kvalitetu života oboljelih od PB-a. Za liječenje simptoma povezanih s motoričkim sustavom na raspolaganju su levodopa, antikolinergički i antiglutamatergički lijekovi, inhibitori oksidge monoamina i katehol-O-metiltransferaze, dopaminski agonisti, i antagonisti adenozičkih A2 receptora (157). Većini oboljelih potrebna je terapija levodopom u prve 2 godine od pojave motoričkih simptoma, a tretman je uvijek kombiniran s karbidopom ili benzerazidom, inhibitorima dekarboksilaze aromatskih aminokiselina kako bi se spriječila periferna konverzija lijeka. Terapija levodopom vrlo je učinkovita, ali je povezana s nekim nuspojavama koje otežavaju liječenje kod pojedinih pacijenata (npr. mučnina, povraćanje, ortostatska hipotenzija, sedacija, poremećaji spavanja,

halucinacije, diskinezije)(157). Oko 50% oboljelih unutar prve dvije godine terapije osjeti slabljenje učinka, a oko 30% razvije diskinezije, međutim, nema dokaza da odgađanje pravovremene terapije levodopom može odgoditi pojavu diskinezija (157). Terapija inhibitorima oksidaze monoamina ili katehol-O-metiltransferaze ili dodatna terapija dopaminskim agonistima može produžiti odgovor na levodopu te se često u pacijenata uvodi kao dopunska terapija. Antikolinergici poput triheksifenidila i benztropina mogu smanjiti tremor, ali ne umanjuju simptome bradikinezije. Uz navedeno, postoje brojni lijekovi koji mogu biti korisni u liječenju nemotoričkih simptoma koji kod oboljelih mogu često utjecati na kvalitetu života čak i više nego simptomi vezani uz poremećaj motorike (165). Za liječenje nemotoričkih simptoma vezanih uz demenciju najčešće se koriste inhibitori acetilkolinesteraze i memantin. Halucinacije koje mogu biti vezane uz demenciju ili uz lijekove za liječenje motoričkih simptoma često dobro odgovaraju na terapiju atipičnim antipsihoticima poput klozapina ili kvetiapina koji za razliku od tipičnih antipsihotika imaju relativno mali rizik za egzacerbaciju parkinsonizma (157). U slučaju nemogućnosti uvođenja atipičnih antipsihotika, za liječenje halucinacije i deluzija povezanih s PB-om u nekim je zemljama odobren i pimavanserin, nedopaminergički selektivni serotoninergički inverzni agonist s visokim afinitetom za 5-HT<sub>2A</sub> receptor (166). Poremećaji spavanja, ukoliko nisu zadovoljavajuće zbrinuti nefarmakološkim mjerama za higijenu spavanja, mogu se liječiti hipnoticima i sedativima, tricikličkim antidepresivima, mirtazapinom, trazodonom, kvetiapinom, te noćnom dopaminergičkom terapijom, a umor tijekom dana nekad se može simptomatski umanjiti uvođenjem metilfenidata, modafinila ili armodafinila (167). Disautonomija često znatno narušava kvalitetu života, a nerijetko je zahtjevna za simptomatsko liječenje. Postoji nekoliko smjernica za pojedine aspekte disautonomije u PB-u (168). Ortostatska hipotenzija može se liječiti povećanjem unosa soli, fludrokortizonom, midodrinom, ili droksidopom, a kaptopril, nebivolol, klonidin, hidralazin, losartan i flasteri s nitroglicerinom mogu biti korisni za liječenje hipertenzije u uspravnom položaju povezane s neurogenom ortostatskom hipotenzijom (168). Migrabegron i injekcije botulinskog toksina mogu ublažiti simptome disfunkcije mokraćnog mjehura (168). Konstipacija, najčešći simptom vezan uz probavni sustav, ukoliko ne odgovara na nefarmakološke intervencije, olakšava se redom laksativima koji stvaraju masu (npr. psilijum), osmotskim laksativima (npr. Polietilen-glikol), stimulirajućim laksativima (npr. bisakodil), te ukoliko navedeno ne ostvari zadovoljavajuće učinke u terapiju se dodaju i aktivatori kloridnih kanala ili drugi gastrokinetici poput mosaprida (168). Naposljetku, postoji nekoliko kirurških opcija za liječenje simptoma poput duboke mozgovne stimulacije (169–172) i fokusiranog ultrazvuka (173,174).

Iako etiopatogeneza PB-a još nije razjašnjena, postoji nekoliko hipoteza o ključnim patomehanizmima koji su uključeni u nastanak bolesti. Sinukleinska hipoteza PB-a u središte neuropatološkog zbivanja stavlja agregaciju  $\alpha$ -sinukleina (175). Brojna istraživanja pokazala su da uslijed mutacija, pretjeranog izražaja ili oksidativnog stresa,  $\alpha$ -sinuklein postaje toksičan za dopaminergičke neurone te potiče njihovo odumiranje i pokretanje neuroupalnih procesa, a agregirani  $\alpha$ -sinuklein može se širiti iz stanice u stanicu te tako uzrokovati progresiju neuropatoloških promjena (175–182). Po mitohondrijskoj hipotezi PB-a, središnji patofiziološki događaj koji potencira druge neuropatološke procese je mitohondrijska disfunkcija, poglavito smanjena dostupnost kompleksa I mitohondrijskog respiracijskog lanca (183). Mnogi geni mutirani u PB-u (npr. Parkin, PINK1, DJ1) uzrokuju mitohondrijsku disfunkciju, a u životinjskim modelima tretiranim neurotoksinima koji inhibiraju kompleks I (npr. rotenon) dolazi do rekapitulacije fenotipa bolesti (184–188). Neuroupalna hipoteza PB-a objašnjava nastanak i progresiju bolesti upalnim procesima u središnjem živčanom sustavu s aktivacijom mikroglije (189–196), a jedna od hipoteza koja u posljednje vrijeme dobiva sve više pozornosti je Braakova hipoteza patogeneze PB-a koja ukazuje na moguće patološko zbivanje u probavnom sustavu koje se putem vagusa širi prema mozgu gdje pokreće neurodegenerativne procese (197–202).

Kao i kod AB-a, trenutni dokazi govore u prilog postojanja više endofenotipova bolesti, a postoje dokazi koji upućuju na različitu relativnu važnost pojedinih predloženih patomehanizama u određenim podskupinama oboljelih od PB-a. Primjerice, neki dokazi upućuju da u dijela oboljelih bolest pokazuje progresiju od probavnog sustava prema središnjem živčanom sustavu (203,204), a poremećaji spavanja i disautonomija često se javljaju tijekom prodromalne faze bolesti znatno prije pojave prvih motoričkih simptoma pa bi u ovih bolesnika trebalo razmotriti drugačiji pristup dijagnostici i liječenju.



### 1.3. Probavni sustav u Alzheimerovoj i Parkinsonovoj bolesti

Sustavni pregled i meta-analiza Fu i suradnika nedavno je pokazala da postoji poveznica između probavnih simptoma i rizika za razvoj AB-a i PB-a (205). U bolesnika s konstipacijom, proljevom, prekomjernim rastom bakterija u tankom crijevu (SIBO; engl. *small intestinal bacterial overgrowth*), sindromom iritabilnog crijeva (IBS; engl. *irritable bowel syndrome*), upalnim bolestima crijeva (IBD, engl. *inflammatory bowel disease*), te infekcijom bakterijom *H.pylori*, povećan je rizik od razvoja neurodegenerativnih bolesti (205). Zanimljivo, opažena povezanost poremećaja probavnog sustava i rizika za razvoj neurodegenerativnih bolesti pokazuje izraženu geografsku varijabilnost, što bi moglo upućivati na postojanje čimbenika povezanih sa životnim uvjetima, kulturom, genetskom podlogom, osobitostima prehranbenih navika i rasprostranjenosti pojedinih mikroorganizama koji stupaju u interakciju ili čak imaju ulogu posrednika u opaženoj združenosti (205).

Konstipacija je jedan od najčešćih nemotoričkih simptoma PB-a koji se javlja u oko 80% bolesnika, često i do 20 godina prije pojave motoričkog fenotipa bolesti (206–212). Konstipacija je prepoznata i kao rizični faktor za razvoj PB-a. U danskoj populacijskoj studiji uparenih kohorti omjer relativnog rizika za razvoj PB-a u bolesnika s konstipacijom, u usporedbi s uparenim bolesnicima, iznosio je 3.03 (95% interval pouzdanosti: 2,50 – 3,66)(209). Povećanje rizika bilo je očuvano tijekom 11-15 godišnjeg praćenja (podešeni omjer rizika: 3,65; 95% interval pouzdanosti 1,67 – 7,95) te više izraženo u muškaraca nego u žena (podešeni omjer rizika za muškarce: 3,52 (2,67 – 4,64); podešeni omjer rizika za žene: 2,64 (2,02 – 3,44))(209). Sustavni pregled i meta-analiza Adams-Carr i suradnika pokazali su da je u bolesnika s konstipacijom skupni omjer izgleda za razvoj PB-a 2,27 (2,09 – 2,46), dok je procjena rizika za razvoj PB-a ograničena na postojanje konstipacije bar 10 godina prije dijagnoze PB-a dala omjer izgleda od 2,13 (1,78 – 2,56)(210). Nedavna retrospektivna studija Nakase i suradnika pokazala je da postoji povezanost između konstipacije i brzine propadanja kognitivnih funkcija te povećanja volumena dubokih lezija bijele tvari u oboljelih od AB-a i amnestičkog blagog kognitivnog oštećenja (MCI; engl. *mild cognitive impairment*)(213). Analiza prevalencije konstipacije u velikoj presječnoj studiji iz Kine na 11 743 osobe starije od 65 godina pokazala je slične rezultate. Učestalost konstipacije bila je bazalno visoka u navedenoj populaciji (stariji od 65), a multivarijatna logistička regresija pokazala je združenost konstipacije s demencijom i neamnestičkim MCI-om (214). U presječnoj studiji Chena i suradnika, također je opisana povezanost između konstipacije i stupnja demencije, a nakon

multivarijantnog podešavanja prediktor konstipacije bio je unos vode koji je u pacijenata s demencijom obično smanjen (215).

Osim s funkcionalnim poremećajima, neurodegenerativne bolesti povezane su i s bolestima probavnog sustava. Primjerice, u populacijskoj kohorti izdvojenoj iz švedskog nacionalnog registra pacijenata između 2002. i 2014. godine, pacijenti s dijagnozom IBD-a imali su podešeni omjer rizika za razvoj PB-a: 1,3 (1,0 – 1,7) za ulcerozni kolitis (UC; engl. *ulcerative colitis*); 1,1 (0,7 – 1,7) za Crohnovu bolest (CRD; engl. *Crohn's disease*); i 1,7 (0,8 – 3,0) za neklasificirani IBD (216). Međutim, moguće je da je izmjereni rizik posljedica pristranosti praćenja jer su učinci izostali kad je u model uveden broj posjeta liječniku tijekom praćenja (216). U analizi slučajeva i kontrola iz istog registra, pacijenti s dijagnozom IBD-a imali su veću šansu imati postavljenu dijagnozu PB-a u trenutku postavljanje dijagnoze UC-a ili CRD-a s ukupnim omjerom izgleda od 1,4 (1,2 – 1,8) za sve IBD-e, 1,4 (1,1 – 1,9) za UC, te 1,6 (1,1 – 2,3) za CRD (216). Brojne studije govore u prilog povećanom riziku razvoja AB-a u pacijenata koji boluju od IBD-a (217). U danskoj populacijskoj studiji, CRD i UC bili su povezani s većim rizikom za razvoj demencije (218), međutim, opažena združenost mogla bi biti rezultat pristranosti u otkrivanju s obzirom da su pacijenti s IBD-om u češćoj interakciji sa zdravstvenim sustavom. Populacijska kohortna studija iz Južne Koreje također je ukazala na povećani rizik od razvoja neurodegenerativnih poremećaja u ljudi koji boluju od IBD-a (219) što je potvrdila i meta-analiza Szandruk-Bender i suradnika (220). Podešeni omjer rizika (engl. *adjusted hazard ratio*) u oboljelih od IBD-a bio je 1,56 (95% interval pouzdanosti: 1,24 – 1,97) za PB i 1,14 (95% interval pouzdanosti: 1,05 – 1,25) za AB. Analiza baze podataka zdravstvenog osiguranja Taivana također je ukazala na povezanost IBD-a i demencije, posebno AB-u (221). Sveukupna incidencija demencije među bolesnicima s IBD-om iznosila je 5,5% u usporedbi s 1,4% u kontrolnoj skupini (221). Osim toga, u bolesnika s IBD-om, demencija je dijagnosticirana ranije, s 76,24 godine u prosjeku (u usporedbi s 83,45 u kontrolnoj skupini). Omjer rizika za razvoj demencije u bolesnika s IBD-om iznosio je 2,54 (95% interval pouzdanosti: 1,91 – 3,37), a povezanost je bila posebno izražena za AB gdje je omjer rizika iznosio 6,19 (221).

Iako brojni podaci upućuju na povezanost poremećaja probavnog sustava i neurodegenerativnih bolesti (pogotovo PB-a), smjer kauzalnosti još uvijek nije razjašnjen. Drugim riječima, nije jasno povećavaju li supklinički simptomi neurodegeneracije rizik za razvoj poremećaja funkcije probavnog sustava, povećava li poremećaj funkcije crijeva rizik za razvoj neurodegeneracije, postoji li dvosmjerni učinak, ili je pak združenost posredovana

drugim mehanizmom. Nekoliko nedavnih studija pokušalo je testirati smjer kauzalnosti metodama mendelske randomizacije (MR; engl. *Mendelian randomization*). U istraživanju Cui i suradnika pomoću MR-a testirana je uzročna povezanost AB-a i PB-a s IBD-om te je pronađeno da postoji povezanost u smjeru od PB-a do IBD-a, ali ne i od AB-a do IBD-a (222). Li i Wen nisu pronašli dokaze o kauzalnosti između IBD-a i neurodegenerativnih poremećaja korištenjem MR-a (223), a neke su studije čak pokazale da bi genetski određeni IBD mogao smanjiti rizik za razvoj AB-a (224). Pojedine studije pronašle su slične oprečne rezultate i za PB. Primjerice, u analizi slučajeva i kontrola iz Medicare baze podataka koju su proveli Camacho-Soto i suradnici dobiveni su rezultati koji ukazuju da postoji negativna povezanost PB-a i IBD-a. U pacijenata s PB-om, omjer izgleda za IBD iznosio je 0,85 (0,80 – 0,91) – 0,83 (0,74 – 0,93) za CRD i 0,88 (0,82 – 0,96) za UC (225). Iako još nije jasan uzrok ovih oprečnih rezultata, pogotovo u kontekstu zajedničkih genetskih rizičnih čimbenika za bolesti crijeva i neurodegeneraciju (npr. kinaza 2 s regijama bogatim leucinom (LRRK2; engl. *leucine-rich repeat kinase 2*) i protein tau povezan s mikrotubulima (MAPT; engl. *microtubule-associated protein tau*)(225,226)), moguće je da je negativna korelacija posredovana zaštitnim učinkom protuupalne i imunosupresivne terapije. Dvosmjerna MR studija koja je testirala uzročno-posljedičnu združenost AB-a i metabolita crijevne mikrobiote povezanih s trimetilamin-N-oksidom (TMAO; engl. *trimethylamine N-oxide*) nije pronašla dokaze o kauzalnoj povezanosti crijevnih metabolita i AB-a (227). Međutim, u velikoj MR studiji provedenoj na 18 340 genetskih obilježja crijevnog mikrobioma i 7 824 obilježja za metabolite crijevne mikrobiote pronađene su sugestivne povezanosti između sastavnica mikrobiote *Actinobacteria*, *Lactobacillaceae*, *Faecalibacterium*, *Ruminiclostridium*, i *Lachnoclostridium* i AB-a te između sastavnica mikrobiote *Lentisphaerae*, *Lentisphaeria*, *Oxalobacteraceae*, *Victivallales*, *Bacillales*, *Eubacteriumhalliigroup*, *Anaerostipes*, *Clostridiumsensustricto1* i PB-a (228). Osim toga, pronađena je združenost 12 metabolita crijevne mikrobiote s neurodegenerativnim bolestima u kojoj je glutamin bio povezan s nižim rizikom za razvoj AB-a, a serotonin s nižim rizikom za razvoj PB-a (228).

Naposljetku, postoji mogućnost da združenost poremećaja probavnog sustava i neurodegenerativnih bolesti nije okarakterizirana neposrednom uzročno-posljedičnom vezom. Istraživanje Adewuyi i suradnika pokazalo je da, iako postoji genetsko preklapanje i korelacije između AB-a i gastroezofagealne refluksne bolesti (GERB; engl. *gastroesophageal reflux disease*), bolesti peptičkog vrieda (PUD; engl. *peptic ulcer disease*), gastritisa, duodenitisa, IBS-a i divertikuloze, združenost bi mogla biti posljedica genetskih odrednica koje

predstavljaju rizik za razvoj obje bolesti (229). Analiza signalnih puteva koji predstavljaju zajedničke čimbenike rizika za razvoj poremećaja probavnog sustava i AB-a pokazuju zastupljenost signalnih mehanizama povezanih s metabolizmom lipida, autoimunosti, inhibitorima lipaza, regulacijom apoptoze putem proteina 1 programirane smrti stanice (PD-1; engl. *programmed cell death protein 1*), i učinkom statina (229). Neki su autori pružili slične dokaze i za PB jer postoji nekoliko genetskih lokusa koji predstavljaju čimbenik rizika za razvoj bolesti probavnog sustava i PB-a. Primjerice, dardarin, poznat i kao *LRRK2*, prvotno je prepoznat kao kauzalni gen povezan s razvojem PB-a, međutim, kasnije se ispostavilo da je povezan i s razvojem CRD-a (230).

Jedan od ključnih mehanizama putem kojeg bi bolesti probavnog sustava mogle biti povezane s neurodegenerativnim poremećajima je narušavanje homeostaze crijevnog mikrobioma s obzirom da je crijevna disbioza prisutna u ranom stadiju svih poremećaja probavnog sustava, ali i neurodegenerativnih bolesti (često prije prvih kliničkih simptoma). Homeostaza mikroglije, koja igra ključnu ulogu u kontroli neuroinflamacije i razvoju neurodegenerativnih promjena (231–233), pod trajnom je kontrolom crijevne mikrobiote i njenih metabolita (npr. kratkolančanih masnih kiselina (SCFA; engl. *short chain fatty acids*)), a disbioza dovodi do poremećaja sazrijevanja, diferencijacije, i funkcije mikroglije (234). Upalne bolesti crijeva i neurodegenerativne bolesti povezane su sa smanjenom raznolikosti mikrobiote, smanjenjem zastupljenosti bakterija koje proizvode SCFA i ostvaruju protuupalne učinke te povećanjem prisutnosti bakterija koje potiču upalni odgovor (235,236). Smanjenje broja bakterija koje stvaraju SCFA (npr. *F. prausnitzii* i *Eubacterium rectale*) i povećanje zastupljenosti bakterija koje potiču upalni odgovor (npr. *Escherichia* i *Shigella*) povezano je s perifernom upalom i nakupljanjem A $\beta$ -a u starijih osoba s kognitivnim oštećenjem (237). Još uvijek nisu razjašnjeni svi mehanizmi kojima bi promjene u zastupljenosti pojedinih bakterija mogle utjecati na razvoj neurodegenerativnih patofizioloških procesa. Međutim, poznato je da je propusnost krvno-moždane barijere (BBB; engl. *blood-brain barrier*), koja igra važnu ulogu u nastanku neurodegenerativnih bolesti (238–242), podložna regulaciji putem crijevne mikrobiote (243). Osim toga, mikrobiota utječe i na integritet crijevne barijere koji je ključan za sprječavanje poticanja sustavne upale intraluminalnim toksinima i proupalnim tvarima (244–248), a narušena mikrobiota u AB-u mogla bi omogućiti intraluminalnim proupalnim posrednicima prolazak kroz crijevnju barijeru i BBB te poticanje neuroinflamacije koja pogoduje nastanku i progresiji neurodegenerativnih bolesti (249–258). Osim navedenih promjena, mikrobiota bi u nastanak neurodegenerativnih promjena mogla biti uključena i putem poticanja lučenja,

agregacije, i transporta amiloidogenih proteina poput  $\alpha$ -sinukleina i  $A\beta$ -a u probavnom sustavu. Primjerice, u istraživanju Walkera i suradnika pokazao je da bakterijski proteinski agregati mogu narušiti proteostazu domaćina (259). Osim toga, poznato je da bakterijski amiloidi mogu igrati ulogu u neurodegenerativnim promjenama (260), što je posebno važno u kontekstu nedavnih metagenomskih istraživanja koja su identificirala komponente mikrobiote kao važne čimbenike rizika za razvoj neurodegenerativnih bolesti (261–263).

## 1.4. Životinjski modeli Alzheimerove i Parkinsonove bolesti

Životinjski modeli ključni su za razumijevanje etiopatogeneze i razvoj terapije za sve ljudske bolesti. Bazična i translacijska istraživanja na životinjskim modelima posebno su važna u kontekstu neurodegenerativnih bolesti koje su specifične zbog nejasne etiologije, nedostatka kvalitetnih dijagnostičkih alata zbog čega se u pravilu dijagnosticiraju tek u kasnijoj fazi bolesti, kroničnog i progresivnog razvoja patofizioloških promjena i zahvaćanja pretežito starije populacije uz česte komorbiditete. Osim toga, trenutno odobreni lijekovi koriste se s ciljem simptomatskog liječenja i ne postoji terapija za koju je jasno pokazano da ima potencijal modificirati tijek neurodegeneracije što istraživanja mehanizama nastanka, prevencije i liječenja ovih bolesti na životinjskim modelima čini posebno važnim (264–268). Pojedini segmenti AB-a i PB-a različito su uspješno modelirani u brojnim životinjskih vrsta, od jednostavnih bioloških modela u nematodi *C.elegans* (269–274), do složenijih modela u primata (275–282).

Vjerodostojni životinjski translacijski modeli trebali bi zadovoljiti ključne kriterije valjanosti – valjanost vanjštine (engl. *face validity*), valjanost konstrukta (engl. *construct validity*), i prediktivnu valjanost (engl. *predictive validity*)(Willner, 1986).

Valjanost vanjštine temelji se na fenotipskoj sličnosti modela i bolesti u ljudi. U kontekstu AB-a i PB-a velik broj modela ima zadovoljavajuću valjanost vanjštine jer većina modela pokazuje kognitivne promjene koje često vremeskim tijekom i razvojem nalikuju na kognitivne promjene u bolesnika. Primjerice, istraživanja pokazuju da u oboljelih od AB-a prvo nastupaju promjene u epizodičkom pamćenju, nakon kojeg se razvija poremećaj semantičkog pamćenja, obično u pretkliničkom stadiju. Tijekom stadija blagog kognitivnog oštećenja redom se razvijaju promjene izvršnih funkcija i pažnje, prostornog pamćenja te poteškoće verbalnog prisjećanja i ispad funkcije općih kognitivnih procesa (283,284). U modelima AB-a u glodavaca smatra se da modeliranje propadanja neuralnih puteva u ljudi uključuje poremećaj radnog pamćenja tijekom rane faze kognitivne disfunkcije, te poremećaj asocijativnog pamćenja referentne memorije i memorije prepoznavanja tijekom stadija srednje razvijenih kognitivnih deficita (283,284). U kontekstu bihevioralnih testova u glodavaca, predloženi standardni obrazac koji bi mogao vjerodostojno oponašati razvoj poremećaja pamćenja u bolesnika uključuje pad performansi u prostornom radnom pamćenju procijenjen zadatkom vodenog labirinta nakon čega slijedi slabljenje referentnog pamćenja i asocijativnog učenja

pomoću paradigme promjene labirinta i uvjetovanja straha, te naposljetku ispad pamćenja prepoznavanja (283,284). U modelima PB-a valjanost vanjštine primarno se temelji na ispadima motoričke funkcije (285).

Načelo valjanosti konstrukta, koje se bazira na odražavanju molekularnih i patoloških promjena, zadovoljeno je samo djelomično s obzirom da etiopatogeneza AB-a i PB-a još nije razjašnjena. Primjerice, valjanost konstrukta modela AB-a često se promatra kroz prizmu nakupljanja A $\beta$  plakova i neurofibrilarnih vretena. Međutim, danas je poznato da su patofiziološke promjene u središnjem živčanom sustavu oboljelih od AB-a karakterizirane kompleksnom interakcijom više patofizioloških procesa poput upale (112) i neosjetljivosti na inzulin (51), te da vjerojatno postoji više endofenotipova bolesti (133,286) što zadovoljavanje načela konstrukta čini izuzetno izazovnim.

Prediktivna valjanost zasniva se na ideji da će podražaj koji u valjanom životinjskom modelu polučiti određeni učinak (npr. terapija) isto učiniti i u ljudi. Prediktivnu valjanost modela je najteže ispuniti, ali ona ujedno čini i najvažnije svojstvo životinjskog modela. Nažalost prediktivna valjanost životinjskih modela neurodegenerativnih bolesti, poglavito AB-a, nije zadovoljavajuća što se odražava u velikom broju lijekova koji polučuju obećavajuće rezultate u životinjskim istraživanjima, ali ne pokazuju učinkovitost u kliničkim istraživanjima u bolesnika (9,10,36,63,287–291).

Životinjski modeli PB-a i AB-a u načelu ne zadovoljavaju sve kriterije valjanosti jednako uspješno, međutim, njihova je nezamjenjiva vrijednost u modeliranju pojedinih patofizioloških segmenata bolesti što pruža uvid u etiopatogenezu bolesti i postavlja temelje za razvoj uspješne terapije. Obzirom da je svaki pojedini model okarakteriziran jedinstvenim prednostima i nedostacima, valjanost pristupa (npr. u procesu razvoja terapeutika) u pravilu se temelji na komplementarnom korištenju više životinjskih (i drugih) modela kako bi se osigurala biološka robusnost istraživanih fenomena. Potonje je posebno jasno oslikano u kontekstu korištenja transgeničnih modela neurodegenerativnih bolesti. Primjerice, uzrok AB-a može se objasniti nasljednim mutacijama u APP-u, PS-u 1 i PS-u 2 u svega oko 1% bolesnika, a većina bazičnih i translacijskih istraživanja oslanja se na transgenične modele bolesti s mutacijom navedenih gena. Ovakav pristup, osim što pruža vrlo ograničenu valjanost konstrukta (uz varijabilnu valjanost vanjštine), često omogućava i vrlo ograničenu prediktivnu valjanost što znatno otežava uspješnu identifikaciju mogućih terapeutika. U transgeničnim životinja patološke promjene često nisu ograničene na središnji živčani sustav, a patofiziološki procesi aktivni su

od rođenja životinje što ne odgovara biološkom kontekstu prisutnom u ljudi oboljelih od sporadične AB (292). Ukoliko je vremenskoprostorni aspekt nokse ključan za istraživanje pojedinog biološkog fenomena, važne i komplementarne biološke informacije mogu se dobiti proučavanjem istovjetne nokse u netransgeničnim modelima bolesti.

#### 1.4.1. Životinjski modeli Alzheimerove bolesti

Za istraživanje AB-a razvijeni su brojni životinjski modeli s ciljem rekapitulacije pojedinih patofizioloških procesa uključenih u etiopatogenezu bolesti. Najveći broj istraživanja AB-a provodi se na transgeničnim životinjskim modelima bolesti u kojih su molekularne i fenotipske promjene nalik na AB potaknute modifikacijom gena pomoću ubacivanja (najčešće gena za mutirani protein), izbacivanja, ili kombinacije ovih postupaka. Prvi transgenični modeli AB-a pojavili su se 1990-ih godina s idejom da bi pojačani izražaj APP-a mogao uzrokovati amiloidnu patologiju nalik neuropatološkim promjenama u bolesnika (293,294). Zanimljivo, već vrlo rano, tijekom prvog pokušaja genetičke manipulacije (293), istraživači su uočili da izražaj APP-a ne uzrokuje nužno neuropatološke promjene nalik AB-u u trenutku kad nisu uspjeli ponoviti rezultate histopatološke analize u 12 novih životinja radi čega je originalna studija bila povučena (295). U zadnjih 30-ak godina razvijeni su brojni transgenični modeli AB-a koji različito uspješno odražavaju pojedine segmente patofiziologije AB-a (296). Primjerice, Games i suradnici 1995. godine proizveli su PDAPP mišji model AB-a izražavanjem komplementarne deoksiribonukleinske kiseline (cDNA; engl. *complementary deoxyribonucleic acid*) s intronima APP-a 6-8 uz zamjenu valina 717 fenilalaninom (što odgovara mutaciji u mendelijskom podtipu EOAD-a)(297). U ovom je modelu APP bio izražen pod kontrolom trombocitnog čimbenika rasta  $\beta$  (PDGF  $\beta$ ; engl. *platelet-derived growth factor  $\beta$* ) zbog čega je izražaj APP-a bio ~10 puta viši od uobičajenog izražaja endogenog APP-a (za razliku od prijašnjih modela u kojima je izražaj APP-a pod kontrolom promotora za neuron-specifičnu enolazu bio ~5 puta veći)(298–300). Transgenični PDAPP model AB-a razvija izvanstanične difuzne i neuritičke plakove, distrofiju neurita, i gliozu povezanu s gubitkom sinapsi (297,301), međutim, u istom modelu ne dolazi do razvoja neurofibrilarnih snopića niti do gubitka stanica (296,301–303). Sličan neuropatološki obrazac s izostankom gubitka stanica i razvoja neurofibrilarnih snopića opisan je i u jednom od najbolje istraženih i najkorištenijih transgeničnih modela AB-a – Tg2576 mišjeg modela koji su prvi opisali Hsiao i suradnici 1996. godine (304). U Tg2576 transgeničnom mišjem modelu AB-a cDNA za ljudski APP s



dvostrukom švedskom mutacijom (K670N i M671L) izražena je pod kontrolom promotora za prionski protein hrčka (296). Heterozigotni Tg2576 proizvode ~5,5 puta više APP-a nego što je uobičajeno za endogeni protein te razvijaju difuzne i neuritičke plakove u hipokampusu, korteksu, subikulumu i cerebelumu u starosti od otprilike 10 mjeseci. Osim neuropatoloških promjena, transgenični Tg2576 miševi razvijaju i suptilne poremećaje učenja i pamćenja koji se prvi put mogu uočiti u dobi od 8 mjeseci što je povezano sa sinaptičkim elektrofiziološkim promjenama u hipokampusu (296,304–306). Detaljan pregled transgeničnih modela AB-a, njihovih specifičnosti i vremenskih obrazaca razvoja kognitivnih i neuropatoloških promjena dostupan je u literaturi (296,307–317).

Iako su transgenični modeli vrlo korisni za razjašnjavanje pojedinih bioloških fenomena, postoji nekoliko specifičnosti zbog kojih su ograničene koristi za razjašnjavanje općih patofizioloških principa (primjerice onih povezanih sa sporadičnim oblikom bolesti). Dva najvažnija ograničenja u kontekstu AB-a su slaba prostorna specifičnost izražaja patoloških varijanti gena te slaba vremenska razlučivost u većine životinjskih modela. Primjerice, u nekim transgeničnim modelima AB-a, patološke promjene ne javljaju se samo u središnjem živčanom sustavu već i u drugim organima što otežava razumijevanje doprinosa pojedinih patoloških promjena u mozgu u kontekstu fenotipa. Na primjer, patofiziološke promjene probavnog sustava opisane su u brojnim transgeničnim modelima AB-a poput Tg2576, TgCRND8, 5×FAD, mThy1-hAβPP751, AβPP23, APP/PS1, 3xTg, App<sup>NL-G-F</sup> (318–327). Osim toga, promjene u drugim organima nerijetko se javljaju prije nego promjene u središnjem živčanom sustavu (npr. crijevna dishomeostaza javlja se prije nastanka središnjih neuropatoloških promjena u Tg2576 mišjem modelu AB-a (318)). Obzirom da nije jasno odgovara li navedeni vremenskoprostorni obrazac patofiziološkim promjenama u bolesnika (posebno onih sa sporadičnim oblikom bolesti u kojih nema jasnog potpuno penetrantnog autosomno dominantnog nasljeđivanja), slaba vremenska i prostorna specifičnost mogu ograničiti korištenje transgeničnih modela u kontekstu razumijevanja bolesti u ljudi. Ilustrativan primjer potonjeg je izražena lokomotorna hiperaktivnost u ranoj dobi u životinjskim modelima AB-a do koje dolazi zbog pojačanog izražaja APP-a tijekom razvoja središnjeg živčanog sustava u modelima Tg2576 (328–330), Swedish-APP (331), 3xTg-AD (332,333), Swedish-APP na genetskoj podlozi 129 (334), TgCRND8 (335), APP+PS1 (336), i APP23 (337). Lokomotorna hiperaktivnost vjerojatno nije specifična za vrstu modela s obzirom da je opisana i uslijed pojačanja izražaja APP-a u vinskih mušica (338), a fenomen se čini specifičan za neurorazvojno razdoblje s obzirom da odgađanje izražaja APP-a u inducibilnim transgeničnim modelima ne rezultira razvojem

hiperlokomotornog fenotipa (339). Bez obzira na biološku podlogu opisanog fenomena, njegova pojava jasno ukazuje na problem biološke nespecificnosti obzirom da navedeni hiperlokomotorni fenotip predstavlja ozbiljan problem u testovima ponašanja jer unosi naglašenu sustavnu pogrešku u mjerenja ili čak onemogućava provođenje pojedinih testova (npr. u istraživanju Jankowsky i suradnika nije bilo moguće provesti testove kognicije u modelu AB-a s hiperprodukcijom APP-a)(340).

Uz transgenične modele AB-a, pojedini segmenti etiopatogeneze te učinci lijekova ispituju se i u netransgeničnim modelima bolesti. Netransgenični modeli AB-a opisani su u brojnim životinjskim vrstama. Primjerice, u nekih vrsta pasa opisan je sindrom kognitivne disfunkcije povezan s dobi karakteriziran nekim histopatološkim obilježjima koja nalikuju na AB (npr. kortikalno nakupljanje A $\beta$ -a) što bi moglo pružiti uvid u pojedine patofiziološke procese uključene u razvoj bolesti (341). Međutim, prirodni netransgenični modeli bolesti često vjerno oponašaju samo pojedine aspekte bolesti. Primjerice, u prirodnom modelu AB-a u pojedinih pasa kognitivno propadanje i kortikalno nakupljanje A $\beta$ -a nije povezano s neuritičkim plakovima i nakupljanjem neurofibrilarnih vlakana (341). Vrijedna opažanja opisana su i u drugih životinjskih vrsta. Na primjer, sekvenca peptida A $\beta$ -a istovjetna je u zeca i čovjeka (342), ali u zečjem mozgu ne dolazi do spontanog nakupljanja amiloidnih plakova (341). S druge strane, ukoliko se zečevi hrane dijetom bogatom kolesterolom uz dodatak bakra, dolazi do pojave kortikalnih amiloidnih depozita ta nastanka drugih patognomoničnih neuropatoloških promjena i razvoja kognitivnih deficita (343).

Većina netransgeničnih modela AB-a ne temelji se na prirodnim promjenama uslijed starenja već na patofiziološkim promjenama uzrokovanim kemijskom noksom. Primjerice, opisani su netransgenični inducibilni modeli izazvani intracerebroventrikularnom primjenom streptozotocina (STZ-icv), kolhicina te intracerebroventrikularnom ili intracerebralnom primjenom A $\beta$ -a (344). Osim toga, opisani su i modeli AB-a izazvani sustavnom primjenom kolesterola, aluminija, cinka, D-galaktoze, lipopolisaharida i drugih tvari koje potiču patofiziološke promjene povezane s neurodegeneracijom (344).

#### **1.4.1.1. Netransgenični model sporadične Alzheimerove bolesti izazvan intracerebroventrikularnim streptozotocinom**

Netransgenični kemijski model sporadičnog AB-a uzrokovan središnjom primjenom streptozotocina (STZ-icv) jedan je od najkorištenijih i najbolje istraženih modela ove skupine. Intracerebroventrikularnim streptozotocinom izazvan model sporadičnog AB-a prvi su predložili Hoyer i suradnici (345) i Lacković i Šalković (346) 1990. godine. Streptozotocin je betacitotoksični spoj nitrozoureje koji nakon parenteralne primjene izaziva patofiziološke promjene nalik na šećernu bolest tipa 1 (u visokim dozama)(347) ili šećernu bolest tipa 2 (u niskom dozama uz prehranu bogatu mastima)(348). Nakon intracerebroventrikularne primjene, STZ uzrokuje patofiziološke promjene središnjeg živčanog sustava koje su uključene u nastanak neurodegeneracije poput neuropale, oksidativnog stresa i mitohondrijske disfunkcije (349–354) te potiče razvoj funkcionalnih i neuropatoloških promjena povezanih s AB-om poput kolinergičkog deficita, patološkog nakupljanja A $\beta$ -a, hiperfosforilacije proteina tau i poremećaja metabolizma (355–357). Istovremeno s neuropatološkim i molekularnim promjenama, u STZ-icv modelu razvijaju se funkcionalni poremećaji povezani s narušenom sposobnosti učenja i pamćenja uz druge promjene ponašanja (npr. poremećaj izvršnih funkcija te cirkadijana disritmija) koje nalikuju promjenama opisanima u ljudi oboljelih od AB-a (283). U STZ-icv modelu, opisano je intraneuronalno i izvanstanično patološko nakupljanje A $\beta$ -a, posebno u moždanoj kori i hipokampusu, što bi moglo biti posljedica povećanog izražaja APP-a i proamiloidnog enzima beta-sekretaze 1 (BACE1) te amiloidne angiopatije u ranom stadiju bolesti (352,354,358–360). Dishomeostaza proteina tau najčešće je opisana u kontekstu hiperfosforilacije na epitopima serinu 199/202 i 396, te treoninu 205 u moždanoj kori i hipokampusu od ranog do uznapredovalog stadija bolesti, a opisana je i AT8 imunoreaktivnost koja odgovara ranim neurofibrilarnim promjenama (353,354,358,360–362). Poremećaj kolinergičke transmisije opisan je na razini promjene aktivnosti acetilkolinesteraze, enzima koji razgrađuje acetilkolin (353,363–366). Uz navedene neuropatološke promjene, u STZ-icv modelu opisana je i metabolička disfunkcija središnjeg živčanog sustava. Metabolički poremećaj u mozgu povezan s hipometabolizmom glukoze i neosjetljivošću na inzulin prepoznat je kao jedan od ključnih patofizioloških procesa uključenih u etiopatogenezu AB-a u ljudi (51,132,367–372), a sličan obrazac metaboličke dishomeostaze središnjeg živčanog sustava opisan je uslijed središnje primjene STZ-a te se smatra glavnim patomehanizmom STZ-icv modela (283). Središnja primjena STZ-a uzrokuje regionalno specifično smanjenje aktivnosti enzima uključenih u metabolizam glukoze, smanjenje koncentracije adozin-

trifosfata (ATP, engl. *adenosine triphosphate*) i energije (373,374) što je u skladu s rezultatima *in vivo* slikovnih studija koje pokazuju smanjen metabolizam glukoze u mozgu štakora i majmuna nakon središnje primjene STZ-a (375,376). Poremećena inzulinska signalizacija u mozgu javlja se u sklopu ranog odgovora na središnju primjenu STZ-a što se očituje smanjenim izražajem gena za inzulin i inzulinski receptor, smanjenom fosforilacijom nizvodnih signalizacijskim molekula (poput supstrata 1 inzulinskog receptora i glikogen-sintaza-kinaze 3, čije su izoforme  $\alpha$  i  $\beta$  uključene u regulaciju homeostaze A $\beta$ -a i fosforilacije proteina tau)(358,361,377). Potonje je posebno važno u kontekstu nalaza poremećene inzulinske signalizacije u mozgu bolesnika s dijagnozom AB-a (132,369,371,372) i obećavajućih rezultata terapije antidijabeticima i intranazalnim inzulinom (132,362,378–381). Zaključno, brojni dokazi upućuju da kognitivne, neurokemijske, metaboličke, i strukturalne promjene opisane u STZ-icv štakorskom modelu AB-a odgovaraju promjenama opisanim u bolesnika sa sporadičnim oblikom AB-a (47,66,382–385) te da bi STZ-icv model mogao pružiti uvid u neke od patomehanizama uključenih u nastanak i dinamiku bolesti.

U kontekstu promjena probavnog sustava u AB-u, za razliku od transgeničnih modela bolesti u kojima periferne promjene često prethode neurodegenerativnim promjenama u središnjem živčanom sustavu, netransgenični modeli poput STZ-icv modela omogućavaju bolje razumijevanje eferentnih učinaka promjena u mozgu na strukturu i funkciju probavnog sustava.

#### 1.4.2. Životinjski modeli Parkinsonove bolesti

Kao i kod modela AB-a, životinjski modeli PB-a ugrubo se mogu podijeliti na transgenične i netransgenične modele. Za razliku od istraživanja na životinjskim modelima AB-a gdje su najzastupljenija istraživanja na transgeničnim modelima bolesti, u istraživanju PB-a, netransgenični modeli nešto su zastupljeniji. Obzirom da, kao i kod AB-a, veći broj bolesnika (~85%) boluje od sporadičnog oblika PB-a bez jasne nasljedne komponente s visokom penetracijom (155), netransgenični modeli čine prikladan eksperimentalni sustav za ispitivanje molekularnih mehanizama povezanih s rizikom za nastanak bolesti i progresijom neurodegenerativnih promjena. Kao i kod modela AB-a, u istraživanjima na životinjskim modelima najzastupljenije su studije na štakorima (48%) i miševima (37%), dok su puno rjeđe studije na primatima (10%) i drugim modelima (5%) (386).

Nekoliko ključnih genskih mutacija koje su izvorno identificirane analizom genoma ljudi oboljelih od nasljednog oblika bolesti pružile su temelje za razvoj transgeničnih modela PB-a koji su omogućili razjašnjavanje nekoliko važnih patofizioloških mehanizama uključenih u nastanak bolesti. Prvi gen koji je bio povezan s nasljednim PB-om je *SNCA* – gen koji nosi informaciju za prijepis proteina  $\alpha$ -sinukleina koji je identificiran u agregatima koji sačinjavaju Lewyjeva tjelešca, jedno od glavnih neuropatoloških obilježja PB-a (147,386,387). Transgenični modeli PB-a s promjenom *SNCA* temelje se na rekapitulaciji i) autosomno dominantnih visoko penetrantnih točkastih mutacija A53T, A30P, i E46K, ili ii) duplikaciji ili triplikaciji *SNCA* s dominantnim nasljednim svojstvima (386). Međutim, modeli s točkastim mutacijama ne pokazuju jasne znakove dopaminergičke neurodegeneracije niti motoričke deficite (388), a modeli s pojačanim izražajem  $\alpha$ -sinukleina (npr. model s izražajem humanog *SNCA* pod kontrolom Thy1 promotora) pokazuju neke motoričke simptome, ali bez jasnih neuropatoloških znakova dopaminergičke neurodegeneracije (389). Uz navedene modele koji se temelje na promjeni izražaja *SNCA*, brojna su istraživanja provedena i na transgeničnim modelima PB-a dizajniranim na temelju mutacija, delecije egzona, duplikacije ili triplikacije gena za Parkin, I93M i S18Y mutacije gena *UCH-L1*, G309D mutacije te delecije egzona za protein PINK1, L166P točkaste mutacije *DJ-1*, te G2019S, R1441C/G i drugih mutacija u *LRRK2*, genu za dardarin, uz uspješnu rekapitulaciju pojedinih komponenti fenotipa i patofizioloških promjena (386). Standardni transgenični modeli nisu optimalni za istraživanje uloge pojedinih proteina u patofiziološkim procesima zbog promjena koje nastaju tijekom razvoja transgeničnih organizama u kojih su mutacije prisutne od rođenja, a koje nerijetko

rezultiraju molekularnim i fenotipskim promjenama koje ne odgovaraju sporadičnom obliku bolesti te ponekad potiču kompenzatorne mehanizme koji otežavaju razumijevanje molekularnih promjena u odraslih jedinki. Kako bi se zaobišli navedeni problemi razvijeni su modeli bazirani na promjenama gena pomoću viralnih vektora. Primjerice, prostorno specifična dostava (npr. u SN štakora) humanog *SNCA* gena uspješno je provedena pomoću različitih serotipova virusa povezanih s adenovirusima (AAV, engl. *adeno-associated virus*)(390). Životinje u kojih je AAV-om dostavljen *SNCA* pokazuju različito izražen gubitak dopaminergičkih stanica i motoričke deficite ovisno o tipu virusa i dostavljenom genu koji može nositi informaciju za divlji ili mutirani tip proteina (391–393). Transgenični AAV modeli češće se provode u štakora jer osim lakše dostave u specifičnu anatomsku regiju (zbog veličine mozga) miševi često pokazuju tek slabo izraženu neurodegeneraciju bez jasnih sinukleinskih inkluzija (394).

Kao i kod AB-a, netransgenični modeli PB-a komplementarni su transgeničnim modelima te mogu doprinijeti boljem razumijevanju pojedinih aspekata bolesti. Slično kao i u AB-u, najčešći netransgenični modeli bolesti su neurotoksični modeli koji se baziraju na dostavi tvari koje su selektivno toksične za pojedine dijelove središnjeg živčanog sustava. U kontekstu netransgeničnih neurotoksičnih modela PB-a koriste se tvari koje više ili manje selektivno pogađaju dopaminergički sustav, najčešće 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP; engl. *1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine*), rotenon, parakvat, i 6-hidroksidopamin (6-OHDA; engl. *6-hydroxydopamine*).

Neurotoksin MPTP otkriven je uslijed izazivanja nekoliko slučajeva parkinsonizma nakon što je nastao zbog pogreške u sintezi opioida 1-metil-4-fenil-4-propionpiperidin (MPPP; engl. *1-methyl-4-phenyl-4-propionpiperidine*)(395). Jedna od prednosti MPTP-a je njegova lipofilna priroda što omogućava vrlo brzi prolazak kroz krvno-moždanu barijeru nakon periferne primjene nakon čega ulazi u glijalne stanice gdje pomoću monoamino-oksidge B biva pretvoren u 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridin (MPDP+)(396). Produkt MPDP+ spontano se oksidira u neurotoksični 1-metil-4-fenilpiridin (MPP+) koji se selektivno nakuplja u citoplazmi i mjehurićima s vezikularnim transporterom monoamina u dopaminergičkim stanicama nakon prijenosa transporterom za dopamin (397). Toksični produkt MPP+ u dopaminergičnim neuronima smanjuje stvaranje ATP-a inhibicijom mitohondrijskog kompleksa I i potiče nastanak slobodnih radikala što uzrokuje neuropalu i dovodi do ispada funkcije i smrti stanica (396). MPTP se primarno koristi za modeliranje PB-a u miševa i primata jer su štakori otporni na srednje visoke doze toksina i ne razvijaju naglašene neurodegenerativne promjene, a visoke

doze povezane su s povećanom stopom mortaliteta (398). U miševa i primata, MPTP se može koristiti za izazivanje različitih lezije ovisno o modelu, dozi neurotoksina, i načinu primjene (386,399). Primjerice, akutni tretman velikim dozama MPTP-a izaziva ekstenzivnu dopaminergičku neurodegeneraciju koja može biti korisna za ispitivanje terapijskih pristupa u kasnom stadiju bolesti (397). Akutni tretman MPTP-om u dozi do 20 mg/kg uzrokuje gubitak ~90% strijatalnog dopamina i ~70% dopaminergičkih neurona SN-a, ali ne uzrokuje nastanak agregata  $\alpha$ -sinukleina (397). Suprotno, kronična intraperitonealna primjena MPTP-a uzrokuje odgođenu nigrostrijatalnu neurodegeneraciju uz progresivno nakupljanje  $\alpha$ -sinukleina i neuropalu što može biti pogodno za istraživanje ranih stadija PB-a (400,401). Međutim, iako nakon akutnog tretmana MPTP-om dolazi do razvoja motoričkih deficita, motorička se funkcija popravlja u roku od nekoliko dana (399), a tijekom kroničnog davanja često uopće ne dolazi do pogoršanja motoričkih funkcija (386) što valjanost vanjštine modela čini upitnom.

Neki netransgenični modeli PB-a oslanjaju se na dopaminergičku degeneraciju izazvanu oksidativnim stresom uslijed izlaganja pesticidima rotenonu i parakvatu što se temelji na opažanjima povećanog rizika za razvoj bolesti u populaciji koja je izložena ovim toksičnim spojevima (402–404). Mehanizam kojim ovi neurotoksini uzrokuju dopaminergičku neurodegeneraciju još nije razjašnjen, ali smatra se da rotenon djeluje na kompleks I mitohondrija (slično kao MPP+), dok parakvat ostvaruje toksičnost modulacijom redoks homeostaze stanice (386,405). Za razliku od MPTP-a mehanizam ulaska u stanice isto nije u potpunosti razjašnjen. Primjerice, još uvijek nije jasno kako parakvat prolazi krvno-moždanu barijeru obzirom na visoku polarnost molekule, a istraživanja na štakorima i majmunima govore u prilog vrlo slaboj penetraciji (406,407). Bez obzira na nerazjašnjeni mehanizam transporta i djelovanja, modeli neurotoksičnih pesticida omogućavaju rekapitulaciju nekih molekularnih i fenotipskih obilježja PB-a. Subakutna intraperitonealna primjena rotenona (6-10 dana 3 mg/kg/dan) uzrokuje gubitak polovice dopaminergičkih neurona SN-a i znatno smanjenje količine strijatalnog dopamina što je povezano s razvojem motoričkih simptoma poput bradikinezije, posturalne nestabilnosti, i rigiditeta (408), te nemotoričkih simptoma poput poremećaja spavanja (409). Model kroničnog tretmana parakvatom ne omogućava rekapitulaciju PB-a vjerno kao rotenon. U miševa kronično tretiranih parakvatom dolazi do gubitka dopaminergičkih neurona SN-a, ali ne dolazi do jasno izraženog pada strijatalnog dopamina niti razvoja izraženih motoričkih deficita (386). Međutim, kombinirana primjena više različitih pesticida (što donekle odgovara stvarnim uvjetima) dovodi do gubitka dopaminergičkih stanica, pada koncentracije strijatalnog dopamina te razvoja motoričkih i

nemotoričkih simptoma nalik na PB (410), što govori u prilog valjanosti modela koji se baziraju na izlaganju neurotoksičnim pesticidima za istraživanje pojedinih patofizioloških promjena povezanih s nastankom i progresijom bolesti.

#### **1.4.2.1. Netransgenični model Parkinsonove bolesti izazvan intrastrijatalnim 6-hidroksidopaminom**

Najstariji neurotoksični model PB-a bazira se na primjeni neurotoksina 6-OHDA-a (395). Neurotoksin 6-OHDA izvorno je bio korišten za ciljanu degeneraciju neurona simpatičkog živčanog sustava (411), a ideju središnje primjene s ciljem izazivanja selektivne lezije nigrostrijatalnog dopaminergičkog sustava prvi je predložio Ungerstedt (412). Mehanizam toksičnosti 6-OHDA-a vezan je uz njegovu strukturalnu sličnost s dopaminom i noradrenalinom koja mu omogućava da se nakuplja u dopaminergičkim neuronima. 6-OHDA nastaje endogeno hidroksilacijom metabolita dopamina (397,413), a neki dokazi upućuju da bi stvaranje endogenog toksina moglo biti povezano s nastankom i progresijom PB-a (414,415) što uz uzrokovanje nigrostrijatalne neurodegeneracije doprinosi valjanosti konstrukta modela. Za izazivanje dopaminergičke neurodegeneracije, 6-OHDA mora biti dostavljen u središnji živčani sustav (jer ne prolazi krvno-moždanu barijeru), te uz selektivne inhibitore povratnog unosa noradrenalina kako bi se spriječilo nakupljanje u noradrenergičkim neuronima (413). Nakon nakupljanja u dopaminergičkim neuronima, 6-OHDA inhibira kompleks I mitohondrija (kao MPP<sup>+</sup> i rotenon) te uzrokuje poremećaj redoks homeostaze s nakupljanjem slobodnih radikala i oksidativnim stresom što je moguće spriječiti ili ublažiti antioksidansima, kelatorima željeza te inhibitorima monoamino-oksidge B poput selegilina (395). Kao i kod drugih modela, fenotip i izražaj neurodegenerativnih promjena ovisi o dozi, mjestu primjene te vrsti i dobi životinje. 6-OHDA se najčešće dostavlja u strijatum, medijalni snop prednjeg mozga (MFB, engl. *medial forebrain bundle*), ili u SN. Primjena u SN izaziva naglašenu dopaminergičku neurodegeneraciju tijekom 24 sata uz gubitak ~90% dopamina tijekom nekoliko dana, a dostava 6-OHDA-a u strijatum izaziva sporo progresivne neurodegenerativne promjene koje nastaju tjednima (396,413). Unilateralna primjena toksina dovodi do asimetričnih motoričkih deficita s fenomenom rotacije, međutim ovaj se način primjene koristi češće nego bilateralni jer omogućava korištenje strane bez lezije kao interne kontrole, olakšava procjenu učinaka lijekova te ima znatno manje izraženu afagiju, adipsiju, konvulzije i smrtnost (386,396,416). Za razliku od drugih neurotoksina, 6-OHDA omogućava analizu učinaka



središnje dopaminergičke neurodegeneracije na periferna tkiva jer pripada u skupinu modela s primarnim patološkim ishodištem u središnjem živčanom sustavu (engl. *brain-first models*). Potonje je posebno važno u kontekstu razjašnjavanja mehanizama komunikacije mozga i crijeva u PB-u jer omogućava izolaciju eferentnih učinaka središnje neurodegeneracije na promjene u probavnom sustavu (203,204).

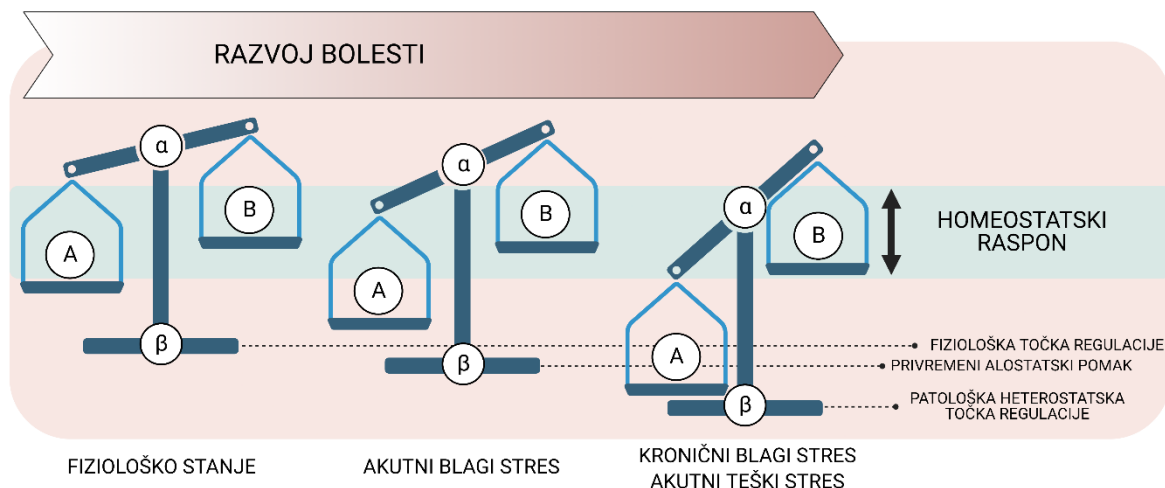
## 1.5.Redoks homeostaza

### 1.5.1. Koncept homeostaze

Koncept homeostaze u modernu je medicinu prvi uveo francuski fiziolog Claude Bernard u 19. stoljeću idejom unutarnjeg okoliša (izvorno: *milieu intérieur*). Claude Bernard radio je na specifičnim nerazriješenim fiziološkim konceptima tog vremena poput uloge jetrenog glikogena u održavanju koncentracije glukoze u plazmi te uloge simpatičkog živčanog sustava u regulaciji protoka krvi. Međutim, njegov dar da pruži strahovito pronicljive generalizacije specifičnih fizioloških zapažanja dovele su do postulata da živa bića posjeduju senzore odgovorne za regulaciju unutarnjeg okoliša te da je ova sposobnost ključna za život koji ne ovisi o vanjskim čimbenicima (417,418). Bernardov rad na konceptu unutrašnjeg okoliša kasnije je proširio američki fiziolog Walter Bradford Cannon koji je uveo pojam homeostaze kako bi opisao samoregulirajući proces pomoću kojeg biološki sustavi održavaju stabilnost prilikom prilagodbe na uvjete vanjskog okoliša (417). Iako je koncept homeostaze jedan od središnjih principa fiziologije, nerijetko je podcijenjen i zanemaren (419), što nažalost rezultira praksom koja dovodi do razvoja neintegrativnih objašnjenja biokemijskih i fizioloških funkcija koja ne samo da rijetko pružaju temelje za bolje razumijevanje fiziologije i patofiziologije ljudskog organizma, već rijetko stvaraju temelje za uspješan razvoj lijekova. Jedan od mogućih razloga zaobilaznja principa homeostaze je činjenica da je koncept često opisan kao sustav mehanizama koji omogućavaju održavanje fiziološkog stalnog stanja (stanja mirovanja) što, ukoliko je shvaćeno doslovno, ne doprinosi razumijevanju funkcioniranja organizma. Posljedično, zanemaruje se važnost priznavanja međusobnog djelovanja složenih dinamičkih kompenzacijskih reakcija koje orkestriraju odgovor organizma na podražaj. Nasuprot tome, Cannon je shvaćao važnost činjenice da je homeostaza prilično dinamičan proces koji samo promjenom održava stabilnost. Na primjer, u svom temeljnom djelu „Organizacija za fiziološku homeostazu“ (engl. „*Organization for physiological homeostasis*“), Cannon citira riječi nobelovca Charlesa Richeta: „Po prividnoj kontradikciji, ono [živo biće] održava svoju stabilnost samo ako je podražljivo i sposobno modificirati se prema vanjskim podražajima i prilagoditi svoj odgovor na podražaj“. Konačno, važnost dinamičke prirode homeostaze odražava se u samom pojmu homeostaze jer je Cannon odlučio koristiti prefiks *homeo* (latinizirano od grčkog *homio* što znači sličan) umjesto *homo* (od grčkog *homos* što znači isto

ili jednako) kako bi naglasio da se homeostaza ne može postići fiksnom i krutom postojanošću (420).

Koncept homeostaze je prepoznat i usvojen od strane značajnog dijela znanstvene zajednice, dajući snažne temelje za daljnji razvoj fiziološke misli. Evolucija koncepta homeostaze je izvan opsega ovog poglavlja, međutim, treba naglasiti doprinose Hansa Selyea i Sterlinga i Eyera jer su dali ključne ideje na čijim temeljima danas počiva koncept redoks homeostaze. Hans Selye, najpoznatiji po redefiniciji teorije stresa, proširio je homeostazu uvođenjem pojma *heterostaze* (*hetero* od grčkog *heteros* što znači drugi ili drugačiji). Kroz ideju heterostaze, Selye je želio naglasiti da prilagodba fiziološkog sustava na neuobičajeno izazovan podražaj može biti popraćena uspostavljanjem novog ravnotežnog stanja promjenom izvornih homeostatskih postavki (417). Sterling i Eyer zadužili su područje uvođenjem koncepta *alostaze* kako bi dodatno naglasili važnost varijacije za održavanje homeostaze koju prvi spominje Cannon (417). Sterling i Eyer predložili su da postoji prirodna promjena između stanja prihvatljivih fizioloških vrijednosti koje su svojstvene sustavu. Nadalje, sugerirali su da postoji vremenska komponenta homeostatske regulacije budući da bi čak i mali pomak unutar fiziološkog raspona, koji bi akutno koristio sustavu, mogao isti dugoročno preopteretiti. Za potonji koncept predložen je termin *alostatsko opterećenje* (417). Shema ključnih principa homeostatske regulacije i njihov odnos sa zdravljem i bolešću prikazana je na slici (Slika 1). Kratki pregled koncepta homeostaze preuzet je i prilagođen iz drugog izvora (109).



**Slika 1. Principi homeostatske regulacije prikazani su na primjeru dva kompleksna (biološka) sustava (A i B) povezana setom predefiniranih (pato)fizioloških odnosa ( $\alpha$  i  $\beta$ ).** Prilagođeno prema (109). Lijevo: podijeljeni „statički“ fiziološki proces/glasnik ( $\beta$ ) definira odnos između dva kompleksna stanična sustava (A i B).  $\alpha$  je pridruženi proces koji omogućava fino podešavanje A i B što održava sustav u homeostatskom rasponu kad je potrebna aktivacija A ili B kao odgovor na podražaj. Sve dok je izazov dovoljno malen ili prolazan, promjena u A ili B ne zahtijeva pomicanje drugog sustava izvan homeostatskog raspona. Sredina: izazovnijim podražajem zahtijeva daljnju prilagodbu i  $\alpha$  i  $\beta$  kako bi se oba sustava održala u homeostatskom rasponu, međutim, kako bi sustav B funkcionirao, sustav A se maksimalno iskorištava. U biološkom sustavu to bi odgovaralo gotovo maksimalnoj aktivaciji ili inhibiciji sustava. Na primjer, B može predstavljati redoks podsustav (npr. redoks par), a A može predstavljati metabolički put koji se mora žrtvovati kako bi redoks sustav nastavio raditi kao odgovor na redoks izazov. Sustav je maksimalno iskorišten i tako može funkcionirati samo prolazno bez ozbiljnijih oštećenja zbog funkcionalnog iskorištavanja nekog od njegovih podsustava. Desno: Ako je podražaj prevelik da bi se akutno razriješio, ili ako ustraje, potrebna je nova heterostatska zadana vrijednost kako bi se osigurala određena zaštita. U ovom scenariju, redoks podsustav (B) održava se u homeostatskom rasponu, a metabolički podsustav A potpuno je žrtvovan (npr. potpuno inaktiviran) prilagodbom  $\alpha$  i  $\beta$ . Kako su za njegovu maksimalnu otpornost potrebne sve stanične funkcije, dugotrajna inhibicija A uzrokovat će akumulirajuću štetu i dovesti do razvoja bolesti. Redoks podsustav i metabolički podsustav korišteni su samo u svrhu demonstracije te redoks sustav može imati ulogu A ili B, pa čak i  $\alpha$  ili  $\beta$ .

### 1.5.2. Redoks homeostaza

Opći koncept homeostaze može se primijeniti na fiziološki redoks sustav – biokemijski sustav koji se sastoji od mreže međusobno povezanih kemijskih reakcija u kojima se mijenjaju oksidacijska stanja atoma. U kemiji, redoks reakcije karakteriziraju prijenos elektrona u kojem jedna kemijska vrsta – „reducirajući agens“ – prolazi kroz oksidaciju (otpušta elektrone) kako bi omogućila redukciju (prihvatanje elektrona) svog redoks para. Iako je korisno za razumijevanje, postoje iznimke od ovog „općeg pravila“ i neke se reakcije odvijaju bez očite izmjene elektrona pa je predloženo da se oksidacija jednostavno definira kao povećanje oksidacijskog stanja. Postoje dodatne prepreke na putu primjene općih teorijskih koncepata redoks kemije na biološki sustav, a najočitija je da se standardni uvjeti, koji se općenito pretpostavljaju u teorijskim proračunima, ne primjenjuju na žive stanice. Nadalje, iako su pojedinačni redoks sustavi međusobno povezani, ne treba zanemariti fenomen redoks kompartmentalizacije budući da su i živa stanica i organizam kao cjelina strukturalno definirani hijerarhijskom segmentacijom koja dijeli organizam/stanicu na mnogo funkcionalno međusobno ovisnih, ali pojedinačnih odjeljaka. Na razini organizma, to je posebno vidljivo tijekom procesa embrionalnog razvoja kada je stroga regulacija redoks prostorno-vremenskih obrazaca uključena u složenu orkestraciju istovremenog razvoja mnogih različitih vrsta stanica i tkiva. Tijekom tog razdoblja, međugra organske i stanične redoks homeostaze pruža važan sloj informacija koji usmjerava pluripotentne stanice prema sinkroniziranom razvoju visoko diferenciranih i specijaliziranih stanica koje će pružiti temelje za evoluciju funkcionalnih organa kod odraslih životinja. Dobar primjer redoks obrasca organizma tijekom razvoja je oksidativni pomak redoks potencijala glutationa (GSH) u ontogenetskim razdobljima zebrića koje karakteriziraju najveći stupnjevi diferencijacije (gastrulacija, organogeneza, faringula). U ovom kontekstu, termin *redoks stres* predložen je za odstupanje fiziološkog redoks statusa uključenog u regulaciju stanične proliferacije, diferencijacije, migracije, polariteta i regulirane smrti što često rezultira razvojem patologije (421). Predloženo je da čak i „zloglasni lijek“ talidomid inducira teratogenezu udova mehanizmom koji uključuje pogrešnu redoks regulaciju jezgrenog čimbenika kapa, pojačivača lakih lanaca aktiviranih B stanica (NFκB, engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)(422). Funkcionalna redoks kompartmentalizacija također je očita na razini pojedinačnih stanica. Neki stanični odjeljci, poput lizosoma i peroksisoma, smatraju se više oksidirajućima, dok drugi, poput jezgre i mitohondrija, pokazuju više redukativnih svojstava (423). Razlika u redoks homeostazi na razini

pojedinih substancijskih odjeljaka nastaje kao posljedica različitih veličina bazena ključnih redoks parova i njihove uključenosti u različite stanične procese koji se izravno ili neizravno oslanjaju na redoks reakcije za ispravno funkcioniranje. Na primjer, citoplazmatske koncentracije nikotinamid-adenin-dinukleotida (NAD) kreću se između 200 i 500  $\mu\text{M}$ , dok se omjer reduciranog i oksidiranog oblika NAD-a održava između 200 i 800. Nasuprot tome, gotovo 2 puta veće koncentracije NAD-a i približno 100 puta niži omjer reduciranog i oksidiranog oblika uočen je u mitohondrijima (424). Razina redoks kompartmentalizacije funkcionalno je važna, a redoks podsustavi održavaju se relativno odvojenima na razini pojedinačnih stanica kako bi se osiguralo da procesi koji zahtijevaju različita redoks okruženja mogu funkcionirati istovremeno. Na primjer, iako se GSH primarno nalazi u citoplazmi, mala količina koja odgovara približno 1% ukupnog staničnog GSH-a nalazi se unutar jezgrenog odjeljaka gdje je GSH uključen u održavanje proteinskih tiola važnih za regulaciju izražaja gena i popravak DNA (424,425). Nadalje, čini se da je jezgrena frakcija GSH-a različito regulirana od citoplazmatske budući da inhibitor sinteze GSH-a butionin-sulfoksimin smanjuje samo citoplazmatsku frakciju, dok jezgrena ostaje netaknuta (426).

Nekoliko problema stoji na putu potpunog razumijevanja biokemijske redoks homeostaze u živom organizmu. Nemogućnost primjene poznatih teorijskih principa vezanih uz redoks na žive stanice jer se stvarni uvjeti bitno razlikuju od teoretski pretpostavljenih te su konceptualni problemi vezani uz razumijevanje prostorno-vremenskih obrazaca redoks signalizacije u iznimno kompliciranom biokemijskom sustavu živog bića samo „vrh ledenog brijega“. Često korištena mjera, redoks potencijal specifičnog redoks para (npr. Nernstova jednačba za reducirani/oksidirani GSH redoks par) vjerno ilustrira potonje. Iako se jednačba može upotrijebiti za opisivanje termodinamike reakcije između oksidirane i reducirane frakcije GSH-a u matematičkim terminima, koncentracija specifičnih reaktanata i produkata odražava biokemijsku redoks homeostazu puno bolje od jednostavnog omjera frakcija. To je tako jer su apsolutne koncentracije i GSH-a i GSSG-a konačni rezultat skupa biokemijskih procesa u koje je GSH uključen (npr. redukcija GSSG-a nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfatom (NADPH; engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*), konjugacija GSH-a na elektrofile, uloga u sintezi i smatanju proteina, stanični transport GSH-a, GSSG-a i konjugata, itd.)(427). Postoje i metodološki izazovi koji stoje na putu razumijevanju redoks homeostaze. Iako su u posljednje vrijeme napravljeni značajni iskoraci na tom području, još uvijek moramo prijeći dug put do razvoja opreme i metoda koje bi nam omogućile da u potpunosti sagledamo regulatornu ulogu redoks signalizacije s obzirom na to da su mnoge molekule uključene u složenu međuovisnu

signalizaciju okarakteriziranu intrinzičnom nestabilnošću i kratkim poluvijekom. Navedeni problem vjerno opisuje rečenica iz rukopisa Buettnera i suradnika: „Da bismo razumjeli kako se kratkotrajne, kvazistabilne vrste, poput superoksida, vodikovog peroksida i dušikovog oksida, povezuju s metabolomom, proteomom, lipidomom i genomom, potrebne su nam apsolutne kvantitativne informacije o svim redoks aktivnim spojevima kao i termodinamičke i kinetičke informacije o njihovim reakcijama, tj. poznavanje kompletnog redoksoma.“(428). Uzimajući u obzir da još uvijek postoje značajna tehnička ograničenja koja se odnose na metodološke alate u praktički svim navedenim relevantnim područjima (npr. ograničenja koja se odnose na ponovljivost identifikacije peptida i dosljednost kvantifikacije u kvantitativnoj proteomici), a kamoli multipleksiranje odnosno združivanje metoda, (npr. različiti zahtjevi za pripremu uzoraka za različite analitičke tehnike), visokoprotočne funkcionalno relevantne tehnike koje bi uhvatile informacije povezane s redoksomom u smislenom patofiziološkom kontekstu tek trebaju biti razvijene.

Unatoč tome, bez obzira na ograničenja postojećih alata, znatna količina znanja o redoks homeostazi koju smo uspjeli prikupiti tijekom godina jasno pokazuje da je ovaj sustav usko povezan s održavanjem funkcije na staničnoj i organskoj razini te da je blisko združen s razvojem većine ljudskih bolesti. Zanimljivo, to je najbolje vidljivo, ne iz nedavnih rezultata generiranih novim metodama zbog tehnološkog napretka, već radije zbog konceptualnih skokova koji su uspjeli pomiriti mnoge naizgled paradoksalne nalaze povezane s principima redoks homeostaze.

Jedan takav uspješan konceptualni skok napravili su Ursini i suradnici koji su vratili kritične koncepte homeostaze, heterostaze i alostaze u kontekst redoks homeostaze zdravlja i bolesti (427). Iako se u početku vjerovalo da su elektrofilni (molekule koje tvore veze sa svojim partnerima u reakciji - nukleofilima, prihvaćajući oba elektrona) isključivo štetni nusprodukti metabolizma, sve više dokaza pokazuje je da su oni zapravo funkcionalne molekule koje djeluju kao glasnici u staničnoj signalizaciji (429–432). Prihvatanje ove nove ideje o elektrofilima koji djeluju kao funkcionalne stanične vrste otvorilo je neka važna pitanja koja su uvelike pridonijela trenutnom razumijevanju redoks homeostaze. Na primjer, ako elektrofilni nisu intrinzično štetni, jesu li nukleofili intrinzično zaštitni? Kako stanica kontrolira proizvodnju i uklanjanje svojih elektrofilnih glasnika, uzimajući u obzir da bijeg elektrofila može biti štetan za stanicu? Koji su glavni signalni mehanizmi uključeni u regulaciju redoks homeostaze? Ako elektrofilni i nukleofilni tonus rade na održavanju ravnoteže stanične redoks homeostaze, kada i zašto dolazi do oksidativnog stresa? I konačno, ako elektrofilni nisu

intrinzično isključivo štetni, koji mehanizmi posreduju zaštitne učinke hormeze – fenomen odgovora na dozu karakteriziranog stimulacijom zaštitnog adaptivnog odgovora malom dozom „štetnog“ podražaja (za razliku od inhibicije sustava izazvane visokom dozom podražaja)?

Odgovori na neka od ovih pitanja još se uvijek aktivno traže, a složeno funkcioniranje redoks homeostaze područje je aktivnog i plodonosnog istraživanja jer bi pojašnjenje uloge redoks homeostaze moglo ponuditi nove dijagnostičke i terapijske mogućnosti. Ipak, neki od odgovora već su predloženi.

Suprotno prethodnim uvjerenjima o nužnoj šteti povezanoj s reaktivnim elektrofili, koncept redoks homeostaze zanemaruje intrinzičnu štetnu prirodu staničnih elektrofila i nukleofila. Umjesto toga, oba imaju važnu ulogu u staničnoj signalizaciji i mogu pokretati patofiziološke procese u slučaju njihove prekomjerne i neuravnotežene proizvodnje i/ili uklanjanja. Posljedično, promjena paradigme sada sugerira da je, baš kao što je stabilni pomak redoks homeostaze (ovo bi Selye prepoznao kao redoks heterostazu) prema okolišu s viškom elektrofila i oksidativnim stresom prepoznat kao dio patološkog fenotipa, stabilni pomak prema prekomjernom nakupljanju nukleofila također dio patološke kaskade. Analogno tome, baš kao što pojačan tonus nukleofila ima zaštitne učinke u scenariju prekomjerne proizvodnje elektrofila balansiranjem redoks okoline prema „zlatnoj sredini“, pojačana regulacija elektrofilnog kraka može se smatrati zaštitnim ako tjera stanicu prema fiziološkoj ravnoteži. Nadalje, treba uzeti u obzir i vremensku komponentu, jer, čak i ako je stanica sposobna kompenzirati povećani elektrofilni tonus tijekom izlaganja podražajima koji izravno ili neizravno testiraju redoks homeostazu (npr. ksenobiotici poput hranjivih tvari ili lijekova), trajni izazov može potaknuti prilagodbene procese koji uspostavljaju nove homeostatske postavke za pružanje akutne zaštite nauštrb trajnog narušavanja funkcionalnih kapaciteta (redoks alostatsko opterećenje).

Prethodni teorijski rad usmjeren na patofiziologiju povezanu s oksidativnim stresom pretpostavio je da nakon što se aktiviraju prooksidativni putovi (npr. kao dio kaskade urođenog imuniteta), antioksidativni kapacitet stanice predstavlja glavni obrambeni sustav koji štiti od oksidacije staničnih komponenti. Ipak, ovaj koncept ne uzima u obzir dinamičku prirodu redoks homeostaze. U stvarnosti, trenutni dokazi govore u prilog istodobne regulacije nukleofilnog tonusa finim podešavanjem redoks reostata kako bi se spriječio stabilan pomak u redoks homeostazi koji bi poticao razvoj patofiziološkog okruženja utječući na staničnu signalizaciju (109,427). Novi dokazi odbacuju ideju o postojanju mehanizama nalik



prekidačima za uključivanje i isključivanje, koji reguliraju staničnu redoks ravnotežu i govore u prilog preciznijoj dinamičkoj kontroli redoks reostata u stvarnom vremenu (433).

Početno prepoznavanje uključenosti molekula „povezanih s oksidativnim stresom“ u staničnu signalizaciju motiviralo je potragu za relevantnim biokemijskim mehanizmima koji bi mogli prenijeti informacije povezane s redoksom klasičnim molekularnim glasnicima. Reakcija elektrofila sa specifičnim proteinskim tiolatima trenutno se ističe kao najbolje ispitan mehanizam (429). Elektrofilni derivati mogu nastati u reakcijama kataliziranim enzimima ili putem neenzimskih reakcija posredovanih slobodnim radikalima. Stvaranje elektrofila katalizirano enzimima često se događa u fiziološkim uvjetima, a neenzimski putovi aktiviraju se u oksidativnim uvjetima nakon oksidacije višestruko nezasićenih masnih kiselina izazvane slobodnim radikalima. U fiziološkim uvjetima kontinuirano se proizvodi mala količina mnogih elektrofila kako bi se održao elektrofilni tonus potreban za ravnotežu redoks homeostaze. Čini se da su među ovim elektrofilnim glasnicima najvažniji  $\alpha,\beta$ -nezasićeni aldehidi (npr. malondialdehid (MDA; engl. *malondialdehyde*), 4-hidroksinonenal (HNE), akrolein). Jednom stvoreni, regulacijski elektrofilni konjugiraju se s aminokiselinama u procesu koji ovisi o nukleofilnoj reaktivnosti mete i snazi elektrofilne skupine koja privlači elektrone. Tiolatni cisteini ističu se kao visoko reaktivne nukleofilne mete, iako su uključene i druge aminokiseline (npr. lizin ili histidin)(434). Nadalje, tiolatni ostaci različitih proteina karakterizirani su različitom razinom reaktivnosti koja ovisi o mnoštvu čimbenika (npr. konstanta disocijacije kiselina i sterička ograničenja). S druge strane, različite elektrofile karakteriziraju vlastita svojstva koja utječu na reaktivnost prema biomolekulama kao što je snaga elektrofilne skupine koja privlači elektrone. Primjerice, konstanta brzine drugog reda HNE-a za reakciju s GSH-om je  $\sim 1,3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , približno 1000 puta niža od konstante za peroksinitrit, što ukazuje na mnogo nižu potencijalnu brzinu reakcije GSH-a i HNE-a (429). Treba naglasiti da je gore navedena reakcija ilustrativna, ali vjerojatno ne odražava vjerodostojno ono što se događa *in vivo* gdje na reaktivnost utječe i prisutnost enzima (npr. glutation-S-transferaza), gradijenti koncentracije supstrata, pH itd. Ključno svojstvo elektrofila koje je neophodno za njihovu ulogu u staničnoj signalizaciji je činjenica da oni reverzibilno reagiraju s tiolima, zadovoljavajući zahtjev vremenske rezolucije signalnog mehanizma (429). Nakon što se reakcija dogodi, formirane disulfidne veze služe kao reverzibilni redoks prekidači koji utječu na funkciju staničnih proteina s različitim razinama osjetljivosti na promjene u lokalnom redoks okruženju. Zanimljiv primjer ovog fenomena je metabolički enzim gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza koji ima ulogu pleiotropnog „redoks senzora“ jer

elektrofilima inducirana intramolekularna disulfidna formacija na aktivnom mjestu cisteina reverzibilno inhibira enzim u oksidativnom okruženju kako bi se glikolitički tok preusmjerio u zaštitni oksidativni put pentoza fosfata (435).

Proizvodnja i uklanjanje i elektrofila i nukleofila su strogo regulirani procesi koji pružaju temelje za održavanje redoks homeostaze kroz regulaciju elektrofilnog i nukleofilnog tonusa. U dinamičnoj homeostatskoj ravnoteži, brzo i fino ugađanje elektrofilnih i nukleofilnih tonova omogućuje čvrstu kontrolu redoks okruženja neophodnog za neometano funkcioniranje stanice. U slučaju neproporcionalne aktivacije elektrofilnog ili nukleofilnog kraka, dolazi do heterostatskog redoks pomaka na račun redoks stanične signalizacije osjetljive na okolinu koja tjera stanicu prema patološkom fenotipu. U slučaju da ovu neravnotežu karakterizira višak elektrofila uz nedostatnu neutralizaciju porastom nukleofilnog tonusa, javlja se patofiziološko stanje poznato kao oksidativni stres. Ovaj fenotipski pomak može biti izazvan blagim kontinuiranim štetnim oksidativnim izazovom koji djeluje kao redoks alostatsko opterećenje ili akutnim naglašenim oksidativnim podražajem koji nadjačava sposobnost nukleofilnog tona da se suprotstavi njegovom djelovanju (109,433).

Naposljetku, redoks homeostaza pruža novi kontekst za hormezu, fenomen koji se klasično definira kao dvofazni odgovor na toksin ili stresor koji pokreće povoljan biološki odgovor u niskoj dozi, dok je visoka doza općenito štetna. U redoks biologiji, oksidativni stres se često raspravlja u kontekstu hormeze kao potencijalni hormetički stimulus koji bi mogao koristiti živom organizmu stimulirajući povećanje stanične antioksidativne obrane i mehanizama popravka kad je prisutan u niskoj i tolerabilnoj dozi. Nasuprot tome, u kontekstu redoks homeostaze, čini se da hormeza pruža zaštitu „ponovnim postavljanjem“ redoks heterostatskog pomaka (433). Predloženo je da su blagotvorni učinci brojnih intervencija s pozitivnim utjecajem na zdravlje posredovani hormezom povezanom s redoks homeostazom. Primjerice, predloženo je da tjelesno vježbanje, koje je prepoznato kao važna intervencija za održavanje zdravlja i prevenciju kroničnih nezaraznih bolesti, djeluje kao prooksidativni hormetin (436). Nadalje, za neke se prehrabene fitokemijske spojeve, za koje se prvobitno vjerovalo da djeluju kao kemijski antioksidansi, pokazalo da bi pozitivni biološki učinci mogli biti posredovani prooksidativnim svojstvima hormetskih mehanizama. Jedan primjer je 3,5,4'-trihidroksi-trans-stilben ( resveratrol), polifenol iz crvenog grožđa i drugih biljaka poznat po svojim blagotvornim učincima na zdravlje (437). U kontekstu redoks homeostaze prvenstveno definirane kroz održavanje nukleofilnog tonusa, prehrabeni fitokemijski spojevi mogli bi ostvarivati svoje učinke kompenzacijom redoks homeostaze (povratom redoks heterostaze)

stalnim povratnim očuvanjem nukleofilnog tonusa putem parahormeze što je detaljno opisano u rukopisima Ursinija i Formana i suradnika (427,438).

## 1.6. Inkretinski sustav i neurodegenerativne bolesti

Inkretini, hormoni probavnog sustava koji potenciraju izlučivanje inzulina u odgovoru na promjenu koncentracije cirkulirajuće glukoze nakon obroka, u posljednje vrijeme sve više dobivaju na značaju u kontekstu neurodegenerativnih bolesti. Modulacija lučenja inzulina iz gušterače prva je otkrivena i najbolje istražena fiziološka uloga inkretina, međutim, otkriće inkretinskih receptora u brojnim tkivima poput bubrega, srca, pluća, masnog tkiva, glatkih mišića te pojedinih jezgara središnjeg živčanog sustava, sugerira da je inkretinska signalizacija uključena u brojne fiziološke i patofiziološke procese uz regulaciju homeostaze glukoze u plazmi (439,440). Danas je poznato da inkretini reguliraju lučenje hormona, metabolizam lipida, motilitet crijeva, apetit, tjelesnu masu i funkciju imunskog sustava, a brojni se drugi učinci još uvijek aktivno istražuju. Posebno zanimljivo je djelovanje inkretina u središnjem živčanom sustavu gdje inkretinska signalizacija dovodi do smanjenog lučenja upalnih medijatora, smanjene aktivacije mikroglije i agregacije proteina, povećane otpornosti na pokretanje neuronalne apoptoze, poboljšanja mitohondrijske funkcije, pojačanog izražaja trofičkih čimbenika, te stimulacije neurogeneze (441). Obzirom da se svi navedeni procesi smatraju ključnima u nastanku i progresiji neurodegenerativnih promjena, modulacija inkretinskog sustava mogla bi se pokazati kao plodonosna farmakološka strategija s potencijalom mijenjanja tijeka neurodegenerativnih bolesti poput AB-a i PB-a (442–444). Najviše podataka o potencijalu inkretina u AB-u i PB-u vezano je uz aktivaciju receptora za paptid-1 sličan glukagonu (GLP-1; engl. *glucagon-like peptide 1*), a novija istraživanja pokazuju kako je kombinacijom aktivacije receptora za GLP-1 i inzulintropni polipeptid ovisan o glukozi (GIP; engl. *glucose-dependent insulinotropic polypeptide*) moguće osvariti snažniji neuroprotektivni učinak.

U kontekstu AB-a, aktivacija receptora za GLP-1 smanjuje neuroupalu, fosforilaciju proteina tau i inzulinsku rezistenciju, a popravljajući funkciju sinapsi (444,445). Aktivacija GLP-1 receptora povećava unutarstaničnu koncentraciju drugog glasnika cikličkog adenozin-monofosfata (cAMP; engl. *cyclic adenosine monophosphate*) koji aktivira protein-kinazu A (PKA) koja utječe na mehanizam oslobađanja neurotransmitera u sinaptičku pukotinu, potencira dugoročnu potencijaciju i fosforilaciju vezujućeg proteina elementa odgovora na cAMP (CREB, engl. *cAMP-response element binding protein*), što potiče preživljenje stanica i sinaptičku plastičnost (446,447). Osim toga, PKA aktivira signalne puteve ključne za sintezu i oslobađanje inzulina koji vezanjem na inzulinski receptor potencira neuroprotektivne učinke

(446). Aktivacija GLP-1 receptora otvara kanale za  $\text{Ca}^{2+}$  te povećava njihovu unutarstaničnu koncentraciju što aktivira dodatne signalne mehanizme koji utječu na modulaciju izlučivanja neurotransmitera i druge ključne stanične procese (448). Osim toga, aktivacija pojedinih receptora za GLP-1 (spregnutih s  $\beta\gamma$  podjedinicama G proteina) povećava unutarstaničnu koncentraciju fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat-3-kinaze (PI3K; engl. *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*) koja aktivacijom mitogenima aktiviranih protein-kinaza (MAPK; engl. *mitogen-activated protein kinases*) potiče preživljavanje, obnovu, i diferencijaciju stanica (448,449). U fiziološkim uvjetima, GLP-1 se sintetizira u L stanicama crijeva nakon čega gotovo trenutno biva razgrađen dipeptidilpeptidazom-IV (DPP-IV; engl. *dipeptidyl peptidase-4*) te svega oko 10% izlučenog inkretina dospijeva u sustavnu cirkulaciju (450). Iz navedenog razloga, poluvijek egzogenog GLP-1 je tek oko 1-2 minute te se u većini istraživanja koriste GLP-1 analozi koji su otporni na razgradnju posredovanu enzimom DPP-IV (440). U životinjskim studijama, primjena GLP-1 agonista liraglutida umanjuje neuroupalu i izražaj  $\text{A}\beta$ -a te sprječava gubitak sinapsi i razvoj kognitivnih deficita u APP/PS1 i SAMP8 modelima AB-a (451–453). Neuroprotektivni učinci povezani s poboljšanjem kognicije pokazani su i u 3xTg, 5xFAD, i STZ-icv modelima AB-a (454–457). U STZ-icv štakorskom modelu AB-a, tretman eksendinom 4 tijekom 2 tjedna popravlja deficite prostornog pamćenja i smanjuje hiperfosforilaciju proteina tau smanjenjem aktivnosti glikogen-sintaza-kinaze 3- $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ; engl. *glycogen synthase kinase-3 $\beta$* ) (458). Slični rezultati dobiveni su i u STZ-icv mišjem modelu AB-a gdje je tretman dulaglutidom, dugodjelujućim GLP-1 agonistom, bio povezan s poboljšanim prostornim pamćenjem i modulacijom GSK-a 3 $\beta$  uz smanjenje hiperfosforilacije proteina tau (459). Liraglutid pokazuje neuroprotektivne učinke i u drugih životinjskih vrsta (npr. AB model temeljen na dostavi  $\text{A}\beta$  oligomera u lateralne komore primata) (460). Osim toga, drugi agonisti GLP-1 receptora također pokazuju neuroprotektivne učinke u pretkliničkim istraživanjima što govori da su opisani učinci vezani uz GLP-1 receptor, a ne liraglutid. Primjerice, eksendin-4 smanjuje nakupljanje  $\text{A}\beta$ -a i popravlja kognitivnu funkciju u 5xFAD mišjem modelu AB-a (461), a neuroprotektivne učinke je pokazao i CJC-1131 (462), dugodjelujući GLP-1 agonist s poluvijekom dužim od 10 dana (463). U ovom trenutku ne postoje jasni klinički dokazi koji bi potvrdili neuroprotektivni potencijal GLP-1 agonista u pacijenata oboljelih od AB-a. U kliničkom ispitivanju učinaka liraglutida u 38 pacijenata tijekom 26 tjedana, liraglutid nije smanjio opterećenje amiloidnim plakovima, ali spriječio je smanjenje cerebralnog metabolizma glukoze što bi moglo biti povezano s usporavanjem napredovanja bolesti (464). U drugom malom kliničkom istraživanju na 32 pacijenta, 12 tjedana terapije liraglutidom nije bilo povezano s popravljanim kognitivnih funkcije, ali

tretman je bio povezan s popravljajanjem funkcionalnih biomarkera što bi trebalo provjeriti na većem broju pacijenata (465). U nedavno završenoj kliničkoj studiji (ELAD) ispitan je tretman liraglutidom u AB-u tijekom 12 mjeseci, ali rezultati studije još nisu dostupni (466).

U PB-u, kao i kod AB-a, neuropala, oksidativni stres, i mitohondrijska disfunkcija smatraju se važnim patogenetskim čimbenicima, a sve više je prepoznata i važnost inzulinske signalizacije u mozgu (374,467–469). Primjena GLP-1 agonista eksendina-4 smanjuje neuropalu i gubitak dopaminergičkih neurona u SN-u te popravljaju motoričku funkciju u MPTP modelu PB-a (470,471). Osim toga, liraglutid, liksisenatid i semaglutid smanjuju opterećenje  $\alpha$ -sinukleinom u kroničnom MPTP modelu PB-a (472,473). Neuroprotektivni učinci GLP-1 agonista opisani su i u drugim modelima PB-a. Primjerice, u 6-OHDA modelu, tretman eksendinom-4 bio je povezan sa smanjenjem broja rotacija potaknutih tretmanom amfetaminima te povećanim izražajem tirozin-hidroksilaze i VMAT-2 u neuronima SN-a (474). U studiji Harkavyi i suradnika, tretman eksendinom-4 smanjio je gubitak izvanstaničnog dopamina i povećao izražaj TH u SN-u (475). Rezultati kliničkih istraživanja također su optimistični. U maloj kliničkoj studiji na 45 pacijenata s dijagnozom umjereno izraženog PB-a, eksenatid je ostvario blagotvorne učinke na nekoliko simptoma bolesti, a naknadna istraživanja pokazala su da su neki učinci prisutni i 12 i 24 mjeseca nakon prekida terapije (476,477). Trenutno su u tijeku klinička ispitivanja faze 2 za liksisenatid, liraglutid, i semaglutid za liječenje PB-a (478).

Naposljetku, u životinjskim modelima neurodegenerativnih bolesti opisano je da dualna stimulacija receptora za GLP-1 i GIP ostvaruje još potentniji neuroprotektivni učinak (iako i samo aktivacija GIP receptora ostvaruje blagotvorne učinke) (479,480). U APP/PS1 modelu AB-a, primjena GLP-1/GIP dualnih agonista DA-CH3, DA-CH5, i DA4-JC popravljaju kognitivnu funkciju i smanjuju nakupljanje  $A\beta$ -a (481–483). Slični neuroprotektivni učinci opisani su i u MPTP modelu PB-a. Dualni agonisti DA4-JC i DA-CH5 popravljaju motoričku funkciju, smanjuju nakupljanje  $\alpha$ -sinukleina i neuropalu, i štite dopaminergičke neurone u MPTP modelu (484,485). Dualni agonisti ostvarili su snažnije neuroprotektivne učinke od eksendina i liraglutida (486,487). Osim dualnih agonista, nedavno su opisani i neuroprotektivni učinci trostrukih agonista koji uz receptore za GLP-1 i GIP aktiviraju i receptore za glukagon, međutim, još nije jasno ostvaruju li trostruki agonisti snažnije neuroprotektivne učinke (444,488,489).

## 1.7. Galaktoza

Galaktoza je jednostavni monosaharid koji je prvi opisao Louis Pasteur 1856. godine (490). Strukturalno, galaktoza se od glukoze, najvažnijeg biokemijskog supstrata za proizvodnju energije, razlikuje samo po konfiguraciji hidroksilne skupine vezane na ugljik C4 (491). Međutim, brojni dokazi pokazuju da je ova skromna strukturalna razlika omogućila galaktozi da tijekom evolucije bude izabrana kao biokemijski spoj s važnim biološkim ulogama širom živog svijeta. Važnost galaktoze najbolje opisuju sljedeća zapažanja. Galaktoza, u obliku slobodnog monosaharida, ili vezana za druge molekule (tvoreći oligosaharide, polisaharide, glikoproteine, ili glikolipide) identificirana je u brojnim organizmima, od bakterija i biljaka, do životinja (491). Nadalje, mliječni šećer laktoza, prepoznat kao esencijalna hranjiva tvar za razvoj sisavaca, sastoji se od glukoze i galaktoze, a u rijetkim slučajevima u kojima mlijeko sisavca ne sadrži laktozu (primjerice kod morskih lavova i nekih tobočara), galaktoza je i dalje prisutna, obično u trisaharidnoj formi, te pruža nezamjenjivu eneigetska i strukturalnu podršku za razvoj mozga (492). Iako još nije razjašnjeno zašto je tijekom evolucije baš galaktoza izabrana kao ključni sastojak mliječnog šećera mlijeka sisavaca (pitanje koje neki nazivaju jednom od najvažnijih zagonetki biologije (493)), jedinstvena biokemijska uloga galaktoze daje naslutiti moguće razloge. Snažan uzlet i razvoj glikobiologije posljednjih je godina pružio brojne i nepokolebljive dokaze o važnosti glikozilacije za većinu bioloških funkcija koje poznajemo. Primjerice, razvoj i diferencijacija stanica živčanog sustava, pronalaženje aksonskih putova i razvoja sinapsi ovise o ispravnim obrascima glikozilacije, što jasno ukazuje zašto je ispravna glikozilacija nužan uvjet za razvoj funkcionalnog živčanog sustava (494,495). Galaktoza može biti iskorištena za glikozilaciju putem više različitih biokemijskih putova (496), a za razliku od glukoze i manoze, prisutnost galaktoze omogućava stanicama da očuvaju ispravne glikozilacijske obrasce u slučaju oskudice hranjivih tvari (493). U ovom kontekstu, trenutni dokazi upućuju da bi važnost galaktoze za žive organizme mogla biti povezana s jedinstvenom metaboličkom sudbinom koja omogućava galaktozi da osigura trajnu dostupnost supstrata za glikozilaciju. Na biokemijskoj razini, opisani učinak mogao bi se temeljiti na izbjegavanju regulatornih mehanizama koji skreću metabolizam isključivo prema sustavima za stvaranje energije u uvjetima nedostatne dostupnosti hranjivih tvari. Zanimljivo, više od 160 godina nakon otkrića galaktoze njena fiziološka uloga ostaje nepoznata. Najviše podataka o biološkim učincima galaktoze dolazi iz dva izvora: i) istraživanja fokusirana na razjašnjavanje biološke pozadine galaktozemije, skupine nasljednih poremećaja s narušenom funkcijom

enzima uključenih u metabolizam galaktoze; i ii) istraživanja biološke podloge starenja u životinjskim modelima gdje se kronična parenteralna primjerna galaktoze koristi za izazivanje oksidativnog stresa i patofizioloških promjena nalik na one prisutne tijekom starenja. Međutim, obje skupine istraživanja omogućavaju tek ograničeno razumijevanje bioloških uloga galaktoze te ostaje nepoznato može li se tretman galaktozom iskoristiti: i) kao dodatni izvor energije (497); ii) za obnavljanje glikozilacijskih obrazaca (493); iii) za smanjivanje opterećenja amonijakom i poticanje sinteze aminokiselina (498); bez izazivanja poremećaja redoks homeostaze s dobro poznatim štetnim posljedicama (499).

Patofiziološke promjene povezane s galaktozemijom često se navode kao dokaz štetnih učinaka galaktoze, međutim, brojni dokazi prikupljeni posljednjih desetljeća jasno pokazuju da patofiziološke posljedice galaktozemije nastaju zbog biokemijskog preusmjerenja metabolizma galaktoze, a ne zbog nakupljanja galaktoze koje je posljedica narušenog metabolizma (500). Potonje je jasno odraženo u činjenici da do nakupljanja galaktoze dolazi u svim tipovima galaktozemija, ali klinička prezentacija bolesnika s različitim tipovima bolesti, koje zahvaćaju pojedine enzime uključene u metabolizam galaktoze, znatno se razlikuje (500). Primjerice, narušena funkcija galaktokinaze (GALK; EC 2.7.1.6)(Galaktozemija tipa 2; MIM 230200) povezana je s blagom kliničkom slikom s kataraktom koja je često jedini klinički znak bolesti (501). Suprotno, mutacije galaktoza-1-fosfat-uridililtransferaze (GALT; EC 2.7.7.12)(Galaktozemija tipa 1; MIM 230400), drugog enzima Leloirovog puta, nerijetko su združene sa smrtnim posljedicama (502). Patomehanizam odgovoran za navedene razlike još nije u potpunosti razjašnjen, međutim, prikupljeni dokazi upućuju da je poremećaj ovog neophodnog metaboličkog puta, a ne sama prisutnost galaktoze, posrednik fenotipskog izražaja poremećaja. Nakupljanje galaktoze, galaktitola, i galaktonata opisano je u galaktozemiji tipa 1 i 2, međutim, u osoba koje boluju od galaktozemije tipa 1 nakuplja se i galaktoza-1-fosfat (Gal-1-P) što upućuje da bi ovaj metabolit mogao biti mogući posrednik teškog patofenotipa (500). Iako je mehanizam štetnog djelovanja Gal-1-P-a još uvijek predmet rasprava, neki istraživači predlažu da bi natjecanje Gal-1-P-a s glukoza-1-fosfatom (Glc-1-P) za UTP-glukoza-1-fosfat-uridililtransferazu (UGP; EC 2.7.7.9) moglo dovesti do smanjene dostupnosti UDP-glukoze kao supstrata za UDP-glukoza 4-epimerazu (GALE; EC 5.1.3.2), što bi pak dodatno smanjilo stvaranje UDP-galaktoze onemogućavanjem kompenzatornih mehanizama ključnih za očuvanje obrasca glikozilacije lipida i proteina u stanicama s ispadom funkcije GALT-a (503). Klinička istraživanja učinaka suplementacije bolesnika s galaktozemijom tipa 1 malim dozama galaktoze pružaju dodatne dokaze o kompleksnosti patofiziologije poremećaja



metabolizma galaktoze obzirom da manje rigorozna kontrola unosa galaktoze paradoksalno obnavlja N-glikozilaciju u podgrupi pacijenata što bi moglo biti povezano s popravljanjem kliničke slike (504).

Drugo važno područje istraživanja koje je pružilo razmjerno puno informacija o biološkim učincima galaktoze je istraživanje starenja gdje se kronična parenteralna primjena galaktoze desetljećima koristi za poticanje oksidativnog stresa i degeneracije organizma. Zanimljivo, iako brojne studije koriste model starenja izazvan galaktozom za ispitivanje terapija usmjerenih na starenje i poremećaje povezane sa starenjem (505), istraživanja usmjerena na razjašnjavanje patofizioloških mehanizama odgovornih za štetne učinke kroničnog parenteralnog tretmana galaktozom vrlo su rijetka. Poremećaj redoks homeostaze s oksidativnim stresom predložen je kao glavni mehanizam nastanka patofizioloških promjena povezanih sa starenjem u glodavaca (505), međutim, biološki posrednik učinaka nikad još nije razjašnjen. Dva nedavno objavljena sveobuhvatna pregledna rada na temu galaktozom izazvanih modela starenja (506) i neurodegeneracije (507) predlažu tri glavna mehanizma odgovorna za patofiziološke učinke galaktoze. Jedno moguće objašnjenje galaktozom uzrokovanih oksidativnog stresa je stvaranje alkohola galaktitola u reakciji kataliziranoj enzimom aldehyd-reduktaza (AR; EC 1.1.1.21). Tijekom nastanka galaktitola troše se reduktivni ekvivalenti u obliku NADPH-a, a nakupljeni galaktitol uzrokuje osmotsko opterećenje jer ga stanica ne može dalje metabolizirati (506–509). Valja napomenuti da postoje neslaganja oko nakupljanja galaktitola kao ključnog patofiziološkog događaja koji uzrokuje oksidativni stres jer koncentracija koja se postiže u leći štakora (jednom od tkiva koje pokazuje najizraženije promjene) tijekom prehrane s vrlo visokim sadržajem galaktoze nije dostatna da uzrokuje osmotski stres (508). Drugi važan mehanizam kojim bi galaktoza mogla uzrokovati oksidativni stres je stvaranje Amadorijevih produkata i Schiffovih baza reakcijom galaktoze sa slobodnim aminokiselinskim grupama proteina, lipida, i nukleinskih kiselina čime nastaju krajnji proizvodi uznapredovale glikacije (AGE; engl. *advanced glycation end products*)(506,507). Treći važan predloženi mehanizam pretpostavlja nakupljanje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tijekom oksidacije galaktoze posredovane galaktoza-oksidadom (GO; EC 1.1.3.9)(506,507), a neki istraživači tvrde da je ovo i najvažniji mehanizam te jedini metabolički put galaktoze u kojem nastaju slobodni radikali (510). Zanimljivo, iako se većina istraživača koji rade s galaktozom izazvanim modelima starenja referira na nakupljanje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kao ključni mehanizam koji objašnjava štetne učinke galaktoze (506,507,511–523), navedeno je vrlo malo vjerojatno obzirom da je GO enzim koji je, prema dostupnoj literaturi, izražen isključivo u gljiva (524).

U ovom trenutku postoje brojna neodgovorena pitanja o metabolizmu galaktoze vezana uz učinak doze i vremena te razlike učinaka u kontekstu načina primjene i metaboličkih kapaciteta pojedinih tkiva. Podaci koji pružaju odgovore na navedena pitanja ključni su za razumijevanje fizioloških i patofizioloških implikacija endogene i egzogene galaktoze. Suprotno kognitivnom oštećenju koje nastaje uslijed kronične parenteralne primjene galaktoze zdravim glodavcima (525,526), kronična primjena galaktoze otopljene u vodi za piće oralnim putem sprječava nastanak kognitivnih deficita (497) te popravlja već nastalo kognitivno oštećenje (376) u STZ-icv štakorskom modelu AB-a. U ovom trenutku mehanizam neuroprotektivnih učinaka D-galaktoze još uvijek nije razjašnjen. S jedne strane, u većini istraživanja u kojima je tretman D-galaktozom spriječio nastanak ili ispravio već razvijeno kognitivno oštećenje (npr. (376,497)), tretman D-galaktozom proveden je oralnim putem što govori da bi mjesto djelovanja moglo biti u probavnom sustavu. S druge strane, neka su istraživanja pokazala da oralni tretman D-galaktozom može biti povezan sa štetnim učincima (527), a nekoliko je istraživanja pokazalo zaštitne učinke parenteralne D-galaktoze (528,529), što govori u prilog mehanizmu djelovanja koji nije neposredno vezan uz intraluminalnu prisutnost.



## **2. HIPOTEZA**

U štakorskim modelima sporadične Alzheimerove bolesti i Parkinsonove bolesti povišena je razina oksidativnog stresa i poremećena inkretinska signalizacija u probavnom sustavu, što se može normalizirati primjenom oralne galaktoze.



### **3. CILJEVI RADA**

#### **OPĆI CILJ:**

Ispitati patofiziološke promjene u probavnom sustavu štakora u modelu Alzheimerove i Parkinsonove bolesti.

#### **SPECIFIČNI CILJEVI:**

1. Ispitati učinak intracerebroventrikularne primjene streptozotocina (model Alzheimerove bolesti) i intrastrijatalne primjene 6-hidroksidopamina (model Parkinsonove bolesti) na parametre oksidativnog stresa u probavnom sustavu štakora.
2. Ispitati inkretinski sustav (peptid-1 sličan glukagonu i inzulinotropni polipeptid ovisan o glukozi) u crijevu štakora u modelu Alzheimerove bolesti i Parkinsonove bolesti.
3. Ispitati učinak oralne galaktoze na oksidativni stres i inkretinski sustav u crijevu štakora u modelu Alzheimerove bolesti i Parkinsonove bolesti.



## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Životinje

U svim pokusima korišteni su muški štakori soja Wistar, starosti 3 mjeseca, uzgojeni u licenciranoj nastambi za laboratorijske životinje Zavoda za Farmakologiju na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu (HR-POK-007; Šalata 11, Zagreb).

Svi postupci na laboratorijskim životinjama provedeni su u skladu s nacionalnim i međunarodnim zakonima i propisima (Direktiva 2010/63/EU Europskog Parlamenta i Vijeća o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe; hrvatski Zakon o zaštiti životinja (NN 102/17, 32/19), hrvatski Zakon o provedbi uredbi Europske unije o zaštiti životinja (NN 125/13, 14/14, 92/14, 32/19), Uredba Vijeća (EZ) br. 1099/2009 o zaštiti životinja u trenutku usmrćivanja). Svi postupci odobreni su od strane Ministarstva poljoprivrede (mišljenje Etičkog povjerenstva EP 186/2018; klasifikacijska oznaka: UP/I322-01/18-01/57; ustrojstvena jedinica: 10.1.1.2.; urudžbeni broj: 380-18-4) i Etičkog povjerenstva za dobrobit životinja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (klasa: 641-01/18-04/01; urudžbeni broj: 380-59-10106-18-111/173) u sklopu projekta „Mehanizmi nutrijentom posredovanih učinaka glukagonu sličnog peptida-1 na kognitivne i metaboličke poremećaje u eksperimentalnim modelima neurodegenerativnih bolesti“ financiranog od Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ-IP-2018-01-8938). Autor posjeduje dozvolu za provođenje *in vivo* postupaka na životinjama (B kategorija; broj potvrde: 240.3-19, HR 191/02/P). Tehničko osoblje uključeno u istraživanje također je certificirano za rad s laboratorijskim životinjama.

U nastambi za laboratorijske životinje Zavoda za Farmakologiju štakori su držani u kavezima sa steljom za laboratorijske glodavce - 2 do 3 životinje po kavezu osim u pokusima s dugoročnim davanjem D-galaktoze u kojima je naznačeno da su životinje bile odvojene i boravile same u kavezu kako bi se omogućila primjena pune doze D-galaktoze otopljene u vodi za piće te izbjegao učinak koprofagije na crijevni mikrobiom, s *ad libitum* pristupom vodi i standardiziranoj hrani za laboratorijske glodavce (Mucedola S.R.L., Italija). Stelja je mijenjana dvaput tjedno. Okolišni uvjeti bili su kontrolirani na način da je relativna vlažnost zraka bila između 40 i 60%, sobna temperatura kretala se između 22 i 25 °C, a ciklusi svjetla i tame bili su regulirani automatskim sklopkama te su se izmjenjivali svakih 12 sati s izmjenama u 6 i 18 sati.



**Tablica 1 Broj životinja po skupinama u pokusima provedenim u sklopu istraživanja.**

Pokus	Broj životinja po skupinama	Ukupan broj životinja
Ispitivanje učinka središnje inhibicije GLP-1 receptora	CTR: 10 STZ: 10 CTR + GLPI: 10 STZ + GLPI: 10	40
<i>Ex vivo</i> ispitivanje: i) učinaka D-galaktoze na redoks homeostazu; ii) učinaka ACh na izlučivanje probavne sluzi; iii) biokemijskih svojstava probavne sluzi	CTR: 3 STZ: 3	6
Ispitivanje učinka središnje inhibicije GIP receptora	CTR: 10 STZ: 10 CTR + GIPI: 10 STZ + GIPI: 10	40
Ispitivanje akutnih učinaka oralne D-galaktoze uz središnju inhibiciju GLP-1 receptora	CTR + gal: 10 STZ + gal: 10 CTR + GLPI + gal: 10 STZ + GLPI + gal: 10	40
Ispitivanje redoks homeostaze u probavnom sustavu u štakorskom modelu PB	CTR: 9 CIS: 14 6-OHDA: 14	37
Ispitivanje akutnih učinaka oralne D-galaktoze na redoks homeostazu u crijevu i mozgu	0: 6 30: 6 60: 6 120: 6	24
Ispitivanje učinaka kroničnog oralnog tretmana D-galaktozom na redoks homeostazu i crijevnu mikrobiotu	CTR: 10 STZ: 10 CTR + gal: 10 STZ + gal: 10	40
Ispitivanje učinka kroničnog oralnog tretmana D-galaktozom u štakorskom modelu PB	CTR: 10 CTR + gal: 10 6-OHDA: 20 (stratificirani ovisno o razvijenim motoričkim deficitima) 6-OHDA + gal: 20 (stratificirani ovisno o razvijenim motoričkim deficitima)	60
Ispitivanje učinaka kroničnog oralnog tretmana D-galaktozom na razvoj motoričkih deficita u štakorskom modelu PB u uporenom dizajnu	6-OHDA: 14 6-OHDA + gal: 14	28

## **4.2. Štakorski model sporadične Alzheimerove bolesti izazvan intracerebroventrikularnom primjenom streptozotocina**

Štakorski model sAB-a izazvan je intracerebroventrikularnim injiciranjem otopine streptozotocina 12 tjedana starim mužjacima Wistar štakora postupkom koji je prethodno opisan u literaturi te korišten u istraživanjima naše skupine (283,355,530). Životinje su uvedene u duboku anesteziju intraperitonealnom primjenom ketamina (70 mg/kg; Ketamidol, Richter Pharma, Austrija) u kombinaciji sa ksilazinom (7 mg/kg; Alfasan International, Nizozemska). Anestezirane životinje očišane su te im je načinjen kirurški rez kože glave kako bi se omogućio pristup lubanji. Pomoću električne bušilice velike brzine (Ultimate XL, NSK Europe GmbH, Njemačka), parijetalna kost trepanirana je bilateralno u koordinatama: 1,5 mm kaudalno i 1,5 mm lateralno u odnosu na bregmu s polumjerom otvora od 1 mm po uzoru na postupak koji su originalno opisali Noble i suradnici (531) te koji je dalje korišten u svim pokusima na ovom modelu u laboratoriju istraživačkog tima mentorice. Prethodno izvagani STZ neposredno prije primjene otopljen je u 0.05 M citratnom puferu (pH 4.5) te dostavljen u lateralne komore mozga mikrolitarskom injekcijskom iglom (Hamilton Company, SAD) u koordinatama: 1,5 mm kaudalno, 1,5 mm lateralno i 4 mm ventralno od meke moždane ovojnice u odnosu na bregmu. Otopina je dostavljena u lateralne moždane komore sporim kontroliranim injiciranjem ukupnog volumena od 2 µl po moždanoj komori, a koncentracija STZ-a bila je 1,5 mg/kg. Kontrolne životinje (CTR) bile su podvrgnute istovjetnom postupku, međutim u lateralne je komore dostavljen samo vehikul. Nakon injiciranja koža glave zatvorena je pomoću 2 do 4 kirurška šava te su životinje podvrgnute standardnoj postoperativnoj skrbi. Cijeli je postupak ponavljen nakon 48 sati te je kumulativna doza STZ-icv iznosila 3 mg/kg.

### **4.3. Štakorski model Parkinsonove bolesti izazvan intrastrijatalnom primjenom 6-hidroksidopamina**

Štakorski model PB-a izazvan je intrastrijatalnim injiciranjem otopine 6-OHDA-a 12 tjedana starim mužjacima Wistar štakora postupkom koji je prethodno opisan u literaturi te korišten u istraživanjima naše skupine (532,533). Otopina 6-OHDA-a (4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) pripravljena je neposredno prije injiciranja otapanjem 6-OHDA-a u otopini askorbinske kiseline u sterilnoj fiziološkoj otopini masene koncentracije 0.02%. Životinje su uvedene u duboku anesteziju intraperitonealnom primjenom ketamina (70 mg/kg; Ketamidol, Richter Pharma, Austrija) u kombinaciji s ksilazinom (7 mg/kg; Alfasan International, Nizozemska). Anestezirane životinje očišane su te im je načinjen kirurški rez kože glave. Lubanja je trepanirana pomoću električne bušilice velike brzine (Ultimate XL, NSK Europe GmbH, Njemačka) te je u svaki strijatum injicirano 2  $\mu\text{l}$  prethodno pripravljene otopine 6-OHDA-a u koordinatama 0 mm kaudalno, 2.8 mm lateralno i 7 mm ventralno u odnosu na bregmu i meku moždanu ovojnicu. Koža glave zatvorena je pomoću kirurških šavova te su životinje podvrgnute standardnoj postoperativnoj njezi.

#### **4.4. Inhibicija inkretinskih receptora u središnjem živčanom sustavu primjenom inhibitora inkretinskih receptora u lateralne moždane komore**

U pokusima u kojima je cilj bio razjašnjavanje učinaka akutne inhibicije inkretinske signalizacije u središnjem živčanom sustavu, inhibitori inkretinskih receptora (Tocris, Abingdon, Ujedinjeno Kraljevstvo) dostavljeni su u lateralne moždane po uzoru na postupak koji su opisali Noble i suradnici (4). Inhibicija receptora za GLP-1 ostvarena je intracerebroventrikularnim injiciranjem 2  $\mu$ l otopine exendin-3(9-39)amida (85  $\mu$ g/kg) u sterilnoj fiziološkoj otopini, a inhibicija receptora za GIP ostvarena je intracerebroventrikularnim injiciranjem 2  $\mu$ l otopine [Pro<sup>3</sup>]-GIP (85  $\mu$ g/kg) u sterilnoj fiziološkoj otopini (534–536).

#### **4.5. Akutni tretman oralnom galaktozom**

U pokusima u kojima je cilj bio istražiti akutne učinke oralne D-galaktoze (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, SAD), 1 ml otopine D-galaktoze u vodi za piće (200 mg/kg) dostavljen je u želudac pomoću savitljive cjevčice za orogastričnu dostavu tvari spojene na štrcaljku (doza i način primjene odabrani su na temelju prethodnih istraživanja naše skupine (497,537)). Tijekom postupka dostave otopine u želudac životinje nisu bile podvrgnute anesteziji.

## 4.6. Kronični tretman oralnom galaktozom

U pokusima kojima je cilj bio istražiti kronične učinke oralne D-galaktoze, životinje su bile razdvojene u zasebne kaveze, a D-galaktoza bila je otopljena u vodi za piće dostupnoj *ad libitum* na način da svaka životinja bude izložena dozi koja odgovara 200 mg/kg/dan (doza i način primjene odabrani su na temelju prethodnih istraživanja naše skupine koja su pokazala da kronični tretman oralnom D-galaktozom primijenjenom na isti način u dozi od 200 mg/kg/dan dovodi do kognitivnog poboljšanja u štakorskom modelu sAB-a (497,537)). Ukupni volumen tekućine procijenjen je na temelju praćenja prosječnog unosa za pojedinu životinju (prosječno 20 ml). U prethodnim pokusima u kojima je istražen učinak D-galaktoze otopljene u vodi za piće kroz duži vremenski period (330,497,537) životinje su boravile same u kavezu 16 sati dnevno, a preostalih su 8 sati (između 8 i 16 sati) boravile u kavezima u skupinama od 3 životinje (kako bi se izbjegao učinak socijalne izolacije). U pokusima koji su provedeni u sklopu ove disertacije životinje su boravile same u kavezu tijekom cijelog pokusa obzirom da je jedan od dodatnih ciljeva bio istražiti učinak kroničnog tretmana oralnom D-galaktozom na biokemijske parametre probavnog sustava i fecesa te kvantitativne promjene crijevne mikrobiote koji su osjetljivi na boravak životinja u zajedničkom kavezu zbog koprofagije.

## 4.7. Test rotirajućeg cilindra

Test rotirajućeg cilindra (engl. *rotarod performance test*) (538–540) korišten je s ciljem praćenja razvoja i progresije motoričkih deficita nastalih nakon intrastrijatalne primjene 6-OHDA-a u štakorskom modelu PB-a. Tijekom provedbe ispitivanja, životinja je postavljena na ograđeni rotirajući cilindar promjera 8 cm koji se okreće stalnom brzinom od 13 okretaja u minuti (RPM; engl. *rotations per minute*). Prije samog ispitivanja životinja se kroz nekoliko dana više puta postavlja na rotirajući cilindar kako bi se priviknula na uvjete testiranja. Nakon faze treninga životinja se postavlja na rotirajući cilindar, a ispitivač mjeri vrijeme provedeno na cilindru (nemogućnost hoda brzinom okretanja cilindra dovodi do pada životinje s rotirajuće platforme što označava kraj testa). Ovisno o pojedinom pokusu i parametrima treninga ispitivanje se sastoji od nekoliko ponavljanih mjerenja s graničnim vremenom koje određuje ispitivač s obzirom na to na koji način je potrebno prilagoditi osjetljivost testa. Motorička funkcija procjenjuje se na temelju matematičke analize ponavljanih mjerenja uzimajući u obzir „učinak stropa“ određen graničnim vremenom. U ispravno postavljenom testu kvantifikacije preuranjenog prestanka testa omogućava procjenu težine nastalog motoričkog deficita.

## 4.8. Test prepoznavanja novog objekta

Test prepoznavanja novog objekta (engl. *novel object recognition task*) (541–546) korišten je s ciljem ispitivanja objektnog pamćenja u štakorskom modelu PB-a i AB-a. Prije samog ispitivanja životinje se postavljaju u prostor u kojem će se provesti ispitivanje s ciljem privikavanja na okolišne uvjete. Veličina prostora i osvjetljenje trebaju biti podešeni na način da se potakne istraživačko ponašanje životinja te kako bi se umanjio učinak anksioznosti i neofobije tijekom procjene objektnog pamćenja. Ukoliko je moguće test treba biti postavljen na način da ispitivač ne boravi u prostoriji sa životinjama kako ne bi ometao istraživanje, već prati istraživačko ponašanje putem video kamere. Ukoliko životinje u trenutku provedbe testa borave po 2 ili 3 u kavezu postupak prilagodbe moguće je provesti u obliku grupne prilagodbe gdje se više životinja skupno postavlja u prostor u kojem će biti provedeno ispitivanje kako bi se dodatno umanjio stres izazvan postavljanjem u nepoznati okoliš. Nakon pravilno provedenog postupka prilagodbe životinje se idući dan postavljaju u isti prostor u kojem su na suprotnim stranama postavljena dva identična nepoznata objekta koje životinja istražuje 300 s (u slučaju nedostatnog istraživanja moguće je prilagoditi vrijeme predviđeno za istraživanje za sve životinje jednako). Objekti trebaju biti prethodno ispitani na nezavisnoj skupini životinja u istom prostoru i u istim uvjetima kako bi se odbacilo postojanje sklonosti prema: i) pojedinom objektu (zbog veličine, oblika, ili mirisa); ii) prostoru (u slučaju nejednakog osvjetljenja ili drugog potencijalno neprepoznatog okolišnog faktora). Objekti trebaju biti odabrani na način da životinje prema istima ne pokazuju sklonost i da su približno iste veličine i mase kao životinje (kako ih ispitivane životinje ne bi mogle pomicati niti se na njih popeti). Osim toga, objekti trebaju biti otporni na grickanje i sredstvo za uklanjanje mirisa (primjerice 70% otopina etanola), kojim se prostor i objekti trebaju prebrisati nakon testa za svaku pojedinu životinju. Sat vremena nakon što je završilo istraživanje dva identična objekta, jedan se objekt mijenja novim, različitim, nepoznatim objektom. Razlika novog i poznatog objekta treba biti dovoljna da zdrava životinja lako razaznaje da se radi o novom, dosad nepoznatom objektu, a odabir novog objekta utjecat će na težinu samog testa. Sličniji novi objekti progresivno će otežati prepoznavanje te samim time i težinu testa što može omogućiti ispitivanje suptilnih ispada objektnog pamćenja. Životinja boravi u prostoru s novim i starim objektom 300 sekundi nakon čega je postupak ispitivanja prepoznavanja novog objekta završen. Svi postupci testa upoznavanja prostora i objekata, te postupak ispitivanja prepoznavanja novog objekta snimaju se video kamerom. Životinje se ispituju pomoću stratificirane randomizacije kako bi se



izbjegao učinak redoslijeda ili vremena ispitivanja na konačni rezultat. Postupak stratificirane randomizacije koristi se i za sprječavanje učinka položaja novog objekta u prostoru te odabira novog objekta (prva skupina životinja upoznaje se prvo s dva identična objekta „1“, nakon čega se u jedan kut prostorije za ispitivanje postavlja objekt „2“; druga skupina životinja prvo se upoznaje s dva identična objekta „2“, nakon čega se u jedan kut prostorije za ispitivanje postavlja objekt „1“). Nakon završetka svih ispitivanja, interakcija s objektima tijekom treninga (dva identična objekta) te testa (jedna novi objekt) analizira se i ručno kvantificira pomoću video analize (primjerice EthoVision XT softverom za video analizu, Noldus, Nizozemska) i/ili automatski (primjerice DeepLabCut Phyton paket alata za procjenu poze neoznačenih životinja baziran na prijenosnom učenju temeljenom na dubokim neuronskim mrežama)(547). Ključni ishod testa je udio vremena provedenog u istraživanju novog objekta (korigiran za ukupno vrijeme provedeno u istraživanju oba objekta), a dodatni su ishodi vrijeme istraživanja, postavljanje na zadnje noge (engl. *rearing*) i čišćenje (engl. *grooming*), broj započetih istraživačkih sekvenci, kretanje u prostoru, usmjeravanje pozornosti, te uriniranje i defekacija.

## 4.9. Test društvene sklonosti/interakcije

Test društvene sklonosti/interakcije (engl. *social interaction/social preference test*) (548–552) korišten je s ciljem utvrđivanja poriva za društvenom interakcijom i usamljenosti u životinja koje su boravile u kavezima u socijalnoj izolaciji s ciljem osiguravanja dostave pune doze tretmana (200 mg/kg/dan D-galaktoze otopljene u vodi za piće) te izbjegavanja utjecaja na crijevni mikrobiom heterokoprogijom. Veličina prostora i osvjetljenje trebaju biti podešeni na način da se potakne istraživačko ponašanje životinja kako bi se umanjio učinak anksioznosti i neofobije tijekom procjene sklonosti društvenoj interakciji, a test se provodi u odvojenoj prostoriji pod kontrolom video kamera kako bi se izbjegao utjecaj ispitivača na ishod testa. Životinje su prvo postavljene u prostor ispitivanja u trajanju od 600 s kako bi se naviknule na prostor te kako bi se umanjio učinak neofobije i stresa. Nakon pravilno provedenog postupka prilagodbe životinje se idući dan postavljaju u isti prostor u kojem su na suprotnim stranama postavljena dva identična mala kaveza od kojih je u jedan postavljan ispitivanoj životinji nepoznati štakor (koji nije uključen u pokus). Istraživanje prostora i kaveza te interakcija s nepoznatom životinjom kroz rešetke kaveza snimaju se video kamerom tijekom 300 s. Video se naknadno analizira pomoću softvera za video analizu EthoVision XT (Noldus, Nizozemska). Ključni ishod testa je vrijeme provedeno u socijalnoj interakciji korigirano za vrijeme provedeno u interakciji s oba istovjetna kaveza (s ciljem kontroliranja za istraživačko ponašanje neusmjereno na nepoznatu životinju), a dodatni ishodi su ukupno vrijeme istraživanja, postavljanje na zadnje noge i čišćenje, broj započelih istraživačkih sekvenci, kretanje u prostoru, tigmotaksija, usmjeravanje pozornosti, te uriniranje i defekacija.

#### **4.10. Prikupljanje i pohrana fecesa tijekom *in vivo* pokusa**

Tijekom pokusa u kojima je korišten kronični tretman D-galaktozom otopljenom u vodi za piće u više je vremenskih točaka prikupljen feces životinja s ciljem provedbe biokemijskih analiza sastavnica redoks homeostaze te analize kratkolančanih masnih kiselina, masnih kiselina razgranatog lanca, i crijevnog mikrobioma. Tijekom pokusa feces je prikupljen pomoću metode sterilnog kaveza. Štakorski su kavezi sterilizirani pomoću uređaja za sterilizaciju. Sterilizirani kavezi ohlađeni su na sobnu temperaturu te su životinje postavljene u svojim kavezima u neposrednoj blizini sterilnog kaveza. U trenutku defekacije štakor je postavljen na rub sterilnog kaveza kako bi se ubrzao postupak defekacije na račun kontrakcije mišića tijela s ciljem održavanja ravnoteže te kako bi se smanjila vjerojatnost doticanja fecesa. Uzorke fecesa koje je štakor dotaknuo ili koji su bili u kontaktu s bilo kojom podlogom koja nije podloga neposredno steriliziranog kaveza bili su odbačeni. Uzorak fecesa s poda sterilnog kaveza prenesen je u odgovarajući spremnik pomoću jednokratne čačkalice te je pohranjen na -80 °C do daljnje analize. Sterilno prikupljeni uzorci fecesa korišteni su za analizu kratkolančanih masnih kiselina te crijevnog mikrobioma.

Biokemijske i morfometrijske analize provedene su na uzorcima fecesa prikupljenim iz kaveza životinja tijekom 24 sata (za dnevnu analizu) ili 168 sati (za tjednu analizu). Uzorci fecesa prikupljeni su iz kaveza životinja neposredno nakon promjene stelje pomoću sita izrađenog za potrebe prikupljanja fecesa. Fecesi izdvojeni iz stelje sitom pohranjeni su u plastične spremnike te podvrgnuti procesu desikacije na sobnoj temperaturi kako bi se osigurala potpuna dehidracija svih uzoraka. Nakon dehidracije, uzorci su izvagani te snimljeni kamerom uz mjerku za daljnje morfometrijske analize. Dehidrirani uzorci fecesa samljeti su električnim mlinom, a fini prah desikata fecesa pohranjen je u zatvorenim plastičnim epruvetama na sobnoj temperaturi do daljnje analize.

## **4.11. Prikupljanje uzoraka tkiva po završetku *in vivo* pokusa**

Po završetku *in vivo* pokusa životinje se eutanazirane u dubokoj anesteziji induciranoj intraperitonealnim davanjem ketamina (70 mg/kg) i ksilazina (7 mg/kg). Nakon uspješne indukcije anestezije životinje su podvrgnute postupku uzorkovanja krvne plazme i cerebrospinalnog likvora za daljnje biokemijske analize te postupcima transkardijalne perfuzije i disekcije tkiva.

### **4.11.1. Prikupljanje uzoraka krvne plazme**

Uzorci pune krvi prikupljeni su punkcijom retroorbitalnog sinusa pomoću staklene kapilare (2 ml). Krv je pohranjena u staklene epruvete prethodno obložene sa 150 µl heparina (Belupo, Hrvatska) te po potrebi dodatnim inhibitorima ovisno o daljnjim biokemijskim analizama (krv iz pokusa u kojima je kasnije određena koncentracija inkretina u plazmi tretirana je inhibitorom DPP-a IV (Sigma Aldrich, SAD) u omjeru 1:100). Uzorci pune krvi centrifugirani su na 3600 RPM-a tijekom 10 minuta te je supernatant (krvna plazma) izuzet u plastične epruvete i pohranjen na -80 °C do daljnje analize.

### **4.11.2. Prikupljanje uzoraka cerebrospinalnog likvora**

Cerebrospinalni likvor (100 µl) uzorkovan je postavljanjem štakora u položaj antefleksije vrata te uvođenjem tanke igle (BD Micro-Fine Plus 0,5 ml – 0,3 mm/30G x 8 mm ili 1,0 ml – 0,33 mm/29G x 12,7 mm; Becton, Dickinson and Company, SAD) u prostor *cisternae magnaе*. Uzorci cerebrospinalnog likvora pohranjeni su na -80 °C do daljnje analize.

### 4.11.3. Perfuzija, fiksacija, i uklapanje tkiva probavne cijevi

Životinje čija su tkiva korištena za histološke i imunohistokemijske analize podvrgnute su postupku transkardijalne perfuzije s ciljem uklanjanja krvnih stanica te fiksacije tkiva. Životinje u dubokoj anesteziji postavljene su u supinacijski položaj u kojem je učinjena laparotorakotomija. Iгла spojena na sustav za transfuziju uvedena je u lijevu klijetku, te je škarama učinjen rez desne pretklijetke kako bi se omogućilo otplavlivanje krvi iz cirkulacijskog sustava. Putem igle uvedene u lijevu klijetku puštena je fiziološka otopina kako bi se cirkulacijski sustav očistio od krvnih stanica nakon čega je putem istog sustava tijelo perfundirano puferiranom 4% otopinom paraformaldehida (pH 7,4). Perfuzija je zaustavljena u trenutku potpunog prožimanja tkiva te je tijelo podvrgnuto postupku disekcije. U svim pokusima u kojima je proučavano tkivo probavnog sustava prikupljeni su uzorci duodenuma (postgastrični segment proksimalnog duodenuma; 2,5 cm), ileuma (precekalni segment distalnog ileuma; 2,5 cm) i kolona (2,5 cm transversalnog kolona i/ili 2,5 cm silaznog kolona). Izdvojeni segmenti probavne cijevi isprani su fiziološkom otopinom puferiranom fosfatima (PBS; engl. *phosphate buffered saline*) (pH 7,4) kako bi se uklonio intraluminalni sadržaj te je tkivo pohranjeno u plastični spremnik ispunjen 4% otopinom puferiranog formaldehida (pH 7,4) na 4 °C radi dodatnog prožimanja. Uzorci koji su kasnije korišteni za dobivanje tkivnih rezova pomoću kriostata podvrgnuti su postupku krioprotekcije dehidracijom pomoću ekvibracije u serijskim otopinama saharoze u 4% otopini puferiranog paraformaldehida. Tkivo je prvo odloženo u spremnik s 15% otopinom saharoze u 4% otopini puferiranog paraformaldehida do ekvibracije i potonuća na dno spremnika nakon čega je prebačeno u 30% otopinu saharoze. Nakon ekvibracije u 30% otopini saharoze tkivo je pohranjeno na -80 °C do daljnjeg uklapanja u vodotopivu polimerizacijsku smolu za rezanje na kriostatu (Tissue-Tek® O.C.T., Sakura, Japan). Uzorci koji su kasnije korišteni za dobivanje tkivnih rezova pomoću mikrotoma, nakon ekvibracije u 4% otopini puferiranog paraformaldehida, dehidrirani su ekvibracijom u serijskim otopinama etanola i ksilenu te uklopljeni u parafinske kocke. Tkivo je prvo pomoću skalpela transversalnim rezovima razdvojeno na 3 mm duge segmente koji su svi zajedno pohranjeni u plastične komore za dehidraciju i uklapanje. Plastične komore ispunjene jednim tkivom (primjerice duodenum) iz jednog pokusa (primjerice pokus s kroničnim davanjem oralne D-galaktoze STZ-icv štakorima) zajedno su uronjene u spremnik ispunjen 70% otopinom etanola. Nakon ekvibracije u otopini 70% etanola u trajanju od 60 min komore su prebačene u idući spremnik ispunjen 70% etanolom

gdje se ekvilibriraju 90 min. Nakon ekvibracije u drugoj otopini 70% etanola, tkivo je prebačeno u otopinu 96% etanola gdje se ekvilibrira u prvom spremniku 60 minuta, u drugom spremniku 90 minuta, te u trećem spremniku 120 minuta. Nakon ekvibracije u 96% etanolu, tkivo je prebačeno u 100% etanol gdje se ekvilibrira u prvom spremniku 60 minuta, a u drugom spremniku 120 minuta, nakon čega je spremno za prožimanje ksilolom. Nakon potpune dehidracije u 100% etanolu, komore s tkivom prebačene su u prvi spremnik sa ksilolom gdje borave 60 minuta pa u drugi spremnik gdje borave 120 minuta. Za vrijeme dehidracije tkiva granule parafina prebačene su u parafinski kotao čija je temperatura namještena na 60 °C. Nakon prožimanja ksilolom, tkivne su komore prebačene u otopljeni parafin u kojem borave tri puta po 120 minuta. Nakon potpunog prožimanja tekućim parafinom, tkivne su kazete otvorene te je tkivo s pincetom uklopljeno u parafinske kocke pomoću metalnog kalupa i parafinskog kotla na način da svaki horizontalni rez parafinske kocke stvara oko 8 transverzalnih rezova kroz uklopljeno tkivo probavne cijevi koji odgovaraju 8 nasumičnih podjednako udaljenih transverzalnih prereza kroz segment tkiva od interesa (što kasnije omogućava valjanu inferenciju na temelju cijelog tkivnog segmenta analizom signala dobivenog iz svakog horizontalnog reza parafinske kocke). Parafinske kocke svih tkiva pohranjene su na sobnoj temperaturi do rezanja pomoću mikrotoma i daljnjih analiza.

#### **4.11.4. Prikupljanje i pohrana svježih uzoraka tkiva probavne cijevi**

Životinje čija su tkiva kasnije korištena u svrhu biokemijskih analiza u dubokoj su anesteziji eutanazirane giljotinom. Tijelo životinje postavljeno je u supinacijski položaj te je učinjena laparotorakotomija. Crijevo je prikazano te je pomoću kirurških škara i skalpela izdvojen postgastrični segment proksimalnog duodenuma (2,5 cm), precekalni segment distalnog ileuma (2,5 cm), te segment kolona (2,5 cm transverzalnog kolona i/ili 2,5 cm silaznog kolona). Skalpelom i škaricama pažljivo je uklonjen mezenterij te masno i vezivno tkivo priljubljeno uz seroznu ovojnici. Tkiva su položena u spremnik s ledenim PBS puferom te je intraluminalni sadržaj ispran istim puferom pomoću plastične štrcaljke. Nakon uklanjanja intraluminalnog sadržaja štrcaljkom, tkivo je otvoreno longitudinalnim rezom nakon čega je ponovno isprano u spremniku s ledenim PBS-om kako bi se uklonio ostatni sadržaj. Očišćeno tkivo ohlađeno je ekvibracijom u tekućem dušiku nakon čega je pohranjeno na -80 °C.

#### **4.11.5. Prikupljanje i pohrana sadržaja cekuma**

Sadržaj cekuma prikupljen je prilikom žrtvovanja za potrebe analize crijevnog mikrobioma te analize kratkolančanih masnih kiselina i masnih kiselina razgranatog lanca. Po laparotorakotomiji, prije disekcije ostalih segmenata probavne cijevi, sterilnim je skalpelom načinjen mali longitudinalni rez apeksa cekuma. Čista epruveta prinesena je vršku cekuma, a sadržaj je nježnim pokretima od baze prema vršku cekuma istisnut kroz načinjeni otvor kako bi se izbjeglo doticanje sadržaja instrumentima (zbog rizika mikrobiološke ili kemijske kontaminacije). Sadržaj cekuma pohranjen je na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  do daljnje analize.

#### **4.11.6. Prikupljanje i pohrana sadržaja sluzi iz probavne cijevi**

Sluz iz probavne cijevi prikupljena je iz 8 cm dugih segmenata duodenuma (preostali dio duodenuma nakon uklanjanja proksimalnih postgastričnih 2,5 cm za potrebe drugih analiza)(553). Segment duodenuma izdvojen je pomoću kirurških škara i mjerke kojom je osigurana istovjetna duljina segmenata. Nakon izdvajanja, segment je ispran od intraluminalnog sadržaja Krebsovom otopinom pomoću plastične štrcaljke. Krebsova otopina sastojala se od otopine 115 mM NaCl, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2,4 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, te 10 mM glukoze koja je prethodno u periodu od 30 minuta bila izložena plinskoj mješavini Carbogen (95% O<sub>2</sub>; 5% CO<sub>2</sub>) te ugrijana na 35 °C. Nakon ispiranja, segment duodenuma položen je u Petrijevu zdjelicu i otvoren neprekinutim longitudinalnim rezom kako bi se prikazala površina sluznice. Površina sluznice navlažena je Krebsovom otopinom (1 ml) te je potom nježno sastrugana pomoću mikroskopskog stakalca. Izdvojena otopina sakupljena je iz Petrijeve zdjelice pomoću pipete te je ponovno nanesa na luminalnu površinu sluznice kako bi se spriječilo sušenje te je isti postupak ponavljen 5 puta na način da je ukupno sakupljanje sluzi trajalo 10 minuta. Postupak izdvajanja sluzi provjeren je pod stereoskopskim mikroskopom na kojem su prikazane crijevne resice tijekom postupka uklanjanja sluzi kako bi se osiguralo da postupak struganja stakalcem izdvaja sluz bez oštećenja epitelnih stanica. Prikupljena sluz odložena je u plastične spremnike i pohranjena na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 4.12. Prikupljanje i priprema uzoraka za *ex vivo* pokuse

Za prikupljanje uzoraka za provođenje *ex vivo* pokusa životinje su uvedene u duboku anesteziju intraperitonealnom primjenom ketamina (70 mg/kg) i ksilazina (7 mg/kg) nakon čega su eutanazirane giljotinom. Tijelo životinje postavljeno je u supinacijski položaj te je podvrgnuto laparotorakotomiji kako bi se prikazali unutarnji organi. Postgastrični segment proksimalnog duodenuma te segment silaznog kolona odvojeni su od ostatka probavne cijevi, mezenterija te masnog i vezivnog tkiva priljubljenog uz seroznu ovojnicu pomoću skalpela i škarića te očišćeni od intraluminalnog sadržaja ispiranjem segmenata Krebsovom otopinom ((115 mM NaCl, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2,4 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM glukoza) prethodno zagrijanom na 35 °C tijekom izlaganja plinskoj mješavini Carbogen (95% O<sub>2</sub>; 5% CO<sub>2</sub>) u vremenu od 30 minuta) pomoću plastične štrcaljke. Nakon uklanjanja intraluminalnog sadržaja tkivo je položeno u Petrijevu zdjelicu ispunjenu Krebsovim puferom na postolje od celuloze radi lakše manipulacije. Tkivo je potom kirurškim škarama razrezano na prstenove visine 3 mm po longitudinalnoj osi koji su potom položeni u polipropilenske bunariće ispunjene s Krebsovim puferom.

### 4.12.1. Testiranje odgovora tkiva na oksidativnu noksu s ili bez D-galaktoze *ex vivo*

Nakon pripreme tkiva za *ex vivo* pokuse, prstenovi probavne cijevi prebačeni su u bunariće s pripremljenim otopinama za tretman tkiva. Kontrolni segmenti položeni su u bunariće s Krebsovim puferom prethodno zagrijanim na 35 °C te izloženim plinskoj mješavini Carbogen. Otopine za izazivanje oksidativne nokse sadržavale su 1,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (otopina 1) ili 200 μM 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid (AAPH) (otopina 2) u Krebsovom puferu. Učinak D-galaktoze na oksidativnu noksu ispitan je otopinama koje su sadržavale 1,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i 100 mM D-galaktozu (otopina 3) te 200 μM i 100 mM D-galaktozu (otopina 4) u Krebsovom puferu. Tkivo je bilo tretirano 30 minuta nakon čega je isprano u Krebsovom puferu te položeno u otopinu 4',6-diamidino-2-fenilindola (DAPI) masene koncentracije 1 μg/ml u Krebsovom puferu tijekom 5 minuta. Nakon tretmana, tkivo je isprano u Krebsovom puferu, smrznuto uranjanjem u tekući dušik te pohranjeno na -80 °C.



#### **4.12.2. Testiranje odgovora vrčastih stanica crijeva na kolinergičku stimulaciju *ex vivo***

Nakon pripreme tkiva za *ex vivo* pokuse, prstenovi probavne cijevi prebačeni su u bunariće s pripremljenim otopinama za tretman tkiva. Kontrolni segmenti položeni su u bunariće s Krebsovim puferom prethodno zagrijanim na 35 °C te izloženim plinskoj mješavini Carbogen. Kolinergička stimulacija provedena je polaganjem prstenova u Krebsov pufer s 20 μM acetilkolina (ACh; otopina 1) te 20 μM karbakola (CCh; otopina 2). Za potvrdu muskarinskog učinka kontrolni prstenovi položeni su u otopinu koja je sadržavala 20 μM acetilkolina uz 100 μM atropina (ACh+ATR; otopina 3) te 20 μM karbakola uz 100 μM atropina (CCh+ATR; otopina 4) (553). Nakon 30 minuta, duodenalni prstenovi isprani su u Krebsovom puferu te položeni u otopinu 4% puferiranom paraformaldehida na 4 °C za fiksaciju tkiva. Nakon fiksacije uzorci su pohranjeni na -80 °C.

#### 4.13. *In vitro* analiza difuzije kofeina kroz rekonstituiranu sluz

Model *in vitro* difuzije kofeina kroz barijeru rekonstituirane sluzi korišten je s ciljem procjene stope difuzije malih molekula kroz probavnu sluznu barijeru (553). Kofein je odabran kao pogodna molekula za ispitivanje difuzije zbog male veličine (procijenjena prosječna masa molekule iznosi 194.191 Da) te zbog izraženog vrška apsorbanjskog spektra na 275 nm. Agar agar (4% masena koncentracija u destiliranoj i deioniziranoj vodi (ddH<sub>2</sub>O)) korišten je kao potporna struktura zbog visoke propusnosti za molekule vode i kofeina, niske kemijske reaktivnosti (često korišten kao stabilizator lijekova) te lake manipulacije (debljinu suportivne membrane i poroznost moguće je lako mijenjati promjenom koncentracije i volumena dostavljene otopine). Difuzija kofeina testirana je u malim komorama otvorenog tipa u kojima je probavna sluz rekonstituirana na propusnoj agaroznoj membrani predstavljala jedinu polupropusnu stijenku komore. Zapremni proksimalni rezervoar izrađen je kontroliranim hlađenjem 60 µl 4% otopine agara unutar spremnika od polivinilklorida (PVC) duljine 20 mm te ukupnog volumena od 392 mm<sup>3</sup>. Hlađenjem otopine agara unutar spremnika pripremljena su dva odjeljka približne zapremnine od 150 mm<sup>3</sup> odijeljena propusnom agaroznom membranom. Spremnici su ohlađeni na -20 °C prije upotrebe. Veličina odjeljaka, površina i debljina agarozne membrane, te optimalna koncentracija agara (tj. poroznost membrane) procijenjeni su na temelju difuzije kofeina kroz membranu na kojoj nije bila rekonstituirana probavna sluz. Koncentracija kofeina bila je procijenjena na temelju kvantitativnog modela izrađenog na podacima apsorbanjskog spektra serijskih razrjeđenja standardne otopine kofeina u PBS-u. Nakon određivanja optimalnih uvjeta difuzije kofeina, uzorci probavne sluzi 3 kontrolne životinje i 3 životinje prethodno tretirane STZ-icvom (8 tjedana po indukciji modela) udruženi su po principu jednakih volumena (10 µl sluzi po životinji). Združeni uzorci sluzi (30 µl) položeni su na agaroznu membranu u proksimalnom odjeljku, a spremnici za testiranje difuzije ostavljeni su 20 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se omogućilo formiranje sluzne barijere. Otopina kofeina (100 µl; 1 mM otopina u PBS-u) dostavljena je u proksimalni spremnik, a jednaki volumen PBS-a položen je u distalni, zapremni odjeljak. Kontrolni uvjeti difuzije bili su: i) 100 µl PBS-a u oba odjeljka (kako bi se kontroliralo za učinak otpuštanja i difuzije komponenti agara tijekom provođenja ispitivanja); ii) 100 µl PBS-a u oba odjeljka, ali rekonstituirana sluzna barijera kontrolnih životinja na agaroznoj membrani u proksimalnom odjeljku (kako bi se kontroliralo za učinak otpuštanja i difuzije komponenti kontrolne sluzne barijere tijekom provođenja ispitivanja); iii) 100 µl PBS-a u oba odjeljka, ali

rekonstituirana sluzna barijera STZ-icv životinja na agaroznoj membrani u proksimalnom odjeljku (kako bi se kontroliralo za učinak otpuštanja i difuzije komponenti STZ-icv sluzne barijere tijekom provođenja ispitivanja); iv) jednostavni kofeinski model difuzije a 1 mM kofeinom u proksimalnom odjeljku uz PBS u distalnom odjeljku te agaroznu membranu bez sluzi između odjeljaka. Svi proksimalni i distalni (zapremni) odjeljci uzorkovani su (uzimanjem 5  $\mu$ l tekućine) u vremenskim točkama: 0 (za uspostavljanje bazalnih vrijednosti); 30, 60, 90, i 120 minuta. Uzorkovana tekućina pohranjena je u bunariće zapečaćene acetatnom folijom kako bi se onemogućilo isparavanje tekućine, a po završetka pokusa apsorbancijski spektri svih uzoraka izmjereni su pomoću spektrofotometra NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, SAD).

#### 4.14. Homogeniziranje uzoraka tkiva

Uzorci tkiva prethodno smrznuti uranjanjem u tekući dušik te pohranjeni na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  pripremljeni su za biokemijske analize postupkom ultrazvučne homogenizacije u puferu za lizu. Pufer za lizu tkiva probavne cijevi sastojao se od 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1 mM etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA; *engl. ethylenediaminetetraacetic acid*), 1% Triton X-100, 1% natrijevog deoksikolata, 0,1% natrijevog dodecil sulfata (SDS; *engl. sodium dodecyl sulfate*), 1 mM fenil-metil-sulfonil-fluorida (PMSF; *engl. phenylmethylsulfonyl fluoride*) uz dodatak 1 tablete koktela inhibitora proteaza (Sigma,-Aldrich, SAD), te 1 tablete inhibitora fosfataza (PhosSTOP, Roche, Basel, Švicarska) na svakih 10 ml pufera. Uzorci tkiva izrezani su skalpelom na komadiće na zaleđenoj podlozi te su uronjeni u epruvete s 500  $\mu\text{l}$  pufera za lizu na ledu. Ultrazvučna sonda uređaja za homogeniziranje (Microson Ultrasonic Cell 167 Disruptor XL, Misonix, SAD) uronjena je u epruvetu s tkivom uz ispuštanje ultrazvučnih valova u trajanju od 10-ak sekundi. Postupak je ponovljen 3 puta u kružnim ciklusima ili dok ultrazvuk nije u potpunosti homogenizirao tkivo. Svi uzorci uvijek su tretirani na jednak način. Ultrazvučna sonda između uzoraka temeljito je isprana destiliranom vodom uz pomoć ultrazvuka, a višak vode uklonjen je čistim papirnatim ručnikom. U nekim slučajevima uzorci tkiva bili su podvrgnuti dodatnom koraku usitnjavanja tarionikom i tučkom na suhom ledu prije ultrazvučne homogenizacije s ciljem pospješivanja ekstrakcije molekula, primjerice uzorci crijeva tijekom analize akutnih učinaka oralno primijenjene D-galaktoze duž probavne cijevi (554) te uzorci crijeva tijekom analize sustava koji održavaju redoks homeostazu kod STZ-icv životinja (535). Nakon homogenizacije, uzorci su centrifugirani 10 min uz relativnu centrifugalnu silu (RCF; *engl. relative centrifugal force*) od 12 879 g na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  kako bi se supernatant koji sadržava biokemijski matriks izdvojio od fragmenata stanica i nehomogeniziranog tkiva. Supernatanti su izdvojeni u epruvete te pohranjeni na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.15. Priprema uzoraka fecesa**

Priprema uzoraka fecesa za biokemijske analize provedena je na način da su za korištenje praha desikata fecesa uzorci izvagani pomoću laboratorijske vage i pohranjeni u tubice za mikrocentrifugu nakon čega je prah otopljen u odgovarajućem volumenu PBS-a. Dobivena otopina podvrgnuta je postupku homogenizacije pomoću ultrazvuka. Homogenat fecesa centrifugiran je tijekom 10 min na 10 000 RPM-a, a supernatant je pohranjen u zasebnu tubicu za mikrocentrifugiranje na -80 °C za daljnje biokemijske analize. Svježi uzorci pohranjeni na -80°C otopljeni su u odgovarajućim volumenima PBS-a kako bi se dobile otopine jednake koncentracije, te je dobivena otopina obrađena na istovjetan način kako je opisano za suhe uzorke fecesa.

#### 4.16. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina u supernatantima homogenata tkiva određena je metodama po Lowryju (555) i Bradfordu (556). Mjerenje proteina metodom po Lowryju zasniva se na kombinaciji reakcije bakrovih iona s peptidnim vezama u alkalnom mediju uz oksidaciju aromatskih proteinskih nastavaka. Mjerenje proteina po Lowryju provodi se tako da se uzorci inkubiraju s otopinom dobivenom miješanjem otopine A (2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,1 M NaOH) s otopinom B (otopina 1%  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$  pomiješana s otopinom 2%  $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \times 4 \text{H}_2\text{O}$  u volumnom omjeru 1:1) u omjeru 49:1. Dobivena otopina (otopina C; 2 ml) inkubira se s 10  $\mu\text{l}$  uzorka na sobnoj temperaturi 10 min nakon čega se dodaje 200  $\mu\text{l}$  Folin-Ciocalteu reagensa razrijeđenog u destiliranoj  $\text{H}_2\text{O}$  u omjeru 1:2. Nakon 30 min reakcije, pomoću spektrofotometra se izmjeri apsorbanacija uzoraka na 750 nm iz koje se na temelju linearnog modela postavljenog mjerenjem apsorbanacije standardnih uzoraka goveđeg serumskog albumina (BSA; *engl. bovine serum albumin*) poznate koncentracije odredi koncentracija proteina u mjerenim uzorcima.

Određivanje proteina po Bradfordu zasniva se na promjeni apsorbancijskog spektra boje Coomassie briljantno plavo G-250 pri vezanju na proteine uz pomak spektralnog vrška s 465 nm na 595 nm. S obzirom na izraženu osjetljivost Bradfordove metode uzorci se prvo trebaju razrijediti. Supernatanti homogenata crijeva i standardni uzorci BSA-a otopljenog u puferu za lizu crijeva razrijeđeni su 40 puta u PBS-u nakon čega su volumeni između 1 i 10  $\mu\text{l}$  (ovisno o početnom razrjeđenju supernatanta homogenata) inkubirani sa 100  $\mu\text{l}$  Bradford reagensa (Sigma-Aldrich, SAD). Nakon 5 minuta inkubacije, na temelju mjerenja standardnih uzoraka i probnog uzorka, određuje se optimalni omjer volumena razrijeđenih uzoraka i reagensa te se ponavlja isti postupak. Postupak je potrebno kalibrirati podešavanjem ukupnog mjernog volumena, razrjeđenja originalnih uzoraka, te volumenom dodanog Bradfordovog reagensa kako bi se postigla željena osjetljivost i preciznost metode. Apsorbancijski vršak na 465 nm (nevezana boja) i na 595 nm (boja vezana uz proteine) izmjereni su Infinite F200 PRO multimodalnim čitačem mikropločica (Tecan, Männedorf, Švicarska).

#### **4.17. Analiza apsorbancijskog spektra**

Analiza apsorbancijskog spektra korištena je za utvrđivanje biokemijskog sastava probavne sluzi te za utvrđivanje koncentracije kofeina korištenjem kvantitativnog modela temeljenog na apsorbancijskim vrijednostima pri 274 nm (553). Apsorbancijski spektri dobiveni su sekvencijskim mjerenjem apsorbancije između 220 i 750 nm u koracima od 3 nm pomoću spektrofotometra NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, SAD). Nakon kalibracije uređaja mjerenjem apsorbancijskog spektra ddH<sub>2</sub>O, uzorci (1,5 µl) su postavljeni između krajeva optičke cijevi spojene na izvor svjetlosti i monokromator te je spektar svakog uzorka izmjeren 3 puta uz put svjetlosti od 1 mm te 3 puta uz put svjetlosti od 0,1 mm.

#### 4.18. Mjerenje koncentracije nepolarnih lipida fecesa

S obzirom da je za mjerenje koncentracije lipida korištenjem standardnih postupaka izolacije, ekstrakcije, i kvantifikacije potrebna velika količina biološkog materijala (primjerice 1 g fecesa u protokolu koji su predložili Kraus i suradnici (557), na temelju originalnog protokola Folch i suradnika (558)), predložen je i validiran alternativni protokol mjerenja mrlja lipida Sudan crnim (SBLB, *engl. Sudan Black lipid blot*) pomoću kojeg je moguće precizno kvantificirati malu koncentraciju (nepolarnih) lipida na temelju particijskog koeficijenta lizokromne diazoboje Sudan crno B (SBB, *engl. Sudan Black B*) između lipidnog ekstrakta fecesa i etilen-glikola (559). Ukratko, 100 mg praha desikata fecesa otopljeno je u 500  $\mu$ l otopine kloroforma u metanolu pomiješanih u volumnom omjeru 2:1. Uzorci su centrifugirani pri RCF-u od 1000 g tijekom 10 min kako bi se dvije tekuće faze razdvojile krutom, netopivom fazom. Donja faza (ekstrakt lipida u kloroformu) prebačena je u zasebne test tubice, a 1  $\mu$ l lipidne faze pomoću pipete je položen na mikroskopsko staklo zagrijano na 40 °C na prethodno obilježeno mjesto. Nakon isparavanja otapala te fiksacije uzorka, mikroskopsko je staklo uronjeno u 1% otopinu SBB-a u etilen-glikolu tijekom 20 s. Višak boje i etilen-glikola sa stakla isprani su tekućom vodom te je staklo ostavljeno da se osuši na sobnoj temperaturi. Nakon sušenja, uzorci su digitalizirani pomoću kamere ili skenera, a digitalni otisak stakla podvrgnut je analizi signala temeljenoj na određivanju integrirane gustoće (559). Koncentracija lipida određena je na temelju kalibracijske krivulje dobivene mjerenjem standardnog uzorka čija je koncentracija prethodno neposredno određena gravimetrijskom analizom.



#### **4.19. Određivanje koncentracije glukoze**

Koncentracija glukoze određena je s Trinder metodom pomoću glukoza-oksidge i 4-aminofenoazona korištenjem komercijalnog kolorimetrijskog alata (Greiner Diagnostic GmbH, Njemačka). Glukoza prisutna u uzorku podliježe enzimskoj oksidaciji kataliziranoj enzimom glukoza-oksidge pri čemu nastaje  $H_2O_2$ . U prisutnosti peroksidaze  $H_2O_2$  oksidira mješavinu fenola i 4-aminofenoazona te nastaje crveni kvinoniminski produkt pogodan za spektrofotometrijsku kvantifikaciju pri valnoj duljini od 500 nm (560). Koncentracija glukoze određena je na temelju kalibracijske krivulje dobivene mjerenjem standarda poznate koncentracije. Apsorbancija uzoraka mjerena je pomoću Infinite F200 PRO multimodalnog čitača mikropločica (Tecan, Männedorf, Švicarska).

## 4.20. Određivanje koncentracije galaktoze

Koncentracija galaktoze određena je pomoću komercijalnog kolorimetrijskog alata za mjerenje koncentracije galaktoze i aktivnosti galaktoza-oksidade (A22179; Invitrogen, SAD)(561). Galaktoza-oksida katalizira reakciju oksidacije galaktoze na C<sub>6</sub> atomu pri kojoj nastaje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koji u prisutstvu peroksidaze iz hrena (HRP, *engl. horseradish peroxidase*) reagira s Amplex™ Red reagensom te stvara crveni fluorescentni spoj rezorufin s apsorpcijskim maksimumom na 571 nm te emisijskim maksimumom na 585 nm koji je moguće precizno kvantificirati na temelju apsorpcije ili fluorescencije s obzirom na nizak pozadinski šum pri navedenim valnim duljinama. Pri mjerenjima koncentracije galaktoze u plazmi apsorpcija uzoraka izmjerena je na 570 nm pomoću Infinite F200 PRO multimodalnog čitača mikropločica (Tecan, Männedorf, Švicarska).

#### 4.21. Određivanje koncentracije nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfata

Koncentracija reduciranog i ukupnog (reduciranog i oksidiranog) nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfata (NADP; engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) izmjerena je pomoću komercijalnog kvantifikacijskog alata (Sigma-Aldrich, SAD) neosjetljivog na oksidirani i reducirani nikotinamid-adenin-dinukleotid (554,561). Ukratko, NADP(H) je prvo izdvojen iz tkiva procesom lize nakon čega NADP<sup>+</sup> biva uništen kuhanjem uzoraka na 60 °C. NADPH, koji je neosjetljiv na povišenu temperaturu, biva oksidiran u NADP<sup>+</sup> u reakciji pretvorbe glukoza-6-fosfata u 6-fosfoglukonat, kataliziranoj glukoza-6-fosfat-dehidrogenazom, u kojoj se tiazolil plavo tetrazolijev bromid pretvara formazan koji se potom kvantificira spektrofotometrijski. Apsorbancija uzoraka izmjerena je pomoću Infinite F200 PRO multimodalnog čitača mikropločica (Tecan, Männedorf, Švicarska).

## 4.22. Određivanje koncentracije inkretina imunoenzimskim testom

Koncentracija inkretina izmjerena je pomoću komercijalno dostupnih alata za mjerenje ukupnog i aktivnog GLP-a 1 i GIP-a (Merck, New Jersey, SAD) koji se zasnivaju na principu imunoenzimskog testa. Uzorci plazme korišteni za mjerenje koncentracije inkretina neposredno su tretirani inhibitorima DPP-a IV. Uzorci plazme i cerebrospinalnog likvora odloženi su pomoću pipete u mikrotitarske pločice za čije su dno vezana poliklonalna protutijela specifična za navedene inkretine. Nakon vezanja inkretina iz odloženih uzoraka bunarići mikrotitarskih pločica su isprani, nakon čega je u njih odložena otopina poliklonalnih protutijela, kako bi se ostvarilo vezanje analita. Na vezana poliklonalna protutijela vezan je biotinizirani HRP koji je potom iskorišten za oksidaciju kolorimetrijskog supstrata 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB; engl. *3,3',5,5'-tetramethylbenzidine*) u plavo obojeni diimin-diamin kompleks; navedeni kompleks se u prisutnosti H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> koji zaustavlja reakciju pretvara u diiminski žuti produkt. Na temelju spektrofotometrijske kvantifikacije diiminskog produkta, na 450 nm, iz kalibracijske se krivulje dobivene mjerenjem uzoraka poznate koncentracije inkretina izračunava koncentracija u analiziranim uzorcima.

#### **4.23. Određivanje koncentracije glutamata i cikličkog adenozin-monofosfata**

Koncentracija glutamata i cAMP-a izmjerene su komercijalno dostupnim alatima (Sigma-Aldrich, SAD) temeljenima na imunoenzimskoj detekciji (561). Ukratko, supernatanti homogenata tkiva odloženi su u bunariće prethodno obložene poliklonalnim protutijelima specifičnima za navedene analite. Nakon vezanja analita u bunariće je nakon ispiranja odložena otopina poliklonalnih protutijela usmjerenih na analit na koja su potom vezani biotinizirani HRP-ovi. Korištenjem vezanih HRP-ova kao katalizatora u bunarićima mikrotitarskih pločica nastali produkt reakcije je moguće precizno kvantificirati spektrofotometrijskom analizom pomoću Infinite F200 PRO multimodalnog čitača mikropločica (Tecan, Männedorf, Švicarska).

#### 4.24. Tribometrijska analiza lubricirajućih svojstava sluzi pomoću višenamjenskog pretvarača za probirna tribometrijska mjerenja

Lubricirajuća svojstva probavne sluzi analizirana su kvantitativnim tribometrijskim esejom pomoću izrađenog tribometrijskog adaptera za platformu za zvučno preplašivanje (PASTA; *engl. platform for acoustic startle*)(532,562,563). PASTA platforma izrađena je modifikacijom digitalne kuhinjske vage Vivax Home KS-502T (Vivax, Hrvatska). Ukratko, pretvarači sile kuhinjske vage spojeni su na tiskanu pločicu integriranog kruga HX711, kojoj je prethodno *RATE* kontakt prespojen na *VCC* kontakt kako bi se omogućio način rada za prikupljanje 80 očitavanja u sekundi. Integrirani krug HX711 potom je spojen s pločicom mikroupravljača NodeMCU ESP-32S koja se ponaša kao komunikacijski most prema računalu te prosljeđuje podatke prikupljene pomoću pretvarača sile u stvarnom vremenu. Komandna datoteka opće namjene *PASTA*.*gp* korištena je za prikupljanje i pohranu podataka u *.pasta* datoteke (532,562). Višenamjenski pretvarač za probirna tribometrijska mjerenja (*mastPASTA*, *engl. multifunctional adapter for screening tribometry*) pričvršćen je za PASTA platformu kako bi se omogućilo prikupljanje podataka vremenske serije prilikom primjene vertikalne sile na sustav PVC cjevčica koji se nalazi ispod kuhinjske vage (563). Uzorak sluzi (10  $\mu$ l) ravnomjerno je raspoređen širom proksimalnih 188.5 mm<sup>2</sup> konkavne površine vanjske cjevčice rotirajućim umetanjima (n = 10). Zaprimajuća cjevčica pričvršćena je za *mastPASTA* adapter pomoću osiguravajuće igle nakon čega je snimljeno 10 vertikalnih povlačenja prilikom kojih je nadvladana sila trenja pri dodirnoj površini 125,66 mm<sup>2</sup>. Vrijednosti izmjerene pomoću PASTA platforme pomnožene su s ubrzanjem zemljine sile teže kako bi se dobila vršna sila trenja izražena u mN (553).

#### **4.25. *In vitro* analiza sluzi pomoću fluorescencijskog spektra akridin narančastog**

*In vitro* test vezanja akridinofilnih čestica proveden je s ciljem analize vezujuće sposobnosti probavne sluzi uz spektralnu analizu za diferencijaciju vezanih čestica. Akridin narančasto fluorescentna je boja koja pri niskom pH pokazuje svojstvo narančaste fluorescencije pri vezanju na stanice prokariota dok boja vezana za stanice eukariota fluorescira zeleno što ju čini pogodnom za diferencijalno bojenje bakterija prisutnih u kliničkim uzorcima (564–566). Radna otopina akridin narančastog (pH 3,5) pripravljena je otapanjem 20 mg praha u 190 ml pufera octene kiseline (100 ml 1 M CH<sub>3</sub>COONa x 3H<sub>2</sub>O i 90 ml 1 M HCl) uz podešenje pH na 3,5 (553). Mikroskopska stakla s pojačanim adhezivnim svojstvima (Superfrost Plus™ Gold Adhesion) na koja su prethodno, pomoću pipete, odloženi i fiksirani uzorci probavne sluzi, uronjena su u otopinu akridin narančastog tijekom 2 minute nakon čega su uzorci isprani u dH<sub>2</sub>O te zaštićeni pokrovnim stakalcima pomoću medija za poklapanje koji čuva fluorescenciju (Abcam, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo). Bojenje probavne sluzi analizirano je pomoću U-MWIG2 i U-MNIB2 seta filtera na Olympus BX51 mikroskopu za mjerenje epifluorescentnih signala (Olympus, Japan).

#### **4.26. Analiza pH probavne sluzi timolsulfoneftaleinom**

S obzirom na ograničen volumen prikupljene probavne sluzi, te na nedovoljnu osjetljivost papira za mjerenje pH, uspostavljen je kolorimetrijski protokol za procjenu pH pomoću timolsulfoneftaleina (553). Ukratko, 100 mg timolsulfoneftaleina otopljeno je u alkoholnoj otopini NaOH (2,15 ml 0,1M NaOH u 20 ml 95% etanola) kako bi se dobila koncentrirana otopina koja je potom razrijeđena do ukupnog volumena od 100 ml pomoću dH<sub>2</sub>O. Otopine PBS-a, čiji je pH prethodno podešen pomoću HCl i NaOH, korištene su za uspostavljanje standardne kalibracijske krivulje. Standardni uzorci te uzorci probavne sluzi (2 µl) inkubirani su s 8 µl radne otopine timolsulfoneftaleina. Kolorimetrijski pomak snimljen je pomoću kamere (Samsung S20FE, Samsung, Suwon-si, Južna Korea) te pomoću spektrofotometra NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, SAD).



## 4.27. Biokemijske metode za mjerenje redoks homeostaze

Redoks homeostaza mjerena je kombinacijom metoda za kvantitativnu procjenu ključnih enzima i molekula uključenih u održavanje redoks homeostaze kako bi se omogućilo razgraničavanje promjena vezanih uz primarni te sekundarni (kompenzacijski) odgovor stanica na oksidativnu noksu (109,535,554,561).

### 4.27.1. Redoks permanganometrija na nitrocelulozi tekućih uzoraka

Redoks permanganometrija na nitrocelulozi (NRP, engl. *nitrocellulose redox permanganometry*) korištena je s ciljem kvantifikacije ukupnog reduktivnog kapaciteta (567). Metoda NRP predložena je kako bi se zaobišli metodološki problemi vezani uz interferenciju smeđeg precipitata  $MnO_2$  koji nastaje redukcijom  $KMnO_4$  pri neutralnom pH te koji onemogućava korištenje oksidacijskih svojstava  $KMnO_4$  prilikom procjene reduktivnog kapaciteta unatoč brojnim prednostima ( $KMnO_4$  je snažni oksidans koji rijetko stupa u reakcije koje nisu redoks prirode)(567,568). Metoda NRP koristi uzorkom posredovanu redukciju  $KMnO_4$  u neutralnom mediju kako bi se omogućio nastanak precipitata  $MnO_2$  koji biva vezan na nitroceluloznu membranu nakon čega sekvantificira metodom digitalne denzitometrije (567). Navedena metoda provedena je odlaganjem 1  $\mu$ l uzorka na prethodno predviđeno mjesto na nitroceluloznoj membrani (Amersham Protran 0.45; GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, SAD). Nakon sušenja uzoraka, membrana je uronjena u otopinu  $KMnO_4$  (0,2 g  $KMnO_4$  otopljeno u 20 ml ddH<sub>2</sub>O) na 30 s nakon čega je pažljivo štipaljkom odbojena pod tekućom destiliranom vodom kako bi se uklonio višak  $KMnO_4$  te povećao kontrast membrane. Nakon uklanjanja suvišnog reagensa, membrana je osušena, digitalizirana kamerom ili uredskim skenerom, te podvrgnuta denzitometrijskoj analizi pri čemu je integrirana gustoća signala precipitata  $MnO_2$  proporcionalna ukupnom reduktivnom kapacitetu uzorka (567).

#### 4.27.2. Redoks permanganometrija tkivnih preslika na nitrocelulozi

Redoks permanganometrija tkivnih preslika na nitrocelulozi (HistoNRP), adaptacija je NRP tehnike u kojoj se princip uzorkom posredovane redukcije  $\text{KMnO}_4$  u neutralnom mediju koristi kako bi se pružio uvid u prostornu raspodjelu reduktivnog kapaciteta tkiva (567). Ukratko, otopina  $\text{KMnO}_4$  pripremljena je otapanjem 0,2 g  $\text{KMnO}_4$  u 20 ml ddH<sub>2</sub>O. Tkivni uzorci, prethodno izdvojeni iz životinja perfundiranih 4% paraformaldehidom te tretirani postupkom krioprotekcije ekvibracijom u otopinama 15% i 30% saharoze otopljene u 4% otopini puferiranog paraformaldehida te pohranjeni na -80°C, pripremljeni su za rezanje na kriostatu uklapanjem u vodotopivu polimerizacijsku smolu (Tissue-Tek® O.C.T., Sakura, Japan). Pomoću iste smole, uzorci su zalijepljeni za držače za rezanje te podvrgnuti postupku rezanja. Presjeci mozga korišteni prilikom prostorno-vremenske analize reduktivnog kapaciteta moždanog tkiva narezani su na debljinu od 30  $\mu\text{m}$  te su neposredno položeni na mikroskopska stakla. Višak vodotopive polimerizacijske smole uklonjen je uranjanjem mikroskopskih preparata u PBS na sobnoj temperaturi do potpunog uklanjanja smole. Stakalca su položena na radnu površinu na način da su uzorci tkiva bili okrenuti prema gore te je na uzorke položena nitrocelulozna membrana prethodno navlažena PBS-om. Na membranu su položena 3 sloja filter papira koji su potom također navlaženi PBS-om. Filter papiri su poklopljeni staklenom pločom kako bi se osigurala ravnomjerna raspodjela sile te je na ploču položen uteg mase 800 g. Za izradu tkivnih preslika mozga korišten je tlak od 31,284 mmHg tijekom 24 sata na sobnoj temperaturi (561). Nakon 24 sata uteg i 2 filter papira su uklonjeni, a treći je filter papir dobro navlažen PBS-om prije odvajanja od nitrocelulozne membrane. Nitrocelulozna membrana s tkivnom preslikom navlažena je PBS-om, pažljivo odvojena od mikroskopskih stakalaca s uzorcima tkiva, te osušena na sobnoj temperaturi. Nakon sušenja, membrana je podvrgnuta istom postupku lokalne redukcije  $\text{KMnO}_4$  kao što je opisano za NRP. Membrana je uronjena u prethodno pripremljenu otopinu  $\text{KMnO}_4$  na 30 s te odbojana pod tekućom dH<sub>2</sub>O. Nakon uklanjanja viška  $\text{KMnO}_4$  membrana je digitalizirana pomoću skenera i/ili kamere te podvrgnuta postupku denzitometrije mjerenjem integrirane gustoće signala.

#### 4.27.3. Mjerenje oksidacijsko-redukcijskog potencijala

Oksidacijsko-redukcijski potencijal (ORP) uzoraka mjeren je s ciljem određivanja ukupne ravnoteže redoks sustava s obzirom da ova metoda omogućuje kvantifikaciju ukupnog broja elektrona koji stupaju u interakciju s mjernom elektrodom od platine. Dodatna stabilnost očitavanja potencijala postignuta je sprežanjem redoks reakcija uzorka s redoks parom I<sub>2</sub>/KI s obzirom na linearni odnos ORP-a s logaritmom koncentracijskog omjera I<sub>2</sub> i KI (569). Ukratko, homogenati tkiva (5 µl supernatanta homogenata hipokampusu (561)) pomiješani su, u volumnom omjeru 1:1, s otopinom za elektrodu koja je sadržavala I<sub>2</sub>/KI redoks par (0,1 M I<sub>2</sub>, 0,4 M KI). Otopina je razrijeđena pomoću ddH<sub>2</sub>O kako bi se omogućio optimalni kontakt s mikroelektrodom. Uzorci su zaštićeni od svjetla inkubirani 60 min u na sobnoj temperaturi. Reduktivni potencijal izmjeren je pomoću mikroprocesorskog mjerača 6230N (Jenco Instruments, San Diego, SAD) spregnutog s redoks mikrosenzorskim sustavom ORP-146S (Shelf Scientific, Lazar Research Laboratories, SAD)(561,570). Mikrosenzorski sustav sastojao se od platinastog mjernog elementa spregnutog s Ag/AgCl referentnom elektrodom uz spojište i kapilaru od inertnog fluoropolimera. Spojište, kapilara i spremnik sustava bili su ispunjeni 3 M KCl. Tijekom mjerenja sustav je bio spojen na baterijsko napajanje kako bi se izbjegla moguća interferencija mreže. Raspon mjerenja instrumenta bio je između -1500 i +1500 mV uz preciznost od ±0,5 mV (561). Gornja granica varijabilnosti bioanalitičke metode uz navedene postavke ustanovljena je u prethodnom istraživanju (570).

#### 4.27.4. Ukupni reduktivni kapacitet izmjeren pomoću metastabilnog radikal-kationa 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline)

Metoda mjerenja ukupnog reduktivnog kapaciteta odbojavanjem metastabilnog radikal-kationa 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline)(ABTS, *engl. 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)*) korištena je za dobivanje dodatnog uvida u ukupnu redoks homeostazu (u kombinaciji s metodama NRP i ORP)(553). Metastabilni ABTS radikal-kation generiran je na način da je 7 mM ABTS-a inkubirano s 2,45 mM K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> preko noći na sobnoj temperaturi u mraku (553,571,572). Radna otopina je pripremljena razrijeđenjem matične otopine ABTS radikal-kationa, u omjeru 1:40 određenom na temelju absorbancijskog

spektra. U polistirensku mikropločicu pomoću pipete odloženo je 1 µl svakog uzorka (volumen je potrebno podesiti ovisno o jačini ABTS radikal-kation reagensa te o reduktivnom kapacitetu uzorka) te je potom u bunariće odloženo 100 µl radne otopine metastabilnost ABTS radikal-kationa. U kontrolnim bunarićima inkubirana je otopina metastabilnog ABTS radikal-kationa bez dodatka uzorka, a kao standardi korišteni su vodotopivi analog vitamina E (Trolox: 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) i ditiotreitol (DTT; *engl. dithiothreitol*)(573) u serijskim razrjeđenjima. Ukupni reduktivni kapacitet izračunat je na temelju razlike apsorbancije metastabilnog ABTS radikal-kationa u odsutnosti redukcije (bunarić s kontrolnom otopinom bez uzorka ili standarda) te vrijednosti apsorbancije u bunarićima s uzorcima i standardima nakon 5 min reakcije izmjerene na 405 nm pomoću Infinite F200 PRO multimodalnog čitača mikropločica (Tecan, Männedorf, Švicarska)(553).

#### **4.27.5. Posredna procjena peroksidacije lipida kvantifikacijom spojeva koji stupaju u reakciju s tiobarbiturnom kiselinom**

Lipidna peroksidacija nastupa u slučaju nemogućnosti stanice da nadvlada elektrofilni izazov kompenzatornim osnaživanjem nukleofilnog tonusa (109). Mjerenje sekundarnih proizvoda peroksidacije omogućava uvid u redoks homeostazu. Peroksidacija lipida procijenjena je posredno, korištenjem eseja za kvantifikaciju spojeva koji stupaju u reakciju s tiobarbiturnom kiselinom (TBARS; *engl. thiobarbituric acid reactive substances*)(534,535,554,561,570). Ukratko, supernatanti tkivnih homogenata (6-36 µl ovisno o pojedinom tkivu te koncentraciji TBARS) pomiješani su s TBA-TCA reagensom (0.4 % tiobarbiturna kiselina otopljena u 15% otopini trikloroetene kiseline); korišteni volumeni reagensa (100-160 µl) određeni su na temelju koncentracije TBARS-a i volumena uzorka te potrebnog vremena reakcije. Uzorcima je po potrebi uvećan volumen dodavanjem ddH<sub>2</sub>O-a nakon čega su vorteksirani, centrifugirani, te postavljeni u uređaj za zagrijavanje u perforiranim tubicama za mikrocentrifugu u slučaju potrebe smanjenja tlaka tijekom kuhanja uzoraka. Uzorci su kuhani na temperaturi između 60 i 95 °C ovisno o koncentraciji produkata peroksidacije lipida, volumenu, te drugim čimbenicima koji utječu na brzinu reakcije stvaranja adukta tiobarbiturne kiseline i aldehida prisutnih u uzorku. Razvoj kemijske reakcije procjenjivan je u stvarnom vremenu vizualnom inspekcijom boje eksperimentalnih uzoraka i standardnih uzoraka pomoću kojih je kasnije određena kalibracijska krivulja. Po završetku reakcije (obično između 20 i 90 min), uzorci su uklonjeni iz grijača te postavljeni u centrifugu kako bi se dio otopine kondenzirane tijekom

kuhanja spustio na dno tubice za mikrocentrifugu. Obojeni adukt tiobarbiturne kiseline i reaktivnih aldehida izdvojen je iz otopine procesom ekstrakcije u 220  $\mu$ l n-butanola uz vorteksiranje. Volumen butanola prilagođen je na temelju količine obojenog adukta u otopini uzimajući u obzir maksimalni zapremni kapacitet. Apsorbancija frakcije butanola izmjerena je na 540 nm u prozirnim polipropilenskim pločicama s 384 bunarića pomoću Infinite F200 PRO multimodalnog čitača mikropločica (Tecan, Männedorf, Švicarska). Koncentracija TBARS-a određena je na temelju modela dobivenog iz kalibracijske krivulje izrađene usporednim procesuiranjem standardnih uzoraka tetrabutilamonijeve soli MDA. Protokol je posebno adaptiran za svako tkivo i pokus kako bi se osigurala maksimalna osjetljivost metode.

#### **4.27.6. Određivanje koncentracije slobodnih tiolnih skupina i koncentracije niskomolekularnih tiola**

Koncentracija niskomolekularnih tiola (LMWT; engl. *low-molecular-weight thiols*) koji predstavljaju ključni element nukleofilnog tonusa (čiji je glavni i najzastupljeniji predstavnik GSH) te koncentracije slobodnih tiolnih skupina (SH; engl. *sulfhydryls*) koje predstavljaju doprinos molekularnih senzora očuvanju redoks homeostaze procijenjene su na temelju kvantifikacije nastanka 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline (TNB; engl. *5-thio-2-nitrobenzoic acid*) u reakciji sulfhidrila s 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzojevom kiselinom (DTNB; engl. *5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)*) (535,554,561). Ukratko, 25  $\mu$ l supernatanta homogenata (ili prilagođeni volumen na temelju koncentracije LMWT/SH-a) inkubiran je s 4% otopinom sulfosalicilne kiseline u volumnom omjeru 1:1 tijekom 60 min na ledu. Uzorci su centrifugirani tijekom 10 min na 10 000 RPM-a nakon čega je supernatant (30  $\mu$ l) izdvojen u zasebne tubice za mikrocentrifugu, a talog izdvojen od ostatne tekućine pažljivim izvrtanjem tubica na papirnati ručnik. Supernatant i talog u zasebnim su reakcijskim tubicama inkubirani s 35  $\mu$ l otopine DTNB-a (4 mg/ml u 5% otopini natrijevog citrata). Volumen otopine DTNB-a prilagođen je ovisno o uzorku tkiva kako bi se omogućila optimalna osjetljivost testa. Po završetku reakcije (nakon 10 min) u supernatantu iz obje reakcije izmjerena je apsorbancija na 405 nm pomoću Infinite F200 PRO multimodalnog čitača mikropločica (Tecan, Männedorf, Švicarska). Koncentracija LMWT-a i SH-a izračunata je na temelju molarnog ekstinkcijskog koeficijenta od  $14\,150\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Dostatnost otopine 5% citrata da postigne neutralnost u uzorku taloga i supernatantu (s obzirom da je ekstinkcijski koeficijent procijenjen pri neutralnom pH

te da se TNB taloži u kiselom pH) potvrđena je pomoću papirnato g indikatora kiselosti te dodatno neposredno uređajem za mjerenje pH u pokusu u kojem je istovjetnim protokolom analiziran pseudouzorak (BSA podešen na proteinsku koncentraciju uzorka otopljen u puferu za lizu) uz volumno povećanje svih reagensa, poštujući volumne i koncentracijske omjere.

#### 4.27.7. Određivanje aktivnosti katalaza i peroksidaza

Aktivnost katalaza i peroksidaza, enzima koji sudjeluju u održavanju redoks homeostaze, procijenjena je posredno na temelju kvantifikacije promjene koncentracije  $H_2O_2$  prilikom inkubacije s uzorcima. Koncentracija  $H_2O_2$  izmjerena je pomoću protokola koji je originalno predložio Hadwan za procjenu aktivnosti katalaze (574) uz modifikacije opisane u radovima autora (535,554,561,570,575,576). Ukratko, radna otopina  $H_2O_2$  pufera pripravljena je razrjeđivanjem 30% otopine  $H_2O_2$  u PBS-u tako da se dobije 10 mM  $H_2O_2$ . Pomoću radne otopine  $H_2O_2$  izrađeno je 10 serijskih razrjeđenja pufera u PBS-u (1-10 mM  $H_2O_2$ ) kako bi se dobio niz standardnih otopina s kojima se kasnije provjerava valjanost kolorimetrijskog indikatora te linearnost eseja. Radna otopina  $Co(NO_3)_2$  (kolorimetrijski indikator i reagens za zaustavljanje reakcije) pripravljena je na način da je 5 ml otopine  $Co(NO_3)_2 \times 6H_2O$  (0,1 g otopljeno u 5 ml dd $H_2O$ ) pomiješano s jednakim volumenom otopine natrijevog heksametafosfata (0,05g ( $NaPO_3$ )<sub>6</sub> otopljeno u 5 ml dd $H_2O$ ). Dobivena otopina ukupnog volumena od 10 ml dodana je uz intenzivno miješanje pomoću magnetske mješalice u 90 ml otopine  $NaHCO_3$  (8,1 g  $NaHCO_3$  otopljeno u 90 ml dd $H_2O$ ). Ispravnost indikatorske otopine provjerena je na temelju dodavanja 150  $\mu$ l radne otopine  $Co(NO_3)_2$  u 40  $\mu$ l serijskih razrjeđenja otopina  $H_2O_2$  (1-10 mM  $H_2O_2$ ) na polistirensku pločicu s 96 bunarića. U trenutku miješanja otopine  $H_2O_2$  i radne otopine  $Co(NO_3)_2$  kobalt (II) biva oksidiran u kobalt (III) u reakciji koja u prisutnosti bikarbonatnih iona pogoduje nastanku karbonat-kobaltatnih (III) kompleksa ( $[Co(CO_3)_3]Co$ ) koji su karakterizirani izraženom zelenom bojom te apsorpcijskim vršcima na 440 i 640 nm. Apsorbancija uzoraka izmjerena je pomoću 450 nm filtera (440-460 nm) multimodalnim čitačem mikropločica Infinite F200 PRO (Tecan, Männedorf, Švicarska). Prilikom svake pripreme reagensa testiranjem serijskih razrjeđenja  $H_2O_2$  provjereno je zadovoljava listandardna krivulja dva kriterija: i) koeficijent determinacije ( $R^2$ ) veći od 99,0%; ii) nagib krivulje omogućava preciznost mjerenja koja je jednaka pri promjenama u rasponu od 1 do 3 mM  $H_2O_2$  kao preciznost u rasponu od 8 do 10 mM  $H_2O_2$ . Ukoliko su oba kriterija bila

zadovoljena reagensi su korišteni za određivanje optimalnih volumena radne otopine 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  i radne otopine  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$  na način da je nasumično odabran uzorak (30  $\mu\text{l}$  za supernatante homogenata tkiva mozga; 4-8  $\mu\text{l}$  za supernatante homogenata tkiva crijeva) bio inkubiran s 40  $\mu\text{l}$  radne otopine 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  tijekom 0 sekundi ( $t = 0$  s; bazalno mjerenje) nakon čega je reakcija zaustavljena dodavanjem 150  $\mu\text{l}$  radne otopine  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ . Potom je isti uzorak u odvojenom bunariću inkubiran s 40  $\mu\text{l}$  radne otopine 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  tijekom 120 sekundi ( $t = 120$  s; završno mjerenje) nakon čega je reakcija zaustavljena dodavanjem 150  $\mu\text{l}$  radne otopine  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ . Razlika apsorbancije završnog i bazalnog mjerenja odražava uzorkom posredovanu razgradnju  $\text{H}_2\text{O}_2$  koju je moguće precizno odrediti pomoću kalibracijske krivulje. Ukoliko u prvom probnom mjerenju nije bilo razlike koja je iznosila bar 2 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  uvjeti esaja modificirani su na način da je povećan volumen uzorka, i/ili produljeno vrijeme reakcije. Navedene modifikacije potrebno je provesti imajući na umu da: i) povećanje volumena uzorka doprinosi pozadinskom šumu (unošenjem tvari koje apsorbiraju svjetlost duž apsorbancijskog spektra) te povećanju koncentracije tvari koje sačinjavaju biokemijski matriks (a koje mogu ući u interakciju s katalazom ili peroksidazama); ii) kinetika enzimatske dekompozicije  $\text{H}_2\text{O}_2$  u pravilu se vjerodostojno može opisati logaritamskom krivuljom iz čega slijedi da će produljenje vremena reakcije imati tek ograničenu važnost u kontekstu prilagodbe reakcije (budući da se glavina razgradnje događa u vremenu od 120 s koje je korišteno prilikom probnog ispitivanja). Kad su određeni optimalni uvjeti reakcije (volumen supernatanta, volumen i koncentracija  $\text{H}_2\text{O}_2$ , volumen radne otopine  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ ), esej se provodi na svim uzorcima i to na način da se: 1) svi uzorci odlože pomoću pipete na polistirensku pločicu s 96 bunarića u duplikatu; 2) po jedan bunarić od svakog uzorka prvo inkubira s odabranim volumenom radne otopine  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$  (najčešće 150  $\mu\text{l}$ ), a neposredno zatim s odabranim volumenom radne otopine 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  (najčešće 40  $\mu\text{l}$ ) kako bi se dobio uvid u pozadinski signal ( $t = 0$  s; bazalna vrijednost uzorka) uzimajući u obzir moguću pasivnu (apsorbancijski šum) i aktivnu (reakcija s komponentama radne otopine  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ ) interferenciju; 3) drugi bunarić sa svakim uzorkom inkubira s jednakim volumenom radne otopine 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  (istovjetan korištenom pri inkubaciji za bazalnu vrijednost uzorka pod 2) tijekom odabranog vremena  $t$  (u pravilu između 60 i 120 s) nakon čega se u otopinu doda jednaki volumen radne otopine  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$  (istovjetan korištenom pri inkubaciji za bazalnu vrijednost uzorka pod 2). Mjerenjem apsorbancije drugog bunarića dobiva se uvid u završnu vrijednost uzorka (nakon završene i zaustavljene disocijacije  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Pomoću multimodalnog čitača mikropločica Infinite F200 PRO (Tecan, Männedorf, Švicarska) automatski se očitaju vrijednosti apsorbancija bunarića te se za svaki pojedini uzorak pomoću standardne krivulje (uračunavajući pozadinski

apsorbancijski šum uzorka ukoliko isti postoji, primjerice prilikom mjerenja rijetkih uzoraka tkiva s niskom razinom endogene aktivnosti katalaze kao što je slučaj u mozgu) iz linearnog modela izračunavaju vrijednosti bazalne ( $t = 0$  s; 10 mM  $H_2O_2$  podešeno za moguću interferenciju) i završne koncentracije  $H_2O_2$ . Razlika koncentracija potom se korigira za vrijeme reakcije, a razlike u koncentraciji proteina u uzorku korigiraju se uvođenjem vrijednosti proteina kao kovarijate u matematički model. Aktivnost peroksidaza mjeri se na istovjetan način s tim da se spravlja nova radna otopina 10 mM  $H_2O_2$  koja sadrži 0,025 mM natrijev azid (AZD) koji pri ovoj koncentraciji preferencijalno inhibira katalazu (za inhibiciju 50% aktivnosti katalaze potrebno je 0,025 mM AZD-a, dok je za inhibiciju 50% aktivnosti peroksidaza potrebna 0,15 mM koncentracija AZD-a)(577). Dodavanjem inhibitora modificirani pokus pokazuje svojstvo obogaćene osjetljivosti na promijenjenu aktivnost peroksidaza. Pokus se provodi na način da se prvo izradi kalibracijska krivulja koja treba zadovoljiti istovjetne kriterije ( $R^2$  te osjetljivost nevezana za koncentraciju) kao što je opisano ranije. Inkubacija uzoraka provodi se na istovjetan način kao što je opisano ranije za inkubaciju s radnom otopinom  $H_2O_2$  koja ne sadržava AZD. Nakon što su iz nove kalibracijske krivulje izračunate vrijednosti koncentracija  $H_2O_2$  u početnim i završnim točkama matematičkim modeliranjem pomoću dobivenih se vrijednosti može dobiti uvid u ukupni kapacitet disocijacije  $H_2O_2$  (promjena koncentracije korigirana za bazalnu vrijednost), aktivnost katalaza (ukupna aktivnost korigirana za aktivnost rezidualnih peroksidaza i bazalnu vrijednost), te aktivnost peroksidaza (promjena koncentracije u prisutnosti AZD-a korigirana za bazalnu vrijednost).

#### **4.27.8. Procjena disocijacije $H_2O_2$ posredovane citokromom c**

Disocijacija  $H_2O_2$  posredovana citokromskim kompleksom (citokrom c) (561) istražena je pomoću metode koju su izvorno opisali Feissner i suradnici (561,578). Ukratko, volumeni supernatanta homogenata, koji odgovaraju 70  $\mu$ g proteina, pomiješani su u volumnom odnosu 1:1 s puferom za uzorke (2 ml glicerol, 0,6 g SDS, 2,5 ml 0,1 M Trizma® baza (pH 6,7), 3 mg bromfenol-modrila, 6 ml ddH<sub>2</sub>O) u koji je dodano 10%  $\beta$ -merkaptotetanol. Volumen koji odgovara 35  $\mu$ g proteina položen je mikropipetom na 3,9% natrij-dodecil-sulfat-poliakrilamidni gel (SDS-PAGE; engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) za koncentriranje (2,5 ml 0,4% SDS u 0,5 M Trizma® HCl, pH 6,8; 1,3 ml



30% akrilamid/0,8% bisakrilamid; 140  $\mu$ l 10% amonijev persulfat; 10  $\mu$ l N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (TEMED); 6,1 ml ddH<sub>2</sub>O) izliven na 9% SDS-PAGE gelu za razdvajanje (5 ml 0,4% SDS u 1,5 M Trizma® HCl, pH 8,8; 6 ml 30% akrilamid/0,8% bisakrilamid; 240  $\mu$ l 10% amonijev persulfat; 13,2  $\mu$ l TEMED; 8,6 ml ddH<sub>2</sub>O) u puferu za razdvajanje (10 ml 10% SDS; 3 g Trizma™ baza; 11,52 g glicina; dH<sub>2</sub>O do 1000 ml). Uz uzorke na gel je nanesen i referentni standard (Precision Plus Protein™ Standard; Bio-Rad Laboratories, Inc., SAD) za određivanje molekularne mase. Elektroforeza je provedena uz fiksni napon od 150 V u trajanju od 60 min pomoću Mini-PROTEAN Tetra cell (Bio-Rad Laboratories, Inc., SAD) te su proteini potom iz akrilamidnog gela prebačeni na nitroceluloznu membranu (Amersham Protran 0.45; GE Healthcare Life Sciences, SAD) mokrim transferom u puferu za prijenos (105 g glicin; 22,32 g Trizma™ baza; dH<sub>2</sub>O do 1000 ml) pri fiksnom naponu od 100 V u trajanju od 60 minuta. Nakon prijenosa proteina membrana je isprana u PBS-u te inkubirana u reagensu za pojačanu kemiluminiscenciju (SuperSignal™ West Femto; Thermo Fisher Scientific, SAD). Luminiscencija membrane izmjerena je pomoću MicroChemii snimača za kemiluminiscenciju visoke osjetljivosti s GelCapture softverom (DNR Bio-Imaging Systems Ltd., Izrael). Disocijacija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> procijenjena je pomoću denzitometrijske analize signala.

#### **4.27.9. Posredno određivanje aktivnosti superoksid-dismutaza na temelju inhibicije autoksidacije 1,2,3-trihidroksibenzena**

Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD; *engl. superoxide dismutase*) izmjerena je posredno na temelju određivanja inhibicije autoksidacije 1,2,3-trihidroksibenzena (THB) pomoću protokola kojeg su originalno predložili Marklund i Marklund (579) uz manje modifikacije (533,535,554,575,580). THB je otopljen u otopini 1 mM HCl na način da je završna koncentracija iznosila 60 mM THB (THB je otopljen pri niskom pH s obzirom da je autoksidacija ovisna o kiselosti medija). Radni pufer za mjerenje aktivnosti SOD-a pripremljen je otapanjem 0,05 M Tris-HCl te 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA u ddH<sub>2</sub>O uz podešenje pH na 8,2. Supernatanti homogenata odloženi su u bunariće polistirenske mikropločice s 96 bunarića (3  $\mu$ l uzorka duodenuma, 6  $\mu$ l uzorka ileuma i kolona, 10  $\mu$ l uzorka mozga, uz potrebne modifikacije na temelju aktivnosti enzima te postupka pripreme pojedine grupe uzoraka). Otopina za reakciju pripremljena je dodavanjem 80  $\mu$ l otopine THB-a u 4000  $\mu$ l radnog pufera

uz intenzivno miješanje te odlaganje u bunariće mikropločice pomoću multipipete bez odgode (s obzirom da neutralizacija otopine THB-a pokreće postupak autoksidacije). Neposredno po dodavanju otopine za reakcije mikropločica je postavljena u Infinite F200 PRO multimodalni čitač mikropločica (Tecan, Männedorf, Švicarska) prethodno namješten u način rada za cikličko snimanje. Apsorbancija pri 450 nm snimana je ponavljano u kinetičkim intervalima od maksimalno 30 s tijekom minimalno 300 s. S obzirom da THB autoksidira stvaranjem superoksidnih radikala aktivnost enzima prisutnog u uzorku obrnuto je proporcionalna porastu apsorbancije pri 450 nm koji odražava autoksidaciju te koji se može u prvih 300 s u pravilu opisati linearnom krivuljom karakteriziranom stalnim nagibom. S obzirom da je moguće da tvari prisutne u uzorku mogu pospješiti nastanak superoksidnih radikala te ubrzati autoksidaciju u nekoliko se bunarića uz uzorke snimaju i kontrolni uzorci u kojima se proces autoksidacije događa u odsustvu uzorka. Navedeni postupak pruža uvid u ukupnu aktivnost SOD-a. Aktivnost Cu/Zn-SOD-a koja se nalazi u citoplazmi može se inhibirati pomoću kalijevog cijanida (KCN; engl. *potassium cyanide*)(577,581,582) što je iskorišteno u svrhu mjerenja diferencijalne aktivnosti enzima (tj. mjerenja aktivnosti isključivo mitohondrijske frakcije). Aktivnost Mn-SOD-a, enzima koji prvenstveno predstavlja mitohondrijsku frakciju SOD-a, izmjerena je dodavanjem 2 mM KCN u radni pufer (radni pufer za mjerenje aktivnosti Mn-SOD-a: 0,05 M Tris-HCl, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, te 2 mM KCN otopljeni u ddH<sub>2</sub>O-a uz podešavanje pH na 8,2). Aktivnost ukupnog SOD-a te citoplazmatske i mitohondrijske frakcije enzima može se usporediti matematičkim modeliranjem na način da se aktivnost ukupne ili pojedine frakcije uvede u model kao kovarijata (uz kovarijatu koncentracije proteina u uzorku za koju je nužno korigirati s ciljem ujednačavanja mogućih razlika unesenih tijekom pripreme uzoraka).

#### **4.28. Priprema tkivnih rezova iz parafinskih kocki pomoću mikrotoma**

Tkivni rezovi iz prethodno pripremljenih parafinskih kocki dobiveni su pomoću mikrotoma. Mikrotom je podešen kako bi debljina reza za parafinske kocke s uklopljenim transverzalnim presjecima crijeva iznosila 7  $\mu\text{m}$ . Parafinske kocke pripremljene su za postupak rezanja ekvibracijom uz hidriranje tkiva u spremniku s ledom nakon čega su kocke fiksirane za postolje uređaja. Pažljivim povlačenjem noža dobiveni su prerezi tkiva debljine 7  $\mu\text{m}$  koji su kistom prebačeni u grijanu vodenu kupelj gdje su rezovi bili odloženi do trenutka kad se tkivo u potpunosti ekvibriralo te raširilo. Rašireno tkivo pokupljeno je prethodno pripremljenim mikroskopskim stakalcima s pojačanim adhezivnim svojstvima (Superfrost Plus™ Gold Adhesion, EpreDia, SAD). Mikroskopska stakalca s rezovima tkiva osušena su na sobnoj temperaturi (534).

#### **4.29. Priprema tkivnih rezova iz fiksiranih i krioprezerviranih zaleđenih uzoraka pomoću kriostata**

Tkivni rezovi fiksiranih i krioprezerviranih zaleđenih uzoraka dobiveni su pomoću kriostata nakon uklapanja u vodotopivu polimerizacijsku smolu za rezanje na kriostatu (Tissue-Tek® O.C.T., Sakura, Japan). Uzorci su izvađeni iz zamrzivača gdje su pohranjeni na  $-80^{\circ}\text{C}$  te su zagrijani na temperaturu od  $-25^{\circ}\text{C}$  pri kojoj su podvrgnuti rezanju. Uzorci su prvo narezani pomoću skalpela i škarića na način da su cjeloviti komadi probavne cijevi izrezani pomoću nekoliko transverzalnih presjeka kako bi se dobili cilindri duljine 3 mm. Crijevni cilindri postavljeni su na držač za rezanje tkiva pomoću polimerizacijske smole na način da je svakim rezom moguće dobiti 4-5 reprezentativnih transverzalnih rezova za segment od interesa. Tkivni rezovi potom su položeni na adhezivna mikroskopska stakalca prislanjanjem stakalaca ekvilibriranih na sobnu temperaturu uz tkivni rez. Rezovi tkiva osušeni su na sobnoj temperaturi kako bi se ojačalo prianjanje (553).

### **4.30. Analiza mucina alcijanskim modrilom 8GX**

Alcijansko modrilo (ABL; engl. *alcian blue*) tetravalentna je kationska boja koju sačinjava kompleks bakra i ftalocijanata s četiri izotiouronijske skupine koje su zbog kvaternih amonijevih iona pozitivno nabijene te stupaju u interakciju s polianionima. Otopina alcijanskog modrila 8GX (Sigma-Aldrich, SAD) pripravljena je otapanjem u 3% octenoj kiselini kako bi se dobila otopina koncentracije od 1%. Otopina je filtrirana, a pH je podešen na 2,5 kako bi se karboksilirani i sulfatirani mucini ionizirali u obliku  $\text{RCOO}^-$  i  $\text{SO}_3^{2-}$  što omogućava prikaz svih kiselih mucina u plavoj boji.

#### **4.30.1. Histološka analiza mucina alcijanskim modrilom 8GX**

Histološka analiza tkiva alcijanskim modrilom 8GX na tkivnim rezovima dobivenima iz parafinskih kocki pomoću mikrotoma provedena je na način da su mikroskopska stakalca s tkivom prvo podvrgnuta procesu deparafinizacije i rehidracije. Stakalca su položena u stakleni držač koji je potom uronjen 2 x 10 min u otopinu ksilena, 2 x 10 min u otopinu 100% etanola, 2 x 10 min u otopinu 96% etanola, 2 x 10 min u otopinu 70% etanola, te 15 min u dH<sub>2</sub>O. Stalak s mikroskopskim stakalcima potom je uronjen u 1% otopinu ABL-a na 15 min nakon čega je višak boje uklonjen pod tekućom vodom. Po ispiranju tekućom vodom tkivo je isprano u destiliranoj vodi te ponovno dehidrirano skraćenim postupkom uranjanja 2 x 5 min u 70% otopini etanola, 2 x 5 min u 96% otopini etanola, 2 x 5 min u 100% otopini etanola, te 2 x 5 min u otopini ksilena. Na uzorke je odloženo nekoliko kapi smole na bazi ksilena te je tkivo pažljivo poklopljeno pokrovnim stakalcem.

#### **4.30.2. Analiza sluzi metodom otiska alcijanskim modrilom 8GX**

Analiza mrlje alcijanskim modrilom 8GX provedena je na supernatantima homogenata tkiva i na uzorcima fecesa s ciljem procjene ukupne količine mucina te na uzorcima probavne sluzi s ciljem procjene agregacijskih svojstava sluzi te prostorne raspodjele agregata (553). Uzorci za analizu (2  $\mu$ l) položeni su pomoću mikropipete na adhezivna mikroskopska stakalca te osušeni na zraku uz zagrijavanje na 40 °C na laboratorijskoj miješalici. Stakalca s uzorcima uronjena su u 1% otopinu ABL-a tijekom 15 min nakon čega je suvišna boja otklonjena sa stakalca uz pomoć tekuće vode. Uzorci su isprani u dH<sub>2</sub>O-u, osušeni te digitalizirani pomoću uredskog skenera. Količina kiselih mucina kvantificirana je na temelju procjene integrirane gustoće signala za uzorke fecesa i tkiva. Prostorna raspodjela te agregacija u uzorcima probavne sluzi izmjereni su pomoću procjene veličine, broja i distribucije čestica segmentiranog signala te pomoću prostorne analize intenziteta piksela ponavljanim linijskim uzorkovanjem.

### 4.31. Otkrivanje tkivnih epitopa

Tkivni rezovi podvrgnuti su postupku otkrivanja epitopa prije imunohistokemije i imunodetekcije pomoću višestrukog pojačavanja fluorescentnog signala. Odvajanje tkivnih rezova od adhezivnih mikroskopskih stakalaca spriječeno je na način da su 2 međurazdvojnika jednake debljine izrađena od kombinacije 90% celuloze i 10% pamuka postavljena na krajeve mikroskopskog stakla na način da ne dotiču tkivo. Drugo mikroskopsko staklo položeno je na međurazdvojnike te je fiksirano pomoću izolacijske vrpce od PVC-a. Uzorci su položeni u spremnik ispunjen otopinom za otkrivanje epitopa (10 mM natrijev citrat, 0,05% Tween 20, pH 6) te su zagrijani na 95 °C tijekom 60 min. Nakon grijanja u otopini za otkrivanje epitopa uzorci su pažljivo uklonjeni iz spremnika i isprani u destiliranoj vodi. Alternativni postupak otkrivanja epitopa koje nije bilo moguće prikazati navedenim postupkom uključivao je uranjanje uzoraka u otopinu za enzimsko otkrivanje epitopa (0,05% tripsin, 1% CaCl<sub>2</sub>, pH 7,8). Nakon otkrivanja epitopa uzorci su postavljeni u uređaj za uklanjanje autofluorescencije (534).

#### **4.32. Uklanjanje tkivne autofluorescencije osvjetljavanjem**

Autofluorescencija endogenih staničnih komponenti te autofluorescencija uzrokovana postupkom fiksacije tkiva uklonjena je pomoću izrađenog uređaja za osvjetljavanje tkiva (534). Nakon postupka otkrivanja epitopa uzorci su postavljeni u spremnik uređaja za uklanjanje autofluorescencije zajedno sa zaštitnim stakalcima i međurazdvojnica kako bi se spriječilo odvajanje tkiva od adhezivnog stakalca tijekom postupka uklanjanja autofluorescencije. Uzorci su položeni u otopinu 0,05% AZD-a u PBS-u na način da su sva tkiva na jednak način bila okrenuta prema izvoru svjetlosti. Modificirana ploča svjetlećih dioda punog spektra snage 300 W izvorno namijenjena za hidroponiku pretvorena je u izvor svjetlosti koji ravnomjerno osvjetljava uzorke pohranjene u spremnik u tekućinom. Uređaj je zatvoren na način da se spriječi isparavanje tekućine te su uzorci podvrgnuti osvjetljavanju tijekom 48 h (583,584).



### 4.33. Imunofluorescencijska analiza

Imunofluorescencijska analiza provedena je na tkivima koja su podvrgnuta postupku otkrivanja epitopa i uklanjanja tkivne autofluorescencije kao što je opisano u literaturi (534). Na svako stakalce nanosena je otopina 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u PBS-u kako bi se prigušio signal ostatne aktivnosti peroksidaza. Nakon 15 min inkubacije uzorci su isprani u PBS-u tijekom 5 minuta nakon čega je na stakalca položena otopina za blokiranje (5% normalnog kozjeg seruma, NGS; *engl. normal goat serum*, u PBS-u s 0,25% Tritona X-100). Otopina za blokiranje ravnomjerno je raširena po tkivu korištenjem PVC pokrovnica. Nakon 60 min blokiranja pokrovnice su uklonjene te je tkivo inkubirano s otopinom za inkubaciju (1% NGS i 0,25% Triton X-100 u PBS-u) u kojoj su razrijeđena protutijela (bs-1559R mješavina zečjih poliklonalnih IgG protutijela za GLP-1 receptor (GLP-1R)) (Bioss, SAD) te pERK (#4370S monoklonalnog protutijela na fosfopeptid koji odgovara fosforiliranom treoninu 202 i tirozinu 204 (Cell Signaling Technologies, SAD)) u volumnom omjeru 1:500. Otopine protutijela na mikroskopskim stakalcima pokrivene su PVC pokrovnica kako bi se osigurala ravnomjerna raspodjela. Protutijela su inkubirana 24 sata na 4 °C u mraku i uspremniku s visokim udjelom vlage kako bi se spriječilo isušivanje tijekom inkubacije. Nakon inkubacije pokrovnice su uklonjene, a tkivo je postavljeno u držač stakalaca te je isprano 3 x 5 min u PBS-u. Tijekom ispiranja pripremljena je otopina za inkubaciju u kojoj su razrijeđena sekundarna protutijela specifična za Fc fragment primarnih zečjih IgG-a na koja su konjugirane fluorofore Alexa Fluor® 488 ili Alexa Fluor® 555 (Cell Signaling Technology, Inc., SAD) u volumnom omjeru 1:750. Otopine su položene na uzorke koji su zatim pokriveni pomoću PVC pokrovnica, a inkubacija je trajala 90 min na sobnoj temperaturi u komori s visokim udjelom vlage u mraku. Nakon inkubacije uzorci su postavljeni u stakleni držač i isprani 3 x 5 min u PBS-u kako bi se uklonila suvišna nevezana sekundarna protutijela. Nakon ispiranja na uzorke je nanosena otopina za poklapanje uz dodatak tvari za čuvanje fluorescencije te boje DAPI *Fluoromount-G™ Mounting Medium with DAPI* (Invitrogen, SAD). Uzorci su osušeni u mraku na sobnoj temperaturi te su nakon toga dugoročno čuvani u spremniku na 4 °C.

#### **4.34. Sinteza fluorescentnih derivata tiramida kao supstrata za odlaganje fluorescentnih biljega katalizirano peroksidazom hrena**

Sinteza fluorescentnih derivata tiramida koji su korišteni kao supstrati za odlaganje fluorescentnih biljega katalizirano peroksidazom provedena je kao što je opisano u literaturi (534). Biljezi su sintetizirani pomoću jednostavne reakcije sprežanja na način da je 1 mg tiramin-HCl-a (Sigma-Aldrich, SAD) otopljen u 100  $\mu$ l dimetilformamida (DMF)(Sigma-Aldrich, SAD). U otopinu je dodan 1  $\mu$ l 7,2 M trietilamina (Sigma-Aldrich, SAD)(u 1.25 ekvimolarnoj koncentraciji) s ciljem deprotonacije tiramina. Dobivena otopina (34  $\mu$ l) pomiješana je sa 100  $\mu$ l svježe spravljene otopine amin-reaktivnog N-sukcinimidil-estera vodotopivog stabilnog fluorofora Atto488 (Sigma-Aldrich, SAD) u DMF-u masene koncentracije 1 mg/ml. Otopina je žustro protresena te je reakcija provedena u mraku na sobnoj temperaturi tijekom 120 min. Nakon 120 min u otopinu je dodano 867  $\mu$ l etanola kako bi se dobila koncentrirana otopina hapteniziranog tiramida koja je potom pohranjena na 4 °C. Reakcija vezanja N-sukcinimidil-estera za amine izrazito ovisi o pH s obzirom da će pri niskom pH amino skupina biti protonirana što ne pogoduje reakciji, a pri visokom pH događa se izražena hidroliza estera što dramatičnu umanjuje efikasnost reakcije. Zbog toga je izrazito važno provoditi reakciju u kontroliranim uvjetima, primjerice nužno je provjeriti stabilnost te stupanj degradacije DMF-a prije korištenja kao kemijskog matriksa za reakciju.

#### **4.35. Imunodetekcija pomoću višestrukog pojačavanja fluorescentnog signala dostavljanjem peroksidaza združivanjem avidina i biotina uz katalizirano odlaganje fluorescentnih biljega**

Ultraosjetljiva imunodetekcija provedena je na način da su nakon vezanja primarnih protutijela na epitope od interesa na Fc fragment protutijela vezana biotinizirana sekundarna protutijela (534). Nakon ispiranja na mikroskopska je stakalca odložena otopina za inkubaciju u koju su dodana s biotinom konjugirana sekundarna protutijela (specifična za Fc fragment primarnih zečjih IgG-a) razrijeđena u volumnom omjeru 1:1000 (BA-1000; Vector Laboratories, SAD). Otopina sekundarnih protutijela ravnomjerno je raspoređena PVC pokrovnicama, a inkubacija je trajala 60 min na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, uzorci su isprani 3 x 5 min u PBS-u nakon čega su inkubirana sa svježe pripremljenom otopinom avidina i biotiniziranih HRP-ova (Vector Laboratories, SAD). Slaganje kompleksa avidina, biotina i biotiniziranih HRP-ova trajalo je 30 min na sobnoj temperaturi, a ravnomjerna raspodjela otopine osigurana je PVC pokrovnicama. Nakon vezanja biotiniziranih peroksidaza uzorci su isprani 3 x 5 min u PBS-u. Alternativni način dostave kompleksa HRP-a bazirao se na označavanju primarnih protutijela vezanih na epitope od interesa vezanjem sekundarnih protutijela (1:500-1:1000) koja su prethodno konjugirana s polimerima HRP-a (Poly-HRP)(Thermo Fisher Scientific, SAD). Nakon što su peroksidaze dostavljene u blizinu epitopa od interesa, bilo metodom stvaranja kompleksa avidina i biotina te biotiniziranih HRP-ova ili dostavljanjem sekundarnih protutijela konjugiranih s HRP polimerima, tkivo je inkubirano u otopini za katalizirano odlaganje fluorescentnih biljega. Otopina za katalizirano odlaganje fluorescentnih biljega sastojala se od 0,001% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i 0,1M imidazola u PBS-u, i pripremljena je kao svježa otopina netom prije reakcije. Koncentrirana otopina haptenziranog tiramida razrijeđena je u otopini za katalizirano odlaganje fluorescentnih biljega u volumnom omjeru 1:100 te je dobivena otopina pomoću pipete odložena na uzorke tkiva na stakalcima i pokrivena PVC pokrovnicama. Inkubacija je trajala 15 min na sobnoj temperaturi te je potom višak fluorescentnih konjugata tiramida ispran tijekom 5 min u PBS-u. U slučaju potrebe za dodatnim uklanjanjem autofluorescencije te pojačanjem omjera signala i šuma uzorci su inkubirani u otopini SBB-a (0,3% u 70% etanolu) tijekom 10 min (534,585,586). Višak SBB-a uklonjen je pomoću 70% etanola. Uzorci tkiva ekvilibrirani su u PBS-u te pokriveni otopinom za poklapanje uz dodatak tvari za čuvanje fluorescencije te boje DAPI (Invitrogen, SAD). Uzorci su osušeni u mraku na sobnoj temperaturi te su nakon toga dugoročno čuvani u spremniku na 4 °C. Imunodetekcija pomoću višestrukog pojačavanja fluorescentnog signala uz katalizirano odlaganje fluorescentnih

biljega korištena je za obilježavanje epitopa kaspaze-3 te nitrotirozina. Primarna protutijela korištena za vezanje epitopa bila su: i) poliklonalno zečje protutijelo na kaspazu-3 (Cell Signaling Technologies, SAD) koje se veže uz 35 kDa kaspazu-3 te pocijepani fragment od 17 kDa koji se prebacuje u jezgru tijekom aktivacije; ii) poliklonalno zečje protutijelo na nitrirani tirozin (Sigma-Aldrich, SAD).

#### 4.36. Analiza izražaja proteina u crijevu i mozgu Western blot metodom

Analiza izražaja proteina provedena je pomoću SDS-PAGE metode (534,561). Supernatanti homogenata pomiješani su u volumnom omjeru s puferom za uzorke (u koji je dodano 20%  $\beta$ -merkaptoetanol) u volumnom omjeru 1:1-2. Uzorci su zagrijani na 95°C tijekom 10 min. Izuzetak su bili uzorci korišteni za kvantifikaciju proteina osjetljivih na visoku temperaturu kod kojih je protokol grijanja bio modificiran (smanjivanjem temperature na 60 °C i/ili skraćivanjem vremena zagrijavanja). Volumeni pripremljenih uzoraka koji odgovaraju 35  $\mu$ g proteina položeni su pomoću mikropipete u jažice prethodno pripremljenih poliakrilamidnih gelova s dodatkom trihalo spojeva (TGX Stain-Free FastCast 12% polyacrylamide i TGX Stain-Free FastCast 10% polyacrylamide)(Bio-Rad, SAD). Kod paralelnog elektroforetskog razdvajanja većeg broja uzoraka korišteni su kalupi *Criterion* (Bio-Rad, SAD), dok su za pripremu gelova manje površine korištena stakalca kompatibilna s *Mini-PROTEAN* sustavom. Gelovi srednje veličine pripremljeni su miješanjem otopine A (6 ml po gelu) i otopine B (6 ml po gelu) za gelove za razdvajanje pomoću magnetske mješalice nakon čega je dodano 6  $\mu$ l TEMED-a i 60  $\mu$ l 10% otopine za svakih 12 ml mješavine otopina A i B. Dobivena otopina za gelove za razdvajanje pomoću pipete postavljena je u okomito fiksirane kalupe. Na gel za razdvajanje, izlivena je otopina gela za koncentriranje, koja je prethodno pripremljena na način da su u mješavinu otopine A (1,5 ml po gelu) i otopine B (1,5 ml po gelu) dodani TEMED (3  $\mu$ l po gelu) i 10% APS (15  $\mu$ l po gelu) uz neprekinuto miješanje pomoću magnetske mješalice. Otopina je pomoću pipete izlivena u kalup na gel za razdvajanje, te je s gornje strane postavljen češljic koji služi kao kalup za jažice. Gelovi male veličine dobiveni su na jednak način uz modificirane volumene navedenih otopina (gel za razdvajanje: otopina A (3 ml po gelu) i otopina B (3 ml po gelu) + TEMED (3  $\mu$ l po gelu) i 10% APS (30  $\mu$ l po gelu); gel za koncentriranje: otopina A (1 ml po gelu) i otopina B (1 ml po gelu) + TEMED (2  $\mu$ l po gelu) i 10% APS (10  $\mu$ l po gelu)). Nakon stvrdnjavanja, gelovi su postavljeni u odgovarajuće držače te u sustav za elektroforezu u koji je dodan pufer za razdvajanje (10 ml 10% SDS; 3 g Trizma™ baza; 11,52 g glicin; dH<sub>2</sub>O do 1000 ml). Uzorci i referentni proteinski standard za određivanje molekularne mase (Precision Plus Protein™ Standard; Bio-Rad Laboratories, Inc., SAD) položeni su u jažice te su proteini razdvojeni postavljanjem stalnog napona na 150-200 V. Nakon završetka razdvajanja, gelovi su izdvojeni iz kalupa i isprani u dH<sub>2</sub>O-u. Razdvojeni proteini vizualizirani su pomoću trihalo spojeva uklopljenih u matriks gela prosvjetljivanjem ultraljubičastim (UV; engl. *ultraviolet*) svjetlom pomoću UV transiluminatora *ChemiDoc MP*

sustava za oslikavanje (Bio-Rad, SAD). Podaci su pohranjeni za kasniju korekciju dobivenog signala na temelju kvantifikacije proteina, a gelovi su ekvilibrirani u Bjerrum Schafer-Nielsen (BSN) puferu za transfer u Petrijevoj zdjelici. Tijekom ekvibracije gela, pripremljeni su celulozni odstojnici za osiguravanje provodljivosti i tlaka tijekom transfera. U spremniku za prebacivanje *Trans-Blot Turbo* transfer sustava (Bio-Rad, SAD) za polu-sušo prebacivanje položeno je 7 odstojnika koji su potom navlaženi BSN puferom. Na odstojnike je pažljivo položen poliakrilamidni gel, a na gel nitrocelulozna membrana (veličina pora 0,2 ili 0,45  $\mu\text{m}$ ) koja je potom izvaljana pomoću valjka kako bi se uklonili mjehurići zraka te kako bi se osiguralo optimalno prijanjanje. Na membranu je položeno 7 odstojnika te je spremnik zatvoren i postavljen u uređaj za transfer proteina. Sve membrane podvrgnute su procesu transfera zasebno kako bi se izbjegle nejednakosti prilikom prijenosa koje se događaju u slučaju prekinutog kontinuiteta sendviča za prijenos. Prijenos proteina proveden je tijekom 7 min, uz stalni napon od 25V i jakost električne struje od  $\sim 2.5$  A. Nakon prijenosa, membrana je pažljivo izdvojena iz sendviča za transfer, isprana u  $\text{dH}_2\text{O}$ -u te odložena u otopinu 1% Ponceau S u 5% octenoj kiselini tijekom 5 min. Inkubacija u octenoj kiselini utišava ostatnu aktivnost peroksidaza (587), a Ponceau S omogućava vizualizaciju proteina čime se potvrđuje uspješno prebacivanje iz gela na membranu. Suvišna boja je isprana uranjanjem u pufer za ispiranje s niskom koncentracijom soli (LSWB; *engl. low-salt washing buffer*)(10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5) tijekom 10 min. Membrane su inkubirane u otopini za blokiranje (5% mlijeko u prahu bez masti, 0,5% Tween 20 u LSBW) na sobnoj temperaturi tijekom 60 min. Membrane su potom položene između dvije PVC folije te inkubirane u otopini za blokiranje u koju je dodano poliklonalno zečje protutijelo specifično za kaspazu-3 (Cell Signaling Technologies, SAD) u volumnom omjeru 1:500, protutijelo specifično za c-fos (Cell Signaling Technology, USA) u volumnom omjeru 1:1000 ili protutijelo specifično za GALK-1 (Invitrogen, USA) u volumnom omjeru 1:1000. Membrane su inkubirane na 4 °C tijekom 24 sata. Nakon inkubacije s primarnim protutijelom membrane su isprane 3 x 5 min u LSBW-u te inkubirane sa sekundarnim protutijelom konjugiranim za HRP specifičnim za Fc fragmente zečjih primarnih protutijela (Cell Signaling Technologies, SAD) u volumnom omjeru 1:2000 na sobnoj temperaturi tijekom 60 min. Nakon inkubacije membrane su isprane 3 x 5 min u LSBW-u nakon čega su HRP-ovi vizualizirani pomoću inkubacije membrana u otopini za kemiluminiscenciju na bazi luminola *SuperSignal™ West Femto* (Thermo Fisher Scientific, SAD). Membrane su tijekom inkubacije i snimanja signala bile pokriven PVC folijom radi ravnomjerne raspodjele reagensa. Luminiscencija je snimljena pomoću MicroChemi snimača za kemiluminiscenciju visoke osjetljivosti s GelCapture softverom (DNR Bio-Imaging

Systems Ltd., Izrael). Postupak je smatran valjanim jedino u slučaju kad je u pojedinoj kolumni bila vidljiva samo jedna traka na položaju koji odgovara pretpostavljenoj molekularnoj masi proteina. Ukoliko je traka bila prisutna na položaju pogrešne molekularne mase ili je bilo prisutno više od 1 trake u slučaju kad se vezanje protutijela očekivalo samo za 1 traku cijeli je postupak ponovljen uz modifikacije kako bi se povećala specifičnost metode. Kvantifikacija proteina provedena je na temelju obrade dobivenih snimaka.

#### 4.37. Analiza crijevnog mikrobioma

Crijevni mikrobiom analiziran je u sterilno prikupljenim intraluminalnim uzorcima prikupljenim iz cekuma po završetku *in vivo* pokusa. Deoksiribonukleinska kiselina (DNA; *engl. deoxyribonucleic acid*) izolirana je iz 0,2 g uzorka pomoću *Qiagen QIAmp Fast Mini Stool Kit* opreme (Qiagen, Njemačka) s početnim izdvajanjem pomoću kuglica po uzorku na protokol koji su opisali Yu i Morrison (588) uz manje izmjene. Priprema knjižnica za sekvenciranje 16S ribosomske ribonukleinske kiseline (rRNA; *engl. ribosomal ribonucleic acid*) bila je provedena u skladu sa smjernicama za izradu knjižnica za sekvenciranje *Illumina 16S Metagenomics Sequencing Library Preparation Guidelines*. Za amplifikaciju 16S rRNA gena korištene su V3 i V4 regije (589). Sve reakcije polimerazne lančane reakcije (PCR; *engl. polymerase chain reaction*) provedene su korištenjem cikličkim termostatom Thermal Cycler 2720 (Kapa Biosystems, SAD). Korišteni protokol za amplikone PCR-a bio je: 5 min 95 °C te 25 ciklusa koji su se sastojali od 30 s 95 °C, 30 s 55 °C, te 30 s 72 °C nakon čega je slijedio elongacijski korak (5 min 72 °C). Za indeks PCR-a korišten je Illumina Index set početnica u skladu s uputama proizvođača (Illumina, SAD). Produkti PCR-a pročišćeni su reverzibilnom imobilizacijom čvrste faze pomoću AMPure XP otopine s paramagnetskim kuglicama (Beckman Coulter, SAD) u skladu s Illumina smjernicama. Koncentracije pročišćenih amplikona izmjerene su pomoću Qubit dsDNA kita visoke osjetljivosti (Thermo Fisher Scientific, SAD) te Qubit 3.0 fluorimetra (Thermo Fisher Scientific, SAD) prije udruživanja. Knjižnica je potom sekvencirana na Illumina MiSeq platformi pomoću MiSeq V3 kita za reagense (Illumina, SAD). Analizu crijevnog mikrobioma provela je Fatma Koc temeljem suradnje s laboratorijem prof. Catherine Stanton i prof. Paula Rossa (*APC Microbiome Ireland* i *Teagasc Food Research Centre, Cork, Irska*).



#### **4.38. Analiza kratkolančanih masnih kiselina i masnih kiselina razgranatog lanca u sadržaju cekuma**

Analiza kratkolančanih masnih kiselina i masnih kiselina razgranatog lanca provedena je na uzorcima cekalnog intraluminalnog sadržaja pomoću protokola koji su prethodno opisali Lynch i suradnici (590) uz manje modifikacije. Uzorak cekalnog sadržaja (0,2 g) homogeniziran je u 1 ml zakiseljene vode (pH 2-3). Nakon filtracije štrcaljkom (s veličinom pora filtera od 0,2  $\mu\text{m}$ )(Corning, SAD), 270  $\mu\text{l}$  uzorka pomiješano je s 30  $\mu\text{l}$  10 mM internalnog standarda u duplikatu. Uzorci su protreseni vorteksom te centrifugirani kako je opisano u protokolu Lynch i suradnika (590). Nakon postupka centrifugiranja, 250  $\mu\text{l}$  uzorka prebačeno je u jantarne staklene bočice za plinsku kromatografiju od 2 ml (Agilent, SAD). Zasebne standardne krivulje pripremljene su mjerenjem gradiranih standardnih uzoraka acetata, propionata, butirata, i valerata između 0,1 i 10 mM, te izobutirata i izovalerata između 0,01 i 1 mM. Analiza standarda i uzoraka provedena je pomoću plinske kromatografije s plameno-ionizacijskim detektorom pomoću polietilenglikolnih kolumni modificiranih s nitrotetraftaličnom kiselinom za postizanje visoke polarosti za analizu volatilnih tvari i fenola DB-FFAP (30 ml x 0.32 mm ID x 0.25  $\mu\text{m}$  df; Agilent, SAD) te Varian 3800 sustava za plinsku kromatografiju (Varian, SAD) kao što je opisano u rukopisu Lynch i suradnika (590). Analizu SCFA-a i BCFA-a provela je Fatma Koc temeljem suradnje s laboratorijem prof. Catherine Stanton i prof. Paula Rossa (*APC Microbiome Ireland* i *Teagasc Food Research Centre, Cork, Irska*).

### 4.39. Analiza pomoću epifluorescencijskog mikroskopa

Analiza signala dobivenog *in vitro* bojanjem akridin narančastim, imunofluorescencijom, te kataliziranim odlaganjem fluorescentnih biljega provedeno je pomoću epifluorescencijskog mikroskopa Olympus BX51 i CellSens Dimensions softvera (Olympus, Japan). Za analizu signala korišteni su setovi filtera U-MNU2 (ekscitacija:  $365\pm 10$  nm; emisija: dugopropusni filter  $> 420$  nm), U-MNIB2 (ekscitacija:  $480\pm 20$  nm; emisija: dugopropusni filter  $> 510$  nm), te U-MWIG2 (ekscitacija:  $535\pm 30$  nm; emisija: dugopropusni filter  $> 580$  nm). Signal je sniman na način da je kod kvantifikacijskog bojenja, uvijek uz U-MNU2 filter (korišten za vizualizaciju DAPI fluorofora interkaliranog u DNA), korišten samo jedan dodatni filter za prikupljanje signala, dok je drugi služio za prikupljanje signala pozadinskog šuma radi određivanja korelacijskih matrica signala i utvrđivanja mogućeg doprinosa endogenih autofluorofora prikupljenom signalu. Podaci su prikupljeni na način sukladan prethodno osmišljenim protokolima za prikupljanje koji su uzimali u obzir hijerarhijsku strukturu bioloških podataka te rasap vrijednosti pojedine varijable. Primjerice, kod signala prikupljenog iz resica duodenuma snimljene su slike više resica svakog presjeka i više presjeka koji su odražavali biološke promjene na jednako udaljenim područjima s obzirom na zamišljenu longitudinalnu os koja prolazi probavnom cijevi (na svakom stakalcu nalazilo se otprilike 3 seta od 8 transverzalnih presjeka). Uzorci prikupljeni na ovaj način omogućavaju znatno veću preciznost same metode ukoliko se tijekom matematičke analize ispravno definira hijerarhijska međuzavisnost pojedinih mjerenja.

## 4.40. Analiza slika

### 4.40.1. Morfometrijska analiza probavne barijere

Morfometrijska mjerenja provedena su na mikroskopskim slikama s ciljem analize strukturnih elemenata barijere probavnog sustava te analize raspodjele i funkcije vrčastih stanica. Struktura i funkcija barijere gornjeg dijela probavnog sustava ispitane su kao što je opisano u (534). Ukratko, raspodjela epitelnih stanica smještenih duž probavne barijere u duodenumu ispitana je na temelju položaja jezgara epitelnih stanica na način da su, na setu snimaka stanica epitelne barijere čije su jezgre označene interkalacijom DAPI-ja u DNA, dobivenih pomoću U-MNU2 filtera, izmjerene udaljenosti: i) središta jezgara epithelnih stanica od središta jezgara susjednih stanica smještenih lateralno; ii) središta jezgara od luminalnog vrška mjerene stanice. Tijekom analize visine i širine epitelnih stanica uzet je u obzir njihov položaj te međuovisnost pojedinih stanica. Morfometrijska analiza indikatora staničnog obrtaja uključivala je mjerenje duljine resica, mjerenje dubine kripte, te procjenu omjera visine resice i dubine susjednih kripte (591–593). Duljina resica izmjerena je uzimajući u obzir sve neravnine epitelne površine resica. Morfometrijska analiza vrčastih stanica opisana je detaljno u dostupnim literaturnim izvorima (553). Analiza vrčastih stanica uključivala je: i) procjenu broja vrčastih stanica; ii) procjenu epitelne površine između linija kojima je središte alcijanofilnih vezikula povezano s najbližim dijelom površine epitela, pri čemu veća udaljenost ukazuje na slabiju pokrivenost barijere probavnom sluzi; iii) procjenu vjerojatnosti ekspulzije probavne sluzi mjerenjem oblika alcijanofilnih mjehurića (jer jasna okrugla struktura ukazuje na to da ispuštanje sluzi nije započelo) te mjerenjem udaljenosti najluminalnije točke mjehurića od epitelne površine (s obzirom da je vezanje mjehurića uz epitelnu površinu nužan uvjet za ispuštanje probavne sluzi u lumen); iv) određivanje udaljenosti najluminalnije točke mjehurića od lumena probavne cijevi uzimajući u obzir položaj alcijanofilnih mjehurića duž osi resice.

#### **4.40.2. Procjena količine probavne sluzi**

Količina probavne sluzi, u pokusima u kojima je lučenje probavne sluzi iz vrčastih stanica procijenjeno u uvjetima farmakološke kolinergičke stimulacije *ex vivo*, opisano je u (553). Količina probavne sluzi procijenjena je na uzorcima tkiva obojanim alcijanskim modrilom, posredno, na temelju mjerenja površine segmentiranih maski. Mikroskopske fotografije prvo su obrađene inverzijom intenziteta piksela nakon čega je provedeno razdvajanje boja. Crveni je kanal obrađen postavljanjem praga pomoću algoritma Renyi entropije (594). Maske dobivene postavljanjem praga analizirane su algoritmom za analizu čestica u programu Fiji. Područja interesa unutar kripti, resica, te intraluminalnog područja ručno su definirana kao kvadrati površine 240 000 piksela<sup>2</sup> (800 x 300 piksela). Količina sluzi procijenjena je na temelju ukupne površine segmentiranih maski.

#### **4.40.3. Morfometrijska analiza kapi probavne sluzi *in vitro***

Kapi probavne sluzi, odložene na mikroskopska stakalca, analizirane su kako bi se dobio uvid u prostornu raspodjelu alcijanofilne i akridinofilne tvari. Morfometrijska analiza raspodjele alcijanofilne tvari opisana je u (553). Agregacija alcijanofilne tvari na periferiji kapi sluzi analizirana je mjerenjem linijskih profila intenziteta u programu Fiji (NIH, SAD). Izdvojeni vršak intenziteta u linijskom profilu, izmjenom od središta kapi do pozadinske točke koja je udaljena od ruba kapi jednako koliko je rub kapi udaljen od središta, ukazivao je na pojačano područje agregacije. Analiza agregacije akridinofilne tvari provedena je na temelju analize površine i broja segmentiranih čestica dobivenih pomoću razdvajanja boja, određivanja praga signala pomoću algoritma trokutastog postavljanja praga, te analize čestica algoritmom za analizu čestica u programu Fiji. Za akridinofilne čestice isti je postupak proveden na setu mikroskopskih slika dobivenom korištenjem dva različita filtera za epifluorescentno oslikavanje (U-MNIB2 te U-MWIG2). Agregacija akridinofilne tvari dodatno je analizirana pomoću linijskih profila intenziteta povučeni kroz agregacijsku zonu na način da su rubovi profila bili s obje strane zone agregacije kapi sluzi.

#### 4.40.4. Analiza mikroskopskih slika dobivenih imunofluorescencijom i kataliziranim odlaganjem fluorescentnih biljega

Mikroskopske slike dobivene epifluorescencijskim oslikavanjem analizirane su na način da su setovi slika prvo uvedeni u program Fiji (NIH, SAD), te su potom slike dobivene pomoću U-MNU2 i U-MNIB2 setova filtera korištene za analizu signala dok su slike dobivene pomoću U-MWIG2 seta filtera korištene za kontrolu zaostatne autofluorescencije. Prilikom analize jezgrenog signala, slike položaja staničnih jezgara, obilježenih fluoroforom DAPI (set filtera U-MNU2), korištene su za izračunavanje jezgrenih maski pomoću kojih je provedena daljnja segmentacija. Maske su izrađene pomoću segmentacije na bazi piksela korištenjem algoritama strojnog učenja u sklopu paketa za treniranje Weka segmentacijom (595). Algoritmi *Watershed* i *Fill Holes* korišteni su u postupku ispravljanja nepravilnosti te su dobivene maske pomoću algoritma za analizu čestica preusmjerene na set podataka s primarnim signalom (U-MNIB2), koji je prethodno obrađen algoritmom za utišavanje pozadinskog šuma oduzimanjem pozadine postupkom kotrljajuće kugle (*engl. rolling ball*). Za svaku česticu, za područje predefiniраниh maski, izračunati su morfolometrijski pokazatelji te su izdvojeni intenziteti piksela. Vizualnom inspekcijom uz pomoć procesa iterativne segmentacije određena je veličina čestica koja ne uključuje pogrešno segmentirane čestice znatno manje ili veće od prosječne jezgre (šum raspadnutih stanica ili artefakti). Jezgreni signal dobiven na temelju mjerenja integrirane gustoće signala za svaku pojedinu jezgru epitelne stanice odgovara vrijednosti translokacije 17 kDa fragmenta kaspaze-3 u jezgru prilikom aktivacije procesa apoptoze (534). U procesu analize citoplazmatskog signala za stvaranje maski za analizu korišten je citoplazmatski, a ne jezgreni signal pomoću istovjetnog postupka uz manje modifikacije u postupcima određivanja graničnih vrijednosti. Analiza signala nitrotirozina u mišićnim slojevima procijenjena je na temelju segmentacije mišićnog sloja te mjerenja integrirane gustoće signala nakon odgovarajućeg postupka utišavanja pozadinskog šuma. Na mikroskopskim slikama dobivenim pomoću epifluorescencijskog mikroskopa prije analize signala provedeni su testovi procjene autofluorescencijskog šuma izradom korelacijskih matrica signala te analizom setova podataka dobivenih gradiranjem ekspozicije u području od interesa (s ciljem procjene matematičkih karakteristika ovisnosti signala o ekspoziciji).

#### 4.40.5. Analiza luminiscentnog signala dobivenog snimanjem membrana tijekom Western blot metode

Procjena signala dobivenog Western blot metodom provedena je na temelju zasebne analize ukupnih proteina dobivenih transiluminacijskim uslikavanjem poliakrilamidnih gelova nakon elektroforetskog razdvajanja proteina te analize luminiscencije nitrocelulozne membrane tijekom razgradnje luminola uz prisustvo  $H_2O_2$  katalizirane HRP-om konjugiranim sekundarnim protutijelima. Snimke gelova dobivene UV transiluminacijom pomoću *ChemiDoc MP* sustava za oslikavanje (Bio-Rad, SAD) uvedene su u program Fiji (NIH, SAD). Slike su prvo obrađene procjenom intenziteta piksela kako bi se osigurao izostanak pretjerane ekspozicije te je signal ispravljen pomoću algoritma ujednačavanja pozadinskog šuma tehnikom kotrljajuće lopte. Ukoliko su snimke gelova zadovoljavale uvjet optimalne ekspozicije, mjerenje je provedeno pomoću algoritama za analizu gelova na način da su područja od interesa (ukupna površina poliakrilamidnog gela koja sadrži razdvojene proteine uzoraka) označena alatom za kvadratno označavanje. U području od interesa, uzorci predstavljaju stupce razdvojene segmentima praznog poliakrilamidnog gela niskog signala. Analiza signala provedena je pomoću algoritma za vertikalno zbrajanje vrijednosti piksela koji vertikalni zbroj prikazuje na ordinatnoj osi dok je horizontalni položaj prikazan na apscisi. Dobiveni graf potom je modificiran linijskim alatima kako bi se osiguralo da površina ispod krivulje svakog segmenta odgovara pojedinom uzorku. Ukupna površina ispod krivulje za svaki je uzorak potom izmjerena pomoću čarobnog štapića (engl. *Wand tool*), a dobivene su vrijednosti spremljene u zasebnu tablicu. Isti je postupak ponovljen sa snimkama membrana signala pojedinog proteina na način da su alatom za kvadratni odabir odabrane trake svih uzoraka na membrani koji odgovaraju proteinu od interesa kako bi se dobile površine ispod krivulje signala luminiscencije. Niti u jednom slučaju trake ili kolumne proteina nisu mjerene pojedinačno kako bi se izbjegao učinak algoritma za normalizaciju na temelju raspona intenziteta piksela unutar odabira koji može rezultirati pogreškom mjerenja.

#### **4.40.6. Analiza signala dobivenog metodom otiska**

Signali dobiveni pomoću analize mrlje obojene alcijanskim modrilom, mjerenja mrlja lipida pomoću Sudan crnog, te redoks permanganometrijom na nitrocelulozi, analizirani su metodom za analizu integriranog signala u programu Fiji (NIH, SAD). Snimke mikroskopskih stakalaca, u slučaju analize alcijanskog modrila ili bojanja Sudan crnilom, te snimke nitrocelulozne membrane u slučaju NRP analize uvedene su u program. Nejednakosti pozadinskog šuma ispravljene su pomoću algoritma ujednačavanja pozadine tehnikom kotrljajuće kugle. Uzorci su potom analizirani pomoću seta algoritama za analizu gelova na način da su prvo, pomoću alata za kvadratno označavanje, zasebno označeni redovi uzoraka povlačenjem prvog kvadratnog odabira na svaki pojedini red (pomoću funkcije odabira redova). Po odabiru svih redova uzoraka, pomoću alata za računanje i iscrtavanje profila uzoraka, na temelju vertikalnog zbrajanja vrijednosti piksela (pri čemu se vertikalni zbroj prikazuje na ordinatnoj osi dok je horizontalni položaj prikazan na apscisi) izmjereni su profili intenziteta. Dobiveni profili obrađeni su pomoću alata za linijski odabir na način da su odijeljeni signali koji odgovaraju pojedinim uzorcima, te je pomoću alata čarobni štapić izmjerena površina ispod krivulje za svaki uzorak. Dobivene vrijednosti pospremljene su u tablicu.

#### **4.40.7. Analiza signala dobivenih pomoći HistoNRP metode**

Nejednakosti pozadinskog šuma ispravljene su pomoću algoritma ujednačavanja pozadine tehnikom kotrljajuće kugle. Uzorci su analizirani na način da su pomoću alata za kružni ili kvadratni odabir izmjereni intenziteti svih piksela koji odgovaraju anatomske regiji od interesa pomoću algoritma za mjerenje. Analiza signala provedena je na temelju vrijednosti integrirane gustoće intenziteta svake pojedine anatomske regije (567).

## 4.41. Analiza podataka

### 4.41.1. Bioinformatička analiza crijevnog mikrobioma

Sve sekvence analizirane su u programskom jeziku R pomoću DADA2 (prema *engl. Divisive Amplicon Denoising Algorithm*) algoritma verzije 1,16 (596). Nakon filtriranja i pročišćavanja početnica, sekvence oba usmjerenja su spojene kako bi se postigla pročišćena završna sekvenca. Stvorena je tablica varijanti sekvenci amplikona te su kimerične sekvence uklonjene. Taksonomsko određivanje provedeno je pomoću IDTAXA algoritma (597) i baze podataka SILVA (verzija 138). Alfa i beta mjera raznolikosti, te diferencijalna mjera mnoštva, izmjerene su pomoću *MicrobiomeAnalyst* platforme (598). Funkcija alfa raznolikosti provedena je na nefiltriranim podacima pomoću mjera *Shannon*, *Simpson*, *Observed*, i *Chao1*. Podaci su naknadno filtrirani na temelju mnoštva za one varijante sekvenci amplikona koje su imale minimalni ukupni zbroj od 4 ili manje od 20% ukupnog mnoštva u svim uzorcima. Varijante sekvenci amplikona, koje su se nalazile u najmanjih 5% u odnosu na varijancu, koja se temeljila na interkvartilnom rasponu, uklonjene su. Naposljetku, na podacima je provedena transformacija koja se temeljila na centriranom log-omjeru. U kontekstu taksonomskog ranga, obrasci mnoštva prikazani su na razini koljena, porodice, i roda. Bray-Curtis matrica različitosti izračunata je i prikazana pomoću postupka analize glavnih koordinata (PCoA; *engl. principal coordinate analysis*). Različitost mikrobioloških zajednica među skupinama životinja uspoređena je pomoću permutacijske multivarijatne analize varijance (PERMANOVA; *engl. permutational multivariate analysis of variance*). Diferencijalna analiza korištena je za procjenu razlike u zastupljenosti pojedinih taksonomskih kategorija između kontrolne i eksperimentalne skupine pomoću DESeq2 algoritma na netransformiranim podacima (599). DESeq2 koristi negativni binomijalni generalizirani linearni model s transformacijom koja stabilizira varijancu u kontekstu mjere mnoštva.



#### 4.41.2. Statistička analiza podataka

Svi podaci analizirani su u programskom jeziku R (4.1.3) u skladu sa smjernicama za analiziranje i objavljivanje eksperimentalnih podataka iz životinjskih studija (600), te u skladu s načelima komunikacije znanstvenih dokaza (601–605). U svim pokusima životinje su raspoređene u skupine na temelju postupka stratificirane randomizacije po pripadnosti leglu, tjelesnoj masi, i matičnom kavezu kako bi navedene varijable bili balansirane u svim skupinama. Analiza podataka prikupljenih iz *in vivo*, *ex vivo*, i *in vitro* pokusa, provedena je matematičkim modeliranjem uzimajući u obzir eksperimentalni dizajn pojedinog eksperimenta te znanstveno pitanje na koje je tražen odgovor. Za većinu varijabli usporedbe među grupama provedene su na temelju uspostave odgovarajućih regresijskih modela s eksperimentalnom zavisnom varijablom (primjerice kontinuirani ishod biokemijskog mjerenja) te pripadnosti skupini kao nezavisnom varijablom, uz koju su u modelu definirane potrebne kovarijate. Kod svih biokemijskih mjerenja, ukupna koncentracija proteina bila je definirana kao kovarijata radi ispravljanja moguće pogreške prilikom pripremanja uzoraka (engl. *loading control*). Definicija ostalih kovarijata ovisila je o pojedinom slučaju pa su tako, prilikom enzimatskih kolorimetrijskih mjerenja, dodatne moguće kovarijate bile apsorbancija uzorka te apsorbancija u bazalnom vremenu; a kod diferencijalnih enzimatskih mjerenja (mjerenje aktivnosti frakcija superoksid-dismutaza ili enzima koji kataliziraju disocijaciju  $H_2O_2$ ) dodatne kovarijate bile su ukupna enzimaska aktivnost (u slučaju da je zavisna varijabla bila specifična aktivnost enzimske frakcije) ili specifična aktivnost pojedine enzimske frakcije (kod procjene komplementarnog udjela). U slučaju potrebe za višestrukim korekcijama uzoraka uvedene su dodatne korektivne kovarijate. Primjerice, prilikom analize uzoraka praha desikata fecesa ili svježih uzoraka fecesa u pojedinim je modelima uvedena korekcija za udio vode u izvornom uzorku, s obzirom da je razrijeđenost uzorka, koja je u ovom slučaju bila biološka varijabla (a ne pogreška uvedena tijekom postupka pripreme uzoraka), i dalje unosila moguću pogrešku u procjenu koncentracije pojedine molekule. Ostale moguće kovarijate kod specifičnih mjerenja uvedene su u model ukoliko je to zahtijevalo specifično znanstveno pitanje na temelju istog načela. U slučaju modela kojima su analizirani uzorci čija je međuzavisnost bila hijerarhijskog tipa, umjesto jednostavnih linearnih regresijskih modela, postavljeni su linearni mješoviti modeli u kojima je uzeta u obzir hijerarhijska međuzavisnost definiranjem hijerarhijske strukture u sklopu varijable nasumičnih učinaka (engl. *random effects*). U slučaju ponavljanih mjerenja, identifikacijski broj jedinice definiran je kao nasumični učinak u linearnom mješovitom

regresijskom modelu kako bi se uvela kontrola za postupak ponovljenih (zavisnih) uzorkovanja. U slučaju da je zavisna varijabla bila dihotomna kategorična (kvalitativna), kao što je bio slučaj kod modela za procjenu vjerojatnosti ekspulzije probavne sluzi iz mjehurića vrčastih stanica probavnog epitela (553), korištena je logistička regresija mješovitih učinaka, u kojoj je varijabla nasumičnih učinaka iskorištena za definiranje hijerarhijske strukture podataka. Kod svih modela moguće su interakcije definirane na temelju bioloških vjerojatnosti te su izvedeni modeli sa i bez interakcija među pojedinim varijablama (primjerice, interakcije skupine i vremena kod ponavljanih mjerenja pojedinog fenomena, ili interakcija tretmana streptozotocinom i tretmana inhibitorom inkretinskih receptora u pokusima u kojima je korišten 2x2 faktorijalni dizajn) (535). Po postavljanju svih modela, pretpostavke modela provjerene su vizualnom inspekcijom grafikona rezidualnih i postavljenih vrijednosti, te su u slučaju odstupanja modela korištene potrebne matematičke transformacije varijabli nakon čega je ponovljen postupak procjene valjanosti. U slučaju kad standardne transformacije nisu zadovoljile pouzdanost modela korištena je Box-Cox transformacija (606). Kod modela u kojima je bio naglašen učinak stropa (607)(primjerice kod bihevioralnih mjerenja u kojem su zbog predefiniranog završnog vremena mjerenja u nekim slučajevima životinje postigle „maksimalne“ rezultate), analiza rezultata provedena je pomoću matematičkih modela preživljenja (engl. *survival*), tako da je stropnim učincima bila pridružena cenzura (533). Kod svih modela izlazni su parametri prikazani kao točka procjene uz pridružene 95% intervale pouzdanosti. Otkloni skupina prikazani su kao razlike (vrijednost 0 informirala je o izostanku otklona) ili omjeri (vrijednost 1 informirala je o izostanku otklona) procjene prosječnog učinka u pojedinim skupinama na način da su prikazane točke procjene pomaka uz 95% intervale pouzdanosti. Testovi usporedbe provedeni su uz razinu  $\alpha$  nominalno postavljenu na 5% te uz potrebne korekcije za ponovljene usporedbe (po tipu Holm, Hochberg, Hommel, ili Bonferroni) (608,609). Međutim, s obzirom na prirodu eksperimenata, a u skladu sa smjericama (600), rezultate smo tumačili u svezi sa njihovim biološkim značenjem bez fiksacije na p vrijednost, (605) pogotovo u pokusima u kojima su provođene eksplorativne analize te u specifično dizajniranim pokusima (primjerice tijekom izrade modela koji opisuju vremenski obrazac pojedinih bioloških fenomena gdje su veličine grupa određene pragmatično s ciljem razjašnjavanja vremenskog tijeka, a ne precizne vrijednosti u pojedinoj točki u vremenu). Multivarijatna analiza provedena je pomoću analize glavnih komponenti (PCA; engl. *principal component analysis*) na setovima podataka koji su po potrebi transformirani na način da je svaka varijabla centrirana oduzimanjem prosjeka kolumne te skalirana dijeljenjem standardnom devijacijom. U pojedinim slučajevima, u kojima su postojale metodološke razlike

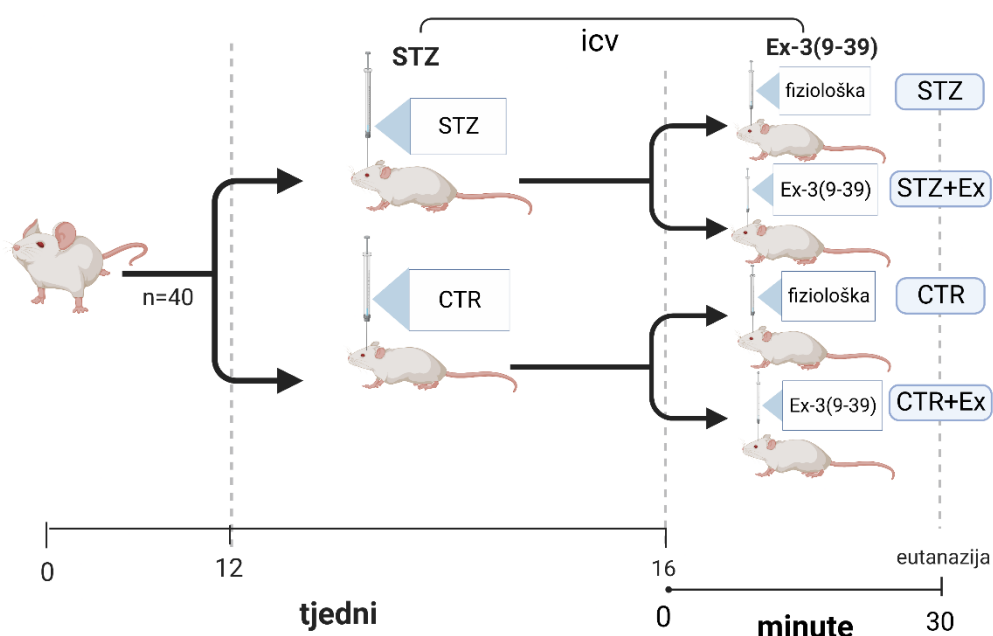
između setova uzoraka, primjerice prilikom analize međuzavisnosti komponenti redoks homeostaze u pojedinim segmentima probavne cijevi koje nisu sve mogle biti analizirane istodobno zbog velikog broja uzoraka za svaki segment u pokusu u kojem je crijevna homeostaza analizirana u modelu PB-a (533)), svaki je set odnosno anatomski segment centriran i skaliran zasebno, kako bi se kontrolirao šum unesen mogućom metodološkom varijabilnosti (primjerice radi svježe spravljenog reagensa). Nakon provođenja analize glavnih komponenti definirane su komponente koje objašnjavaju najveći udio varijance te su prve dvije komponente prikazane u prostoru kao *biplot* u odnosu na koji su prikazani položaji pojedinih životinja. Doprinos pojedinih varijabli komponentama prikazan je kao set vektora čija duljina projicirana na osi odgovara doprinosima pojedinim komponentama. U pojedinim slučajevima, u kojima je analiza glavnih komponenti korištena za definiranje novih kompozitnih varijabli koje obuhvaćaju biološke sustave (primjerice prilikom analize cjelokupne redoks homeostaze u crijevu štakorskog modela sAB-a (535)), koordinate jedinki u odnosu na kompozitnu varijablu od interesa korištene su za daljnje modeliranje razlike među skupinama životinja. Kod svih analiza, završni prikaz rezultata uključivao je snagu učinka uz mjeru rasapa, a ne usporedbe bazirane na  $p$  vrijednostima zbog njihove ograničene koristi u kontekstu animalnih studija ponajviše za učinke za koje su pojedini dizajni bili primjereni, ali povezani s malom snagom što je detaljnije opisano u literaturi o  $p$  vrijednosti (npr. (605)) te u trenutno važećim smjericama za istraživanja na laboratorijskim životinjama koje se nažalost slabo poštuju (600).

## 5. REZULTATI

### 5.1. Poremećaji u probavnom sustavu štakorskog modela sporadične Alzheimerove bolesti

#### 5.1.1. Crijevna redoks homeostaza narušena je u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti

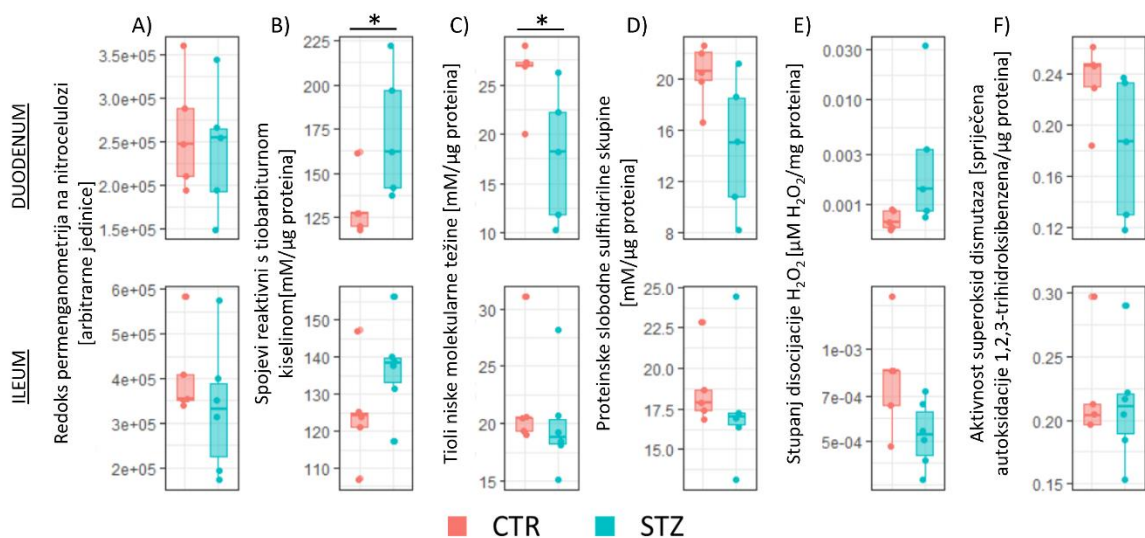
Analiza crijevne redoks homeostaze provedena je na tkivima životinja eutanaziranih 4 tjedna nakon STZ-icv tretmana (Slika 2). Analiza biljega redoks homeostaze u tkivima preostalih skupina životinja prikazana je kasnije.



**Slika 2. Dizajn eksperimenta u kojem su prikupljena tkiva u kojima su analizirani biljezi redoks homeostaze u probavnom sustavu štakorskog modela sporadične Alzheimerove bolesti izazvanog intracerebroventrikularnom primjenom streptozotocina (STZ-icv). STZ – streptozotocin; CTR – kontrolna skupina; Ex-3(9-39) – eksendin-3(9-39) amid, inhibitor receptora za glukagonu sličan peptid-1.**

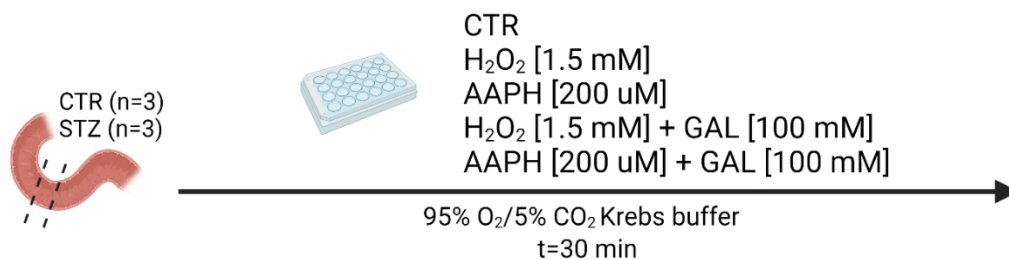
Analizom pojedinih segmenata redoks homeostaze u duodenumu i ileumu, u štakorskom modelu sAB-a, 1 mjesec nakon STZ-icv-a, utvrđeno je da je redoks homeostaza duodenuma narušena (Slika 3). Iako biljeg ukupnog reduktivnog kapaciteta nije bio značajno promijenjen u duodenumu (Slika 3A), količina produkata peroksidacije lipida (TBARS-a) bila je uvećana u STZ-icv duodenumu (Slika 3B), što govori u prilog nekompenziranom povećanju

elektrofilnog tonusa. Koncentracija tiola niske molekularne mase, koji sačinjavaju ključnu osovinu nukleofilnog tonusa i slobodnih sulfhidrila, bila je smanjena (Slika 3C,D), baš kao i aktivnost ključnog antioksidativnog enzima SOD-a (Slika 3F). Aktivnost enzima koji kataliziraju disocijaciju  $H_2O_2$  bila je povišena (Slika 3E) u duodenumu STZ-icv štakorskog modela sAB-a. Iako je koncentracija TBARS-a u ileumu bila povećana za 10,4% (Slika 3B), a aktivnost enzima koji kataliziraju disocijaciju  $H_2O_2$  smanjena (Slika 3E), ostali biljezi redoks homeostaze bili su nepromijenjeni, ukazujući na anatomske specifičnosti promjene redoks homeostaze duž probavne cijevi u štakorskom modelu sAB-a (535).

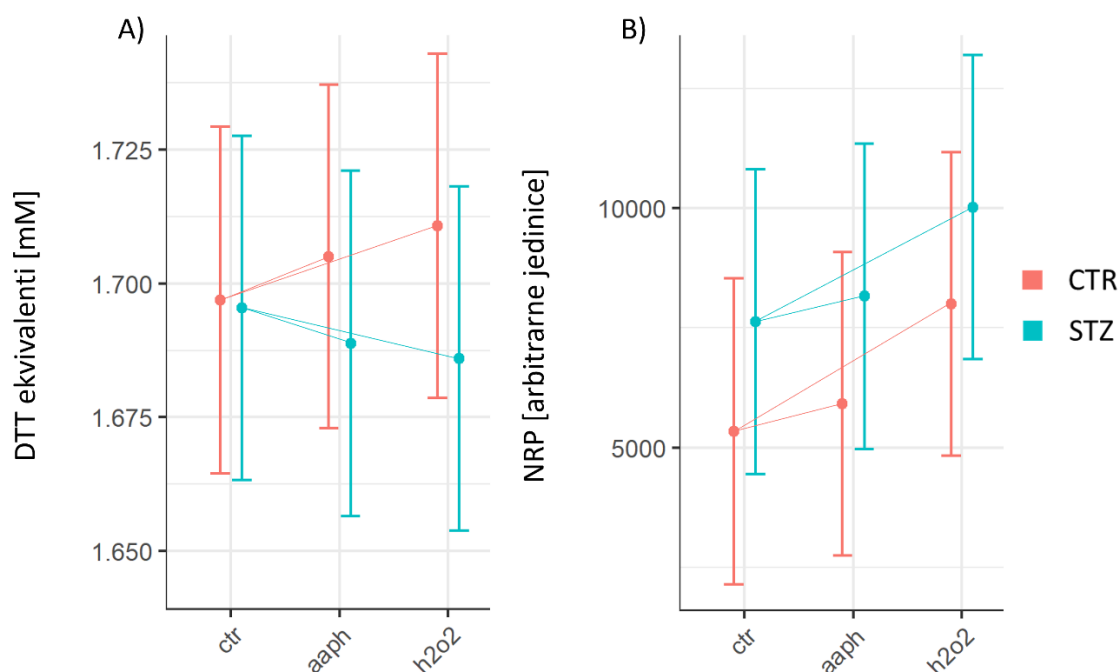


**Slika 3. Biljezi oksidativnog stresa duodenumu i ileumu u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti.** A) Ukupni reduktivni kapacitet izmjeren redoks permanganometrijom na nitrocelulozi (NRP); B) Proizvodi lipidne peroksidacije; C) Tioli niske molekularne mase; D) Slobodne sulfhidrilne skupine proteina; E) Stupanj disocijacije vodikovog peroksida; F) Ukupna aktivnost superoksid-dismutaza. CTR – kontrolne životinje; STZ – životinje tretirane intracerebroventrikularno streptozotocinom. Grafovi prikazuju kutijaste dijagrame s medijanom i interkvartilnim rasponom. \* $p < 0,05$  (Wilcoxonov neparametrijski rank test).

Kako bi se dobio dodatan uvid u redoks dishomeostazu probavnog sustava, uočenu na uzorcima duodenuma u štakorskom modelu sAB-a, provedeni su *ex vivo* pokusi na crijevnim prstenovima u kojima je ispitan odgovor duodenalnog tkiva na oksidativnu noxsu (Slika 4)(učinci tretmana D-galaktozom prikazani su kasnije). Nakon pripreme pokusa, tkivo izolirano iz kontrolnih i STZ-icv životinja, inkubirano je tijekom 30 min u otopinama AAPH i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koje su služile kao oksidativno iskušenje. Uzorci kontrolnih životinja, na oksidativno su iskušenje odgovorili porastom ukupnog reduktivnog kapaciteta izmjerenog pomoću metastabilnog ABTS radikal-kation eseja, dok je u tkivu izoliranom iz STZ-icv životinja uočen pad reduktivnog kapaciteta (Slika 5A). Zanimljivo, pomoću NRP metode, uočen je niži bazalni reduktivni kapacitet, no jednaki kompenzatorni odgovor povećanja reduktivnog kapaciteta koji je bio više izražen nakon oksidativnog iskušenja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Slika 5B). Razlika opaženih bazalnih vrijednosti te interakcije odgovora (kvalitativna interakcija opažena u metastabilnom ABTS radikal-kation eseju te izostanak interakcije u NRP pokusu) vjerojatno ukazuje na različite molekularne posrednike opaženih učinaka s obzirom da su navedeni eseji različito osjetljivi na pojedine sudionike uključene u održavanje homeostaze redoks sustava (npr. NRP pokus pokazuje manjak osjetljivosti na najzastupljeniji niskomolekularni tiol GSH).

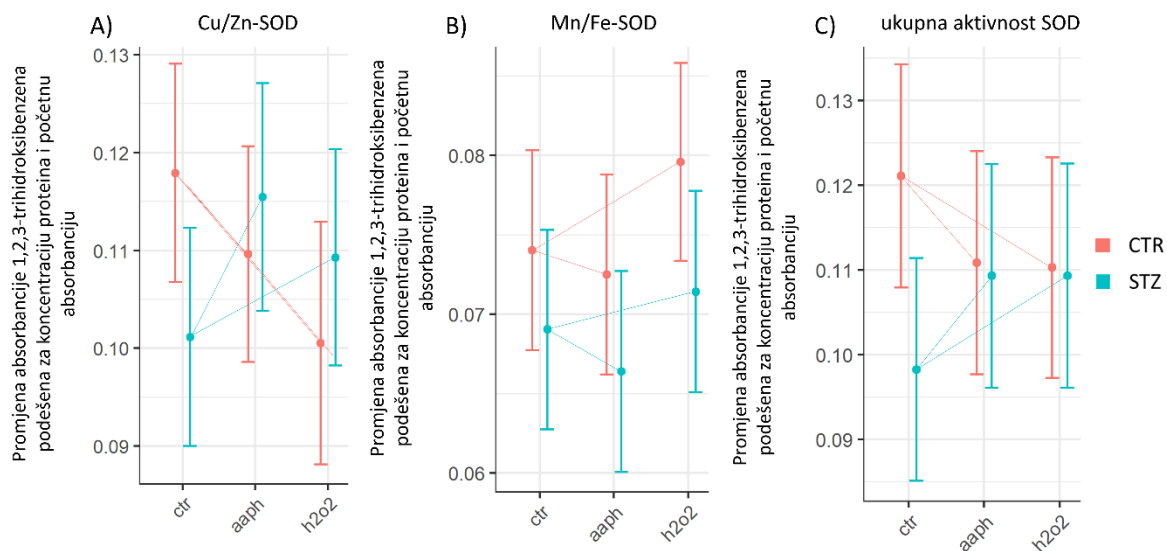


**Slika 4** Dizajn *ex vivo* experimenta u kojem je ispitan odgovor duodenalnog tkiva kontrolnih (CTR) životinja i štakorskog modela sporadične Alzheimerove bolesti izazvanog intracerebroventrikularnim streptozotocinom (STZ-icv) na oksidativnu noxsu. AAPH – 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid.



**Slika 5.** Ukupni reduktivni kapacitet duodenumu u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti (STZ-icv). Grafovi prikazuju procjene i 95% intervale pouzdanosti izvedene iz linearnih mješovitih modela s modeliranom međuovisnosti ponovljenih tretmana. A) Ukupni reduktivni kapacitet izmjeren pomoću metastabilnog ABTS radikal-kationa; B) Ukupni reduktivni kapacitet izmjeren pomoću redoks permanganometrije na nitrocelulozi (NRP). AAPH – 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid.

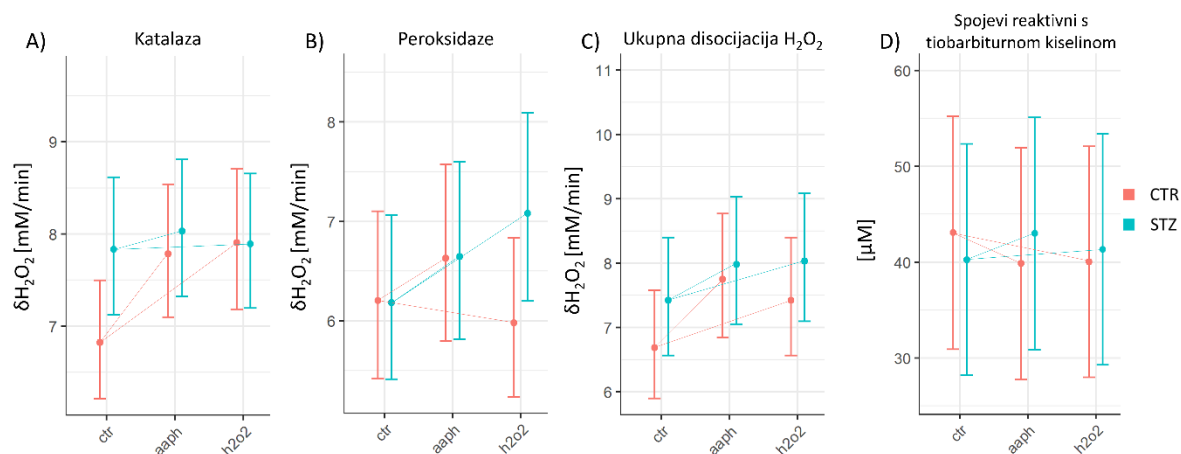
Kako bi se detaljnije ispitaio učinak oksidativnog iskušenja, u uzorcima je izmjerena aktivnost frakcija SOD-a. Oksidativno iskušenje povećalo je aktivnost citoplazmatske frakcije enzima u kontrolnoj skupini (aktivnost enzima obrnuto je proporcionalna promjeni apsorbancije THB-a) i to na način da je inkubacija u prisutnosti H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> rezultirala većim porastom aktivnosti Cu/Zn-SOD-a (Slika 6A). Suprotno, aktivnost citoplazmatske frakcije SOD-a snižena je nakon inkubacije u prisutnosti oba oksidansa u tkivu STZ-icv životinja, a inkubacija s AAPH ostvarila je snažniji učinak (Slika 6A). Aktivnost mitohondrijske frakcije enzima pokazala je drugačiji obrazac promjene. Inkubacija u prisutnosti AAPH-a uzrokovala je blago povećanje aktivnosti, a inkubacija s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uzrokovala je smanjenje aktivnosti u kontrolnih životinja (Slika 6B). U STZ-icv životinja opažen je istovjetan obrazac s tim da je aktivnost Mn/Fe-SOD-a u svim skupinama bila veća nego u kontroli (Slika 6B). Ukupna aktivnost SOD-a bazalno je bila povećana u STZ-icv životinja, a učinak oksidansa bio je suprotan u STZ-icv i kontrolnim životinjama na način da je ukupna aktivnost enzima u prisutnosti oksidansa bila snižena u STZ-icv dok je u kod kontrolnih životinja inkubacija s AAPH-om i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uzrokovala povećanje aktivnosti (Slika 6C). Opaženi učinak ukazivao je na bazalni poremećaj funkcije SOD-a koji je bio povezan s nemogućnosti kompenzatorne (zaštitne) aktivacije u slučaju preopterećenja slobodnim radikalima u STZ-icv tkivu probavnog sustava.



**Slika 6. Ukupna aktivnost superoksid-dismutaza (SOD) u duodenu u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti (STZ-icv).** Grafovi prikazuju procjene i 95% intervale pouzdanosti izvedene iz linearnih mješovitih modela s modeliranom međovisnosti ponovljenih tretmana. A) Aktivnost citoplazmatske Cu/Zn-SOD; B) Aktivnost mitohondrijske Mn/Fe-SOD; C) Ukupna aktivnost SOD. AAPH – 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid.

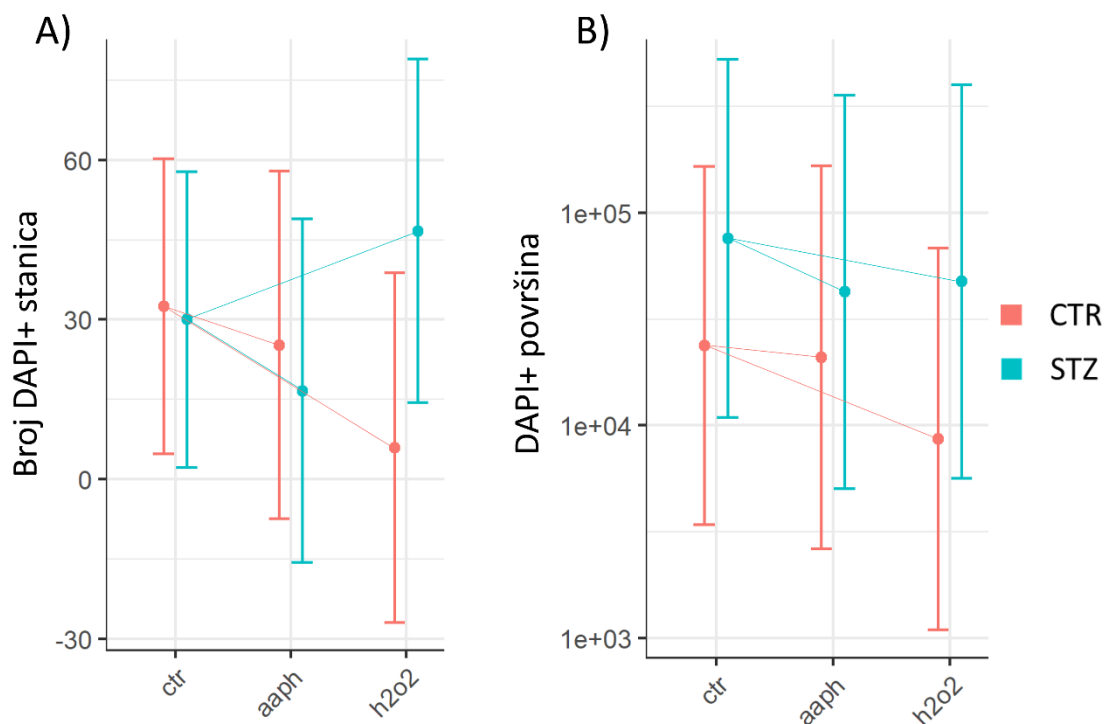


Nakon ispitivanja kapaciteta i odgovora SOD sustava po oksidativnom iskušenju, ispitano je postoji li sličan obrazac nedostatne kompenzatorne aktivacije drugog važnog antioksidativnog enzimatškog sustava – sustava kontrole  $H_2O_2$  koji sačinjavaju katalaza i peroksidaze. Zanimljivo, aktivnost katalaze bazalno je bila povišena u tkivu STZ-icv (što odgovara opaženim bazalnim promjenama aktivnosti SOD), dok inkubacija u prisutnosti oksidansa nije dovela do zamjetnog povećanja aktivnosti (ukazujući na mogući ispad kompenzatornog kapaciteta)(Slika 7A). Suprotno, aktivnost katalaze u kontrolnih životinja pokazala je podjednako kompenzatorno povećanje po inkubaciji s oba oksidansa (Slika 7A). Aktivnost peroksidaza u obje je skupine bila podjednaka bazalno te je porasla tijekom inkubacije s AAPH-om. Međutim, inkubacija u prisutnosti  $H_2O_2$  blago je umanjila aktivnost u usporedbi s bazalnom vrijednosti u kontrolnih životinja, dok je kod STZ-icv tkiva dovela do naglašenog povećanja (Slika 7B). Mjerenje ukupne aktivnosti pokazalo je da je bazalna aktivnost enzima u STZ-icv životinja povišena te da pokazuje manje povećanje tijekom inkubacije s AAPH-om i  $H_2O_2$  (Slika 7C). U kontrolnih je životinja bazalna aktivnost bila niža, međutim, aktivnost enzima očekivano je porasla tijekom inkubacije s oksidansima što je bilo posebno izraženo tijekom inkubacije s AAPH-om (Slika 7C). S obzirom na uočene promjene, izmjerena je koncentracija TBARS-a kako bi se dobio uvid u lipidnu peroksidaciju koja bi mogla ukazati na moguće nadvladavanje kompenzatornih mehanizama i slom redoks homeostaze. Međutim, inkubacija s 1,5 mM  $H_2O_2$  i 200  $\mu$ M AAPH-om nije dovela do znatnih promjena ukazujući da, u korištenoj koncentraciji, navedeni oksidansi nisu nadvladali zaštitne sustave tijekom 30 min inkubacije (Slika 7D).



**Slika 7. Analiza aktivnosti katalaze, peroksidaza i lipidne peroksidacije u duodenumu u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti (STZ-icv).** Grafovi prikazuju procjene i 95% intervale pouzdanosti izvedene iz linearnih mješovitih modela s modeliranom međuovisnosti ponovljenih tretmana. A) Aktivnost katalaza; B) Aktivnost peroksidaza; C) Ukupni kapacitet disocijacije  $H_2O_2$  (zdužena aktivnost katalaza i peroksidaza); D) Lipidna peroksidacija procijenjena temeljem kvantifikacije koncentracije spojeva reaktivnih s tiobarbiturnom kiselinom. AAPH – 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid.

Obzirom da je moguće da je prilikom *ex vivo* inkubacije s oksidansima došlo do oštećenja pojedinih stanica (primjerice zbog postizanja različite lokalne koncentracije), pomoću tehnike aktivnog izbacivanja DAPI fluorofora, kvantificiran je broj stanica u uzorcima koje su oštećene dovoljno da ne mogu aktivno izbaciti fluorofor. Oštećene stanice ovom se tehnikom mogu fluorescentno obilježiti te kasnije kvantificirati. Analiza broja fluorescentnih stanica pokazala je da je bazalni broj oštećenih stanica podjednak kod kontrolnih i STZ-icv životinja te blago smanjen prilikom inkubacije s AAPH-om (s tim da je smanjenje bilo izraženije u STZ-icv životinja)(Slika 8A). Međutim, dok je kod kontrolnih životinja inkubacija s  $H_2O_2$  dovela do još izraženijeg smanjenja broja opaženih oštećenih stanica, u tkivu STZ-icv životinja opaženo je znatno povećanje (Slika 8A). Alternativna metoda kojom se oštećenje procjenjuje na temelju ukupne površine pokazala je da je kod STZ-icv životinja prisutno naglašenije oštećenje nego što je bio slučaj u tkivima kontrolnih životinja (Slika 8B).

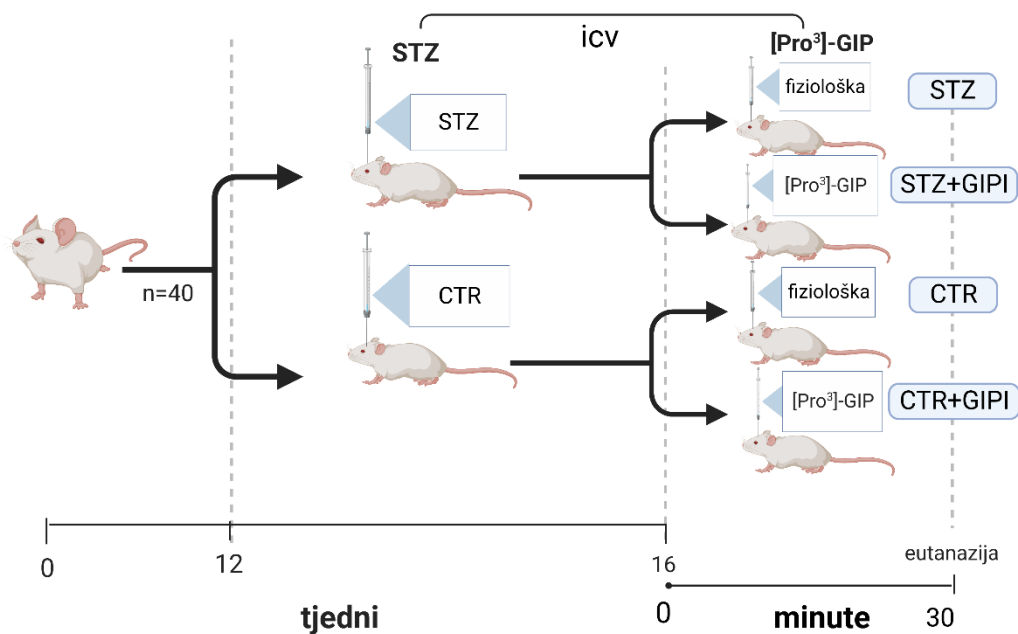


**Slika 8. Procjena odumrlih stanica u duodenumu u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti (STZ-icv) pomoću inkubacije s 4',6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI).** Grafovi prikazuju procjene i 95% intervale pouzdanosti izvedene iz linearnih mješovitih modela s modeliranom međuovisnosti ponovljenih tretmana. A) Prosječni procijenjeni broj DAPI pozitivnih stanica po vidnom polju; B) Prosječna procijenjena DAPI pozitivna segmentirana površina po vidnom polju. AAPH – 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid.

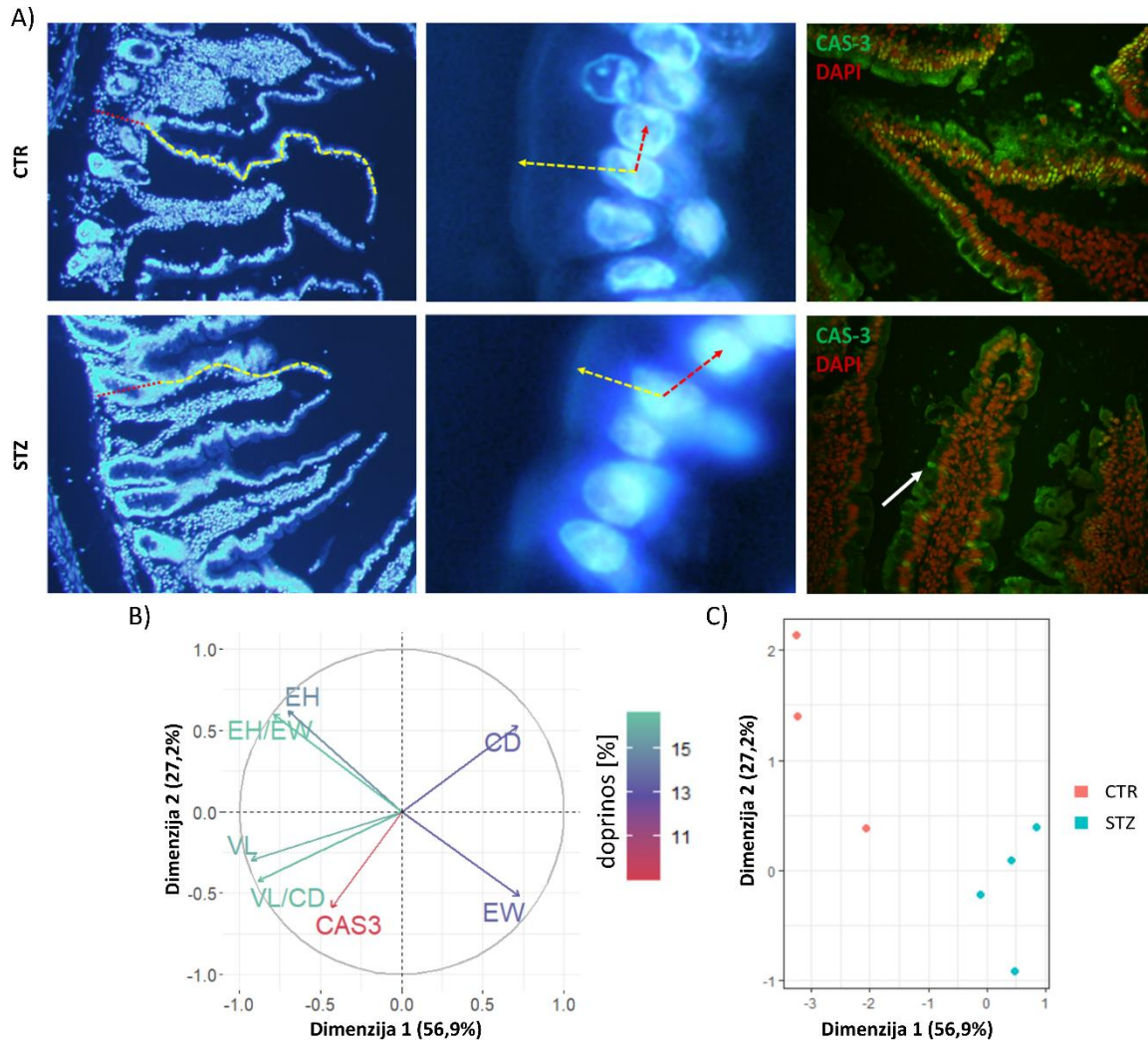
#### 5.1.1.1. Poremećena redoks homeostaza probavnog sustava u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti povezana je s narušenom strukturom i funkcijom crijevne barijere

S obzirom da je redoks homeostaza ključna za održavanje strukture i funkcije crijevne barijere, ispitano je jesu li promjene redoks homeostaze povezane s promjenama barijere probavnog sustava u STZ-icv modelu sAB-a. Analiza je provedena na tkivima životinja eutanaziranih 4 tjedna nakon STZ-icv tretmana (Slika 9). Analiza u tkivima preostalih skupina životinja prikazana je kasnije. Morfometrijska analiza crijevnih resica i kriпти duodenuma uputila je na smanjenje duljine crijevnih resica, produbljenje kriпти, te smanjen obrtaj stanica sluznice u STZ-icv životinja što govori u prilog narušene barijere (Slika 10A). Osim toga, epitelne stanice sluznice u STZ-icv životinja prosječno su bile niže (smanjena udaljenost središta jezgre i luminalnog vrška stanice) i šire (povećana udaljenost središta susjednih jezgara), što također govori u prilog narušene strukture barijere s obzirom da navedene promjene nalikuju na

morfološku adaptaciju epitelnih stanica nakon oštećenja sluznice (Slika 10A). Daljnjom analizom molekularnih promjena epitelnih stanica opaženo je znatno utišanje izražaja kaspaze-3 te translokacije 17 kDa fragmenta kaspaze-3 u jezgru stanica što je ključni molekularni mehanizam u signalnom putu apoptoze, programiranog mehanizma smrti stanica kojim se izbjegava aktivacija upalnih procesa (Slika 10A). Multivarijatna analiza navedenih procesa, pomoću analize glavnih komponenti, pokazala je združenost promjena izražaja i translokacije kaspaze-3 s makromorfološkim promjenama koje upućuju na narušen obrtaj epitelnih stanica (Slika 10B). Crijevna barijera kontrolnih i STZ-icv životinja pokazala je jasno odjeljivanje na temelju dvije glavne kompozitne varijable morfologije resica, stanica te izražaja kaspaze-3 (Slika 10C)(534).



**Slika 9. Dizajn eksperimenta u kojem su prikupljena tkiva na kojima je analizirana struktura i funkcija crijevne barijere u probavnom sustavu štakorskog modela sporadične Alzheimerove bolesti (STZ-icv). STZ – streptozotocin; CTR – kontrolna skupina; GIPI – [Pro<sup>3</sup>]-GIP, inhibitor receptora za inzulotropni polipeptid ovisan o glukozi (GIP).**

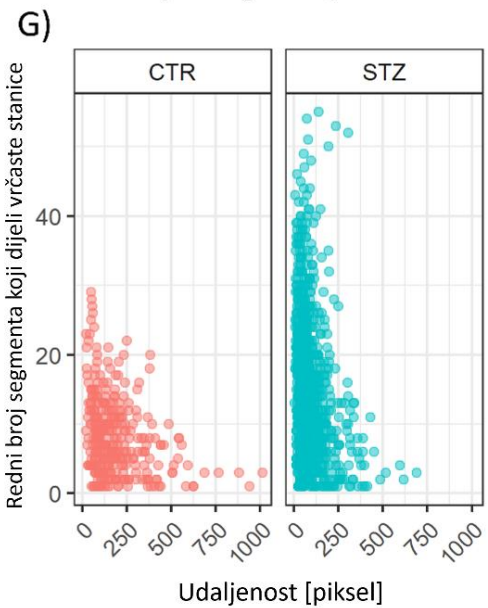
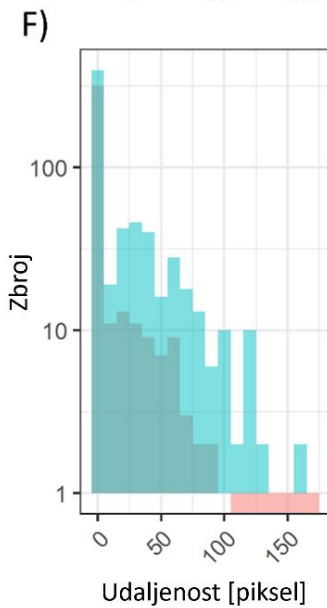
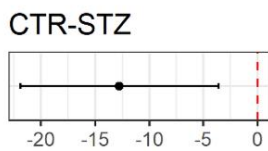
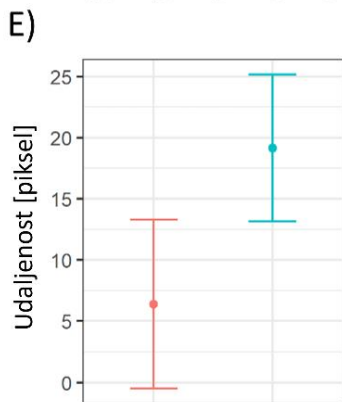
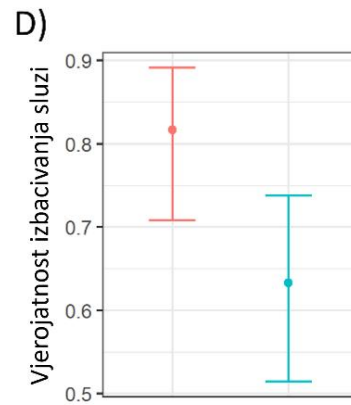
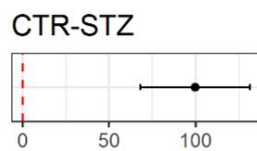
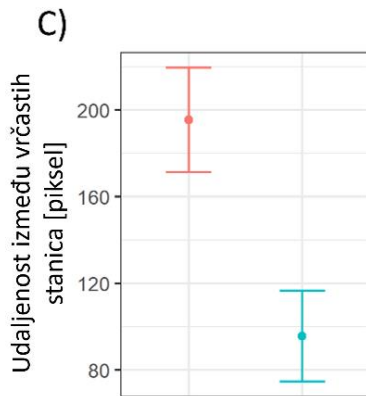
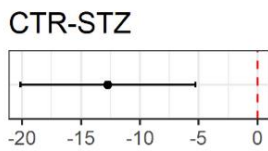
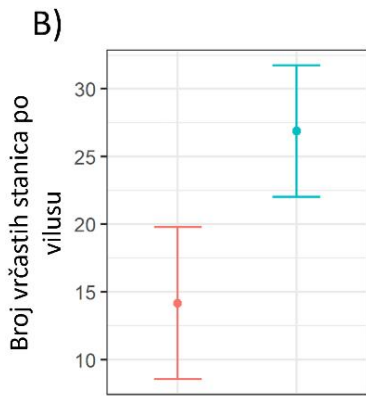
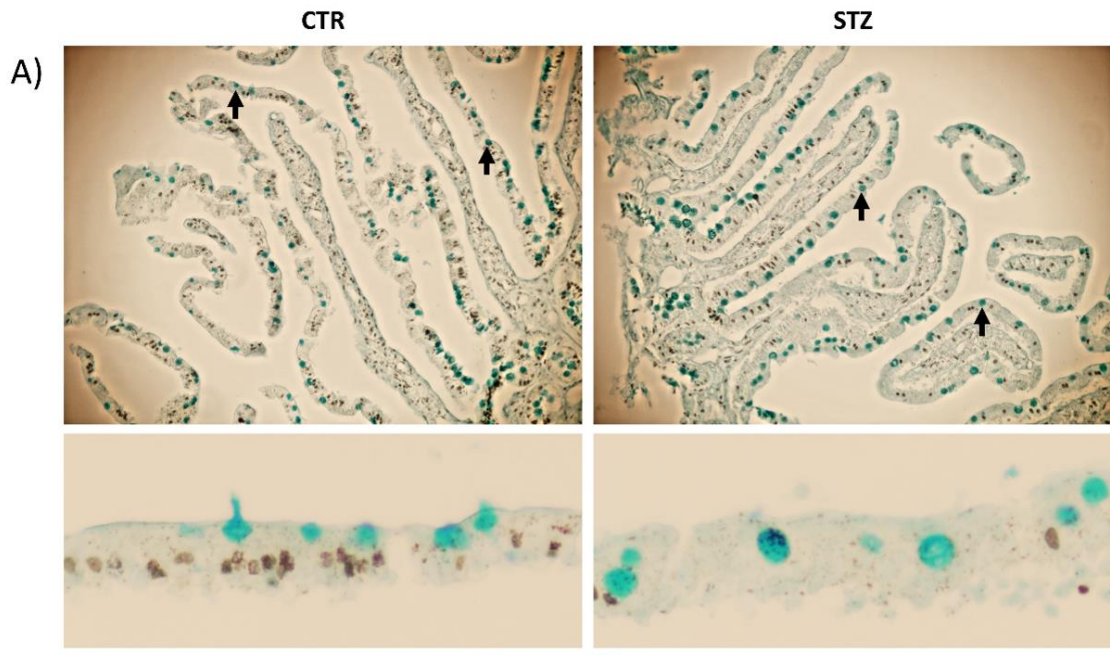


**Slika 10. Morfometrijska analiza crijevne barijere u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti (STZ-icv).** A) Reprezentativne epifluorescencijske snimke duodenalne sluznice. Lijevo: Reprezentativna slika duodenalne resice uz prikaz procjene duljine resice (žuta isprekidana linija) i dubine kripti (crvena isprekidana linija) s jezgrama stanica označenim 4',6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI).; Sredina: Prikaz epitelne površine uz prikaz procjene visine epitelne stanice (žuta isprekidana strelica) i širine (udaljenosti) epitelnih stanica (crvena isprekidana strelica). Desno: Reprezentativni prikaz epifluorescencijskih snimki duodenalne sluznice nakon analize kataliziranim odlaganjem fluorescentnih biljega. Kaspaza-3 (CAS-3) – inaktivni i aktivni (jezgreni) fragment obilježeni su zeleno, a jezgre stanica (korištene za analizu lokalizacije aktivnog fragmenta CAS-3) obilježene su fluoroforom DAPI i prikazane su crveno. U STZ-icv životinja vidi se naglašeno smanjenje izražaja i aktivacije CAS-3 s izuzetkom nekoliko stanica koje nalikuju strukturom na enteroendokrine stanice (bijela strelica); B) Multivarijantna eksploracija strukturalnih promjena i promjena vezanih u izražaj CAS-3 pomoću analize glavnih komponenti. Prikazan je biplot prve i druge glavne komponente uz položaj vektora čija projekcija na osi odgovara doprinosima pojedinim komponentama. EH (visina epitelnih stanica); EW (širina epitelnih stanica); VL (duljina resica); CD (dubina kripti); CAS3 (aktivacija kaspaze-3); C) Razdvajanje STZ i CTR životinja u biplotu prikazanom pod (B).

Nakon nalaza promijenjene apoptoze i staničnog obrtaja te narušene strukture probavne stijenke, provedena je kvantitativna i morfometrijska analiza vrčastih stanica zaduženih za stvaranje probavne sluzi te zaštitu epitela od djelovanja intraluminalnih mikroorganizama i toksina (analiza je provedena na tkivima životinja iz pokusa čiji je dizajn prikazan ranije (Slika 9)). Histološkom analizom alcijanskim modrilom opaženo je znatno povećanje broja vezikula koje sadrže probavnu sluz u duodenumu STZ-icv štakorskog modela sAB-a (Slika 11A). Povećanje broja mjehurića s probavnom sluzi može biti posljedica povećanja broja vrčastih stanica radi manjeg odumiranja ili većeg nastajanja (što bi moglo biti posljedica opaženih promjena obrtaja stanica te suprimirane apoptoze u STZ-icv životinja) ili alternativno, poremećenih mehanizama zaduženih za egzocitozu mjehurića sluzi u vrčastim stanicama sluznice. Detaljnijom analizom položaja mjehurića utvrđeno je da su oni u sluznici STZ-icv životinja položeni dublje te da ih je manji broj u trenutku fiksacije aktivno izbacivao sluz u lumen, što je govorilo u prilog hipotezi da je u štakorskom modelu sAB-a uočeno više mjehurića zbog ispada funkcije njihovog stapanja s luminalnom membranom (Slika 11A). Analizom broja vrčastih stanica (mjehurića sluzi) u svakoj resici, ustanovljeno je da se u sluznici STZ-icv životinja nalazi ~90% više mjehurića (~27 mjehurića po resici u STZ-icv životinja u usporedbi s 14 mjehurića po resici u sluznici kontrolnih životinja) nakon podešavanja linearnog mješovitog modela za ponavljana mjerenja (Slika 11B). Skraćivanje resica u sluznici duodenuma STZ-icv životinja, koje je opisano ranije, moglo bi utjecati na preciznost procjene broja vrčastih stanica po resici pa je izveden alternativni model za procjenu kojim je uspoređena prosječna površina resice između vrčastih stanica (linija povučena kroz središte mjehurića sluzi okomito na tangentu sluznice). Navedena analiza potvrdila je povećani broj mjehurića u sluznici STZ-icv životinja s obzirom da je površina između mjehurića bila otprilike dvostruko veća u kontrolnih životinja (Slika 11C). Kao što je naglašeno ranije, jedno od mogućih objašnjenja opaženog većeg broja mjehurića u STZ-icv životinja je poremećaj izbacivanja sluzi, te je izrađen mješoviti logistički model kako bi se testirala vjerojatnost izbacivanja sluzi u populaciji mjehurića kontrolnih i STZ-icv životinja. Model je pokazao da je u kontrolnih životinja vjerojatnost ekspanzije 82% dok je ona iznosila 63% za mjehuriće STZ-icv životinja (OR 2,59 [1,19 – 5,63]; p=0,02)(Slika 11D). Uvjet za egzocitozu mucinoznih granula je putovanje mjehurića prema luminalnoj površini stanice te stapanje mjehurića s membranom. Potonje je iskorišteno za dodatni test kojim bi se potvrdila ili opovrgnula radna hipoteza da je u STZ-icv životinja oštećen mehanizam izbacivanja sluzi, na način da je izrađen model kojim je uspoređena udaljenost mjehurića od luminalne površine. U skladu s prethodnim rezultatima, model je pokazao da su mjehurići STZ-icv životinja u prosjeku ~3 puta više

udaljeni od luminalne membrane (Slika 11E). Daljnjom je analizom ispitan broj mjehurića razdvojen na temelju udaljenosti te je potvrđeno da u STZ-icv životinja doista postoji znatno povećan broj mjehurića velike udaljenosti od membrane (Slika 11F). Naposljetku, ispitana je udaljenost pojedinih mucinoznih granula s obzirom na njihov položaj duž osi resice čime je potvrđeno da izostanak pražnjenja resice nije posljedica njihovog položaja u odnosu na resičnu os (Slika 11G)(553).

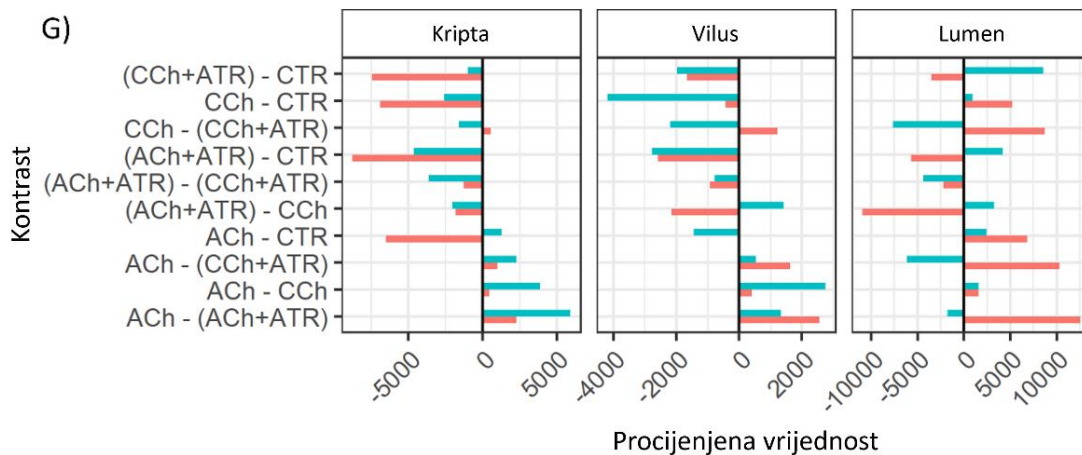
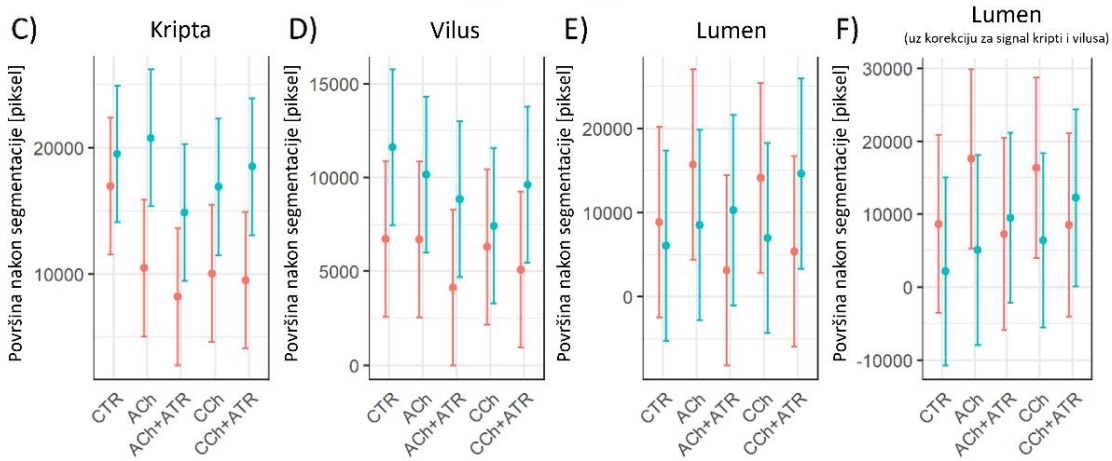
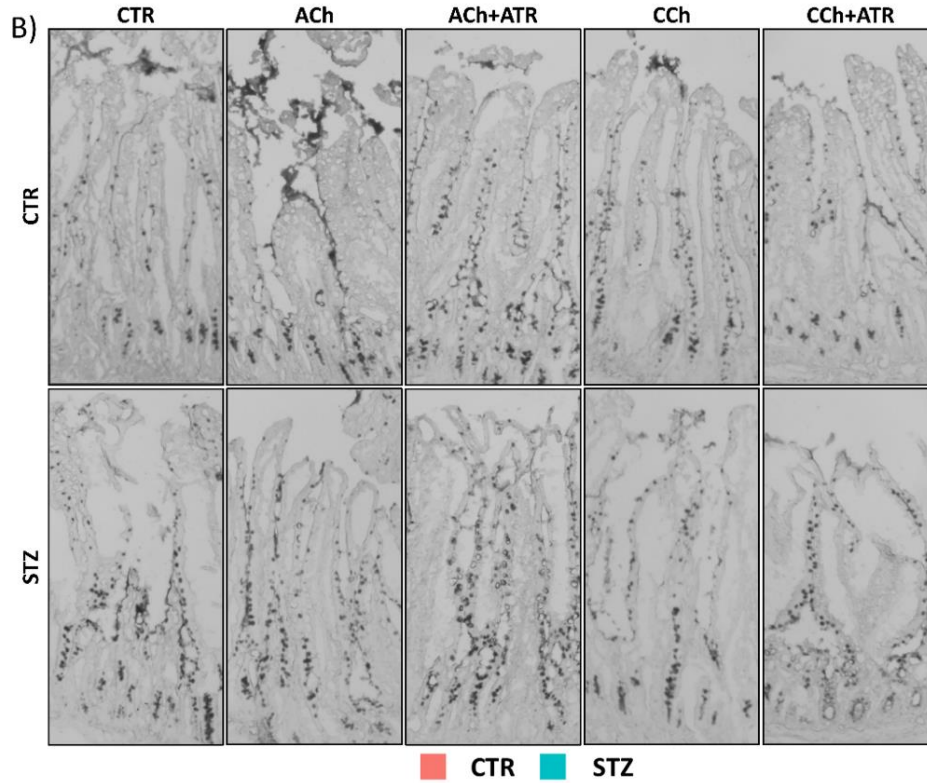
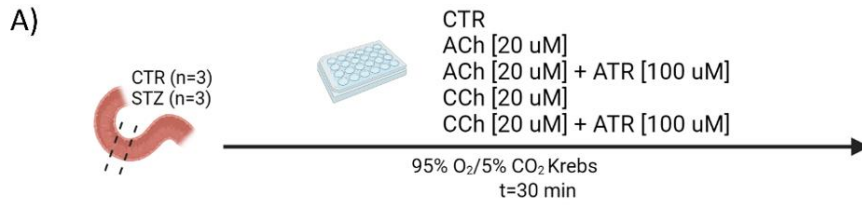






**Slika 11. Kvantitativna analiza alcijanofilnih mjehurića duodenalne sluznice štakorskog modela Alzheimerove (STZ).** A) Reprezentativne mikroskopske snimke duodenalne sluznice prikazuju uvećan broj sluznih mjehurića (crne strelice) u STZ sluznici (gore) s manjim brojem mjehurića koji prolaze postupak ekspulzije sluzi (dolje); Procjene izvedene iz linearnih mješovitih modela koje odražavaju broj vrčastih stanica po resici (B), epitelnu površinu između susjednih vrčastih stanica (C); D) Procjene izvedene iz mješovitog logističkog modela koje odražavaju vjerojatnost izbacivanja sluzi u sluznim mjehurićima. E) Procjene izvedene iz linearnih mješovitih modela koje odražavaju udaljenost između sluznih mjehurića i epitelne površine. Uz sve procjene srednjih vrijednosti prikazani su 95% intervali pouzdanosti te kontrasti tretmana koji prikazuju veličinu učinka; F) Histogram broja sluznih mjehurića u odnosu na udaljenost od epitelne površine; G) Povezanost rednog broja odsječka sluznice (s početkom na vrhu resice) i udaljenosti sluznih mjehurića od epitelne površine.

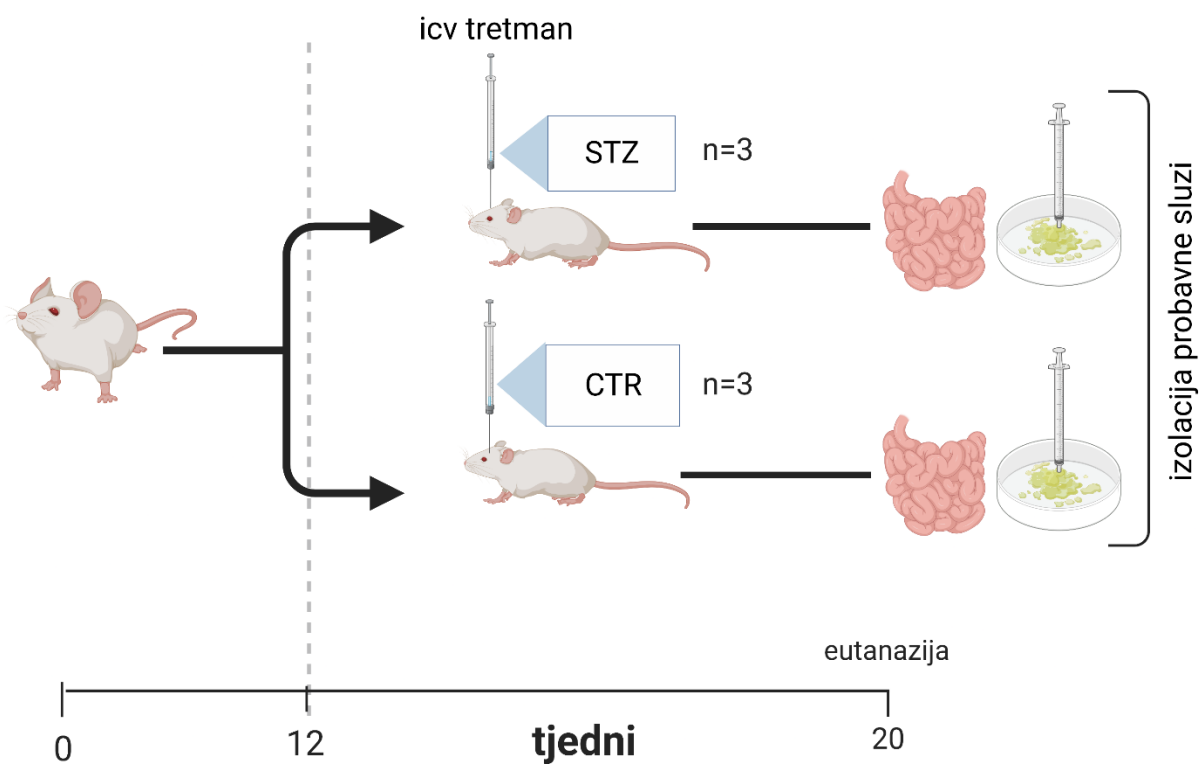
Ispitivanja morfolometrijskih parametara vezanih uz mucinozne granule pružilo je dokaze u prilog radnoj hipotezi da postoji poremećaj lučenja sluzi (ekspulzije mjehurića sluzi) u sluznici STZ-icv štakorskog modela sAB-a. Kako bi se potvrdila ili odbacila postavljena hipoteza proveden je pokus u kojem su izolirani prstenovi duodenuma kontrolnih i STZ-icv životinja podvrgnuti farmakološkoj kolinergičkoj stimulaciji *ex vivo* (Slika 12A). Kolinergička stimulacija glavni je podražaj za lučenje probavne sluzi *in vivo* te je pretpostavljeno da će se inkubacijom tkiva s kolinergičkim agonistima ACh-om i CCh-om, u koncentracijama koje su prethodno pokazale učinak *ex vivo*, biti moguće potaknuti izbacivanje sluzi u lumen (610). U tkivnim prstenima kontrolnih životinja, inkubacija tkiva s ACh-om i CCh-om potaknula je snažnu ekspulziju mjehurića sluzi u lumen, a učinak ACh-a i CCh-a bilo je moguće spriječiti ko-inkubacijom s ATR-om (Slika 12B-G). Suprotno, mjehurići sluzi u epitelu STZ-icv životinja bili su otporni na stimulaciju ACh-om i CCh-om, a ko-inkubacija s ATR-om dodatno je povećala broj opaženih mjehurića (Slika 12B-G). Detaljna kvantifikacija sluzi po područjima sluznice jasno je pokazala disfunkciju fiziološkog kolinergičkog mehanizma ekspulzije mjehurića sluzi u sluznici STZ-icv životinja (553).



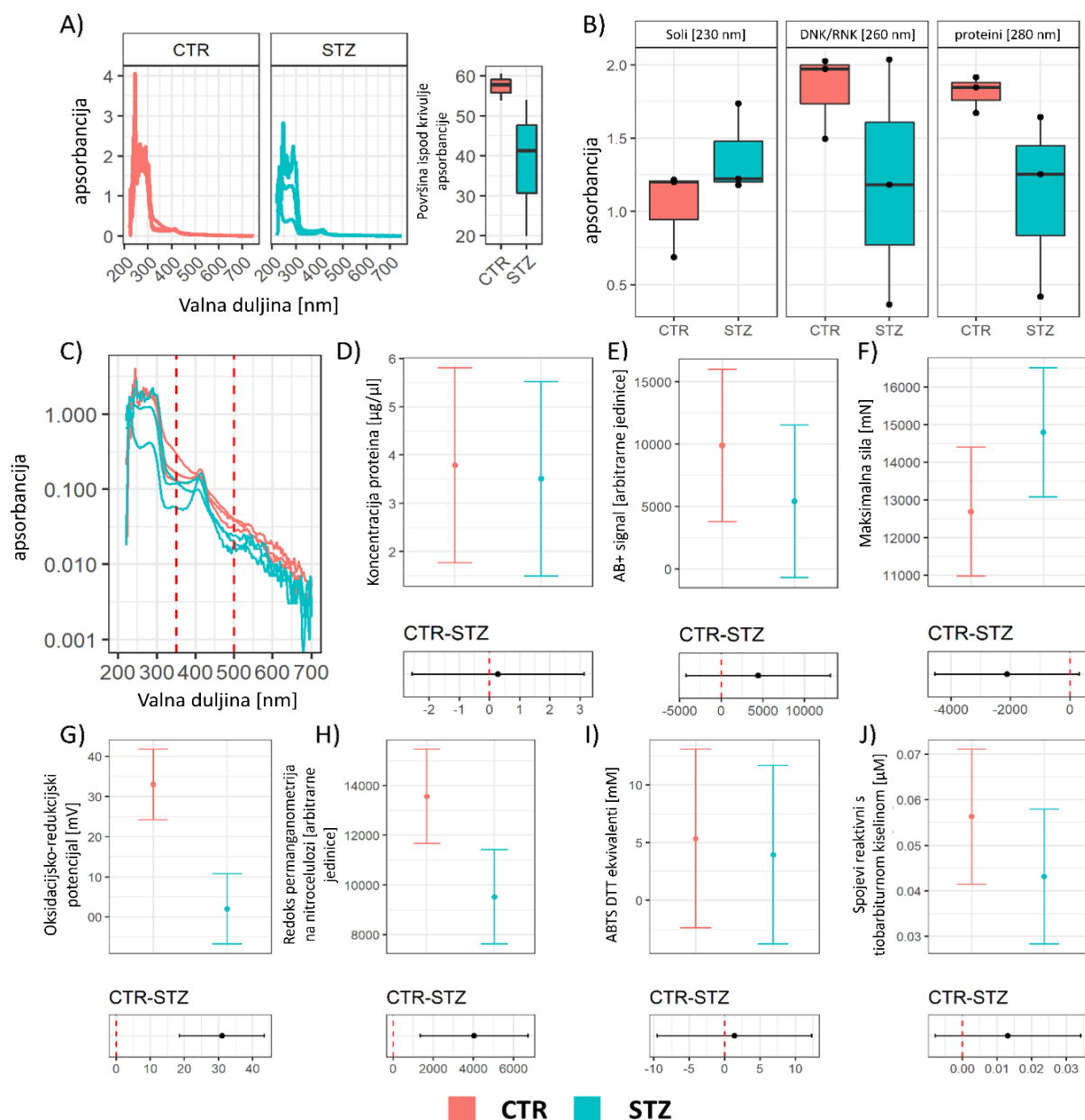
**Slika 12. Analiza osjetljivosti vrčastih stanica u duodenumu u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti (STZ) na kolinergičku stimulaciju ex vivo.** A) Eksperimentalni dizajn; B) Reprezentativne mikroskopske snimke prikazuju sluznični i intraluminalni alcijanofilni signal (sluz; prikazana crno); C) Procjene izvedene iz linearnog mješovitog modela koji odražava sadržaj sluzi u kriptama; D) Procjene izvedene iz linearnog mješovitog modela koji odražava sadržaj sluzi u sluznici resica; E) Procjene izvedene iz linearnog mješovitog modela koji odražava intraluminalni sadržaj sluzi; F) Procjene izvedene iz linearnog mješovitog modela koji odražava intraluminalni sadržaj sluzi; G) Prikaz kontrasta procjena srednjih vrijednosti iz modela prikazanih u C-E. Uz sve procjene prikazani su 95% intervali pouzdanosti.

Nakon nalaza oštećenog mehanizma ekspulzije mjehurića sluzi u STZ-icv životinja, testirana su njena funkcionalna svojstva i sadržaj jer bi narušena homeostaza sluzi mogla rezultirati povećanom izloženosti i osjetljivosti sluznice na intraluminalne mikroorganizme, lijekove, i toksine, a potonje bi moglo objasniti narušenu strukturu i funkciju te oksidativni stres u probavnom sustavu STZ-icv modela sAB-a (Slika 13). Analizom apsorbcijaskog spektra izolirane probavne sluzi opažena je manja ukupna količina tvari u sluzi izoliranoj iz probavnog sustava STZ-icv životinja (Slika 14A), a detaljnijom analizom spektra pri kraćim valnim duljinama izmjerena je povećana količina soli, ali smanjena količina nukleinskih kiselina i proteina (Slika 14B). Na temelju omjernih razlika obrazaca na pojedinim valnim duljinama (primjerice omjer vrijednosti apsorbcijaskog vrška pri 400 nm te UV regije spektra) razvidno je da se, osim kvantitativno, sluz STZ-icv životinja razlikuje i kvalitativno (Slika 14C). Provjerom koncentracije proteina pomoću Bradford metode ustanovljeno je da je sadržaj proteina u sluzi podjednak što ukazuje da bi razlike u apsorbciji sluzi pri 280 nm mogle ukazivati na kvantitativne razlike nekih drugih molekula (Slika 14D). Kako su mucini, izrazito glikozilirani proteini velike molekularne težine, ključna sastavnica probavne sluzi, pomoću alcijanskog modrila procijenjena je koncentracija alcijanofilnih mucina te je pokazano kako probavna sluz STZ-icv životinja sadržava manje alcijanofilne komponente nego sluz kontrolnih životinja (Slika 14E). Mucini su ključna sastavnica sluzi koja je nužna za osiguravanje funkcionalnog kapaciteta uključujući i lubrikacijska svojstva te je probavna sluz dalje podvrgnuta testovima lubrikacije pomoću *mastPASTA* metode. Probavna sluz izolirana iz STZ-icv životinja pokazala je lošija lubrikacijska svojstva u usporedbi sa sluzi kontrolnih životinja (Slika 14F). S obzirom na prethodne nalaze oksidacijskog stresa u probavnom sustavu STZ-icv životinja (535), izmjereni su biljezi redukativnog kapaciteta probavne sluzi. Oksidacijsko redukcijaski potencijal probavne sluzi govorio je u prilog povećanom redukativnom kapacitetu STZ-icv sluzi (Slika 14G), dok su vrijednosti izmjerene NRP metodom ukazivale na suprotno (Slika 14H). S obzirom na različitu osjetljivost ORP i NRP metode na pojedine

molekule uključene u regulaciju redoks homeostaze, probavna sluz analizirana je pomoću treće metode za procjenu ukupnog reduktivnog kapaciteta – odbojavanjem metastabilnog ABTS radikal-kationa. Pokus odbojavanja ABTS radikal-kationa govorio je u prilog izostanka promjene ukupnog reduktivnog kapaciteta probavne sluzi u STZ-icv životinja (Slika 14I). Temeljem paradoksalnih nalaza biljega ukupnog reduktivnog kapaciteta u probavnoj sluzi izmjeren je i TBARS, biljeg lipidne peroksidacije, koji je ukazao na blagi pad koncentracije sekundarnih produkata peroksidacije koji bi mogao odražavati smanjenu ukupnu količinu tvari u probavnoj sluzi (Slika 14J)(553).

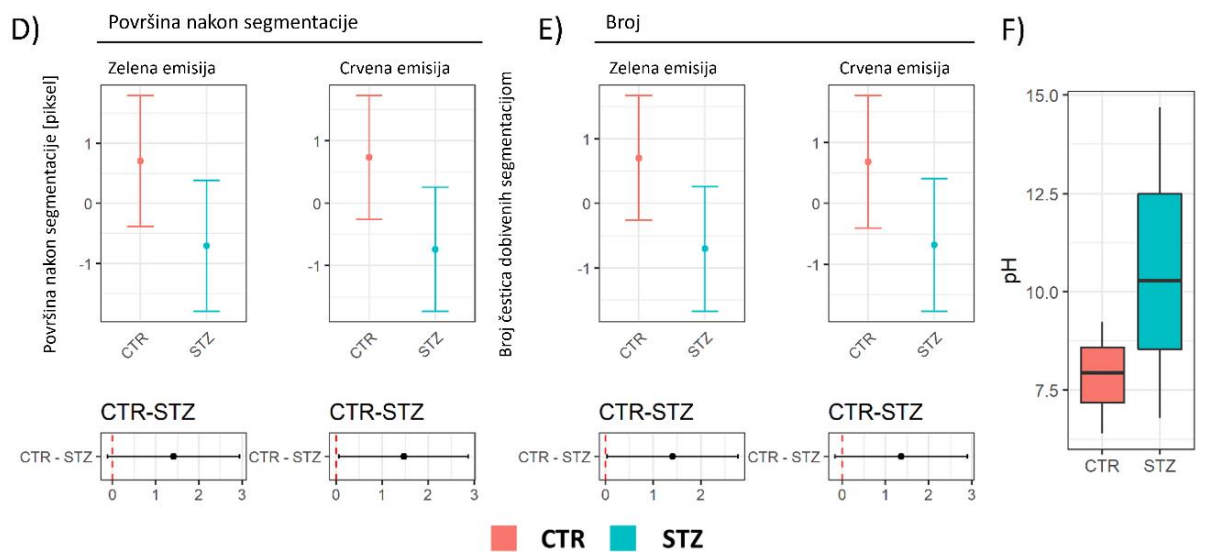
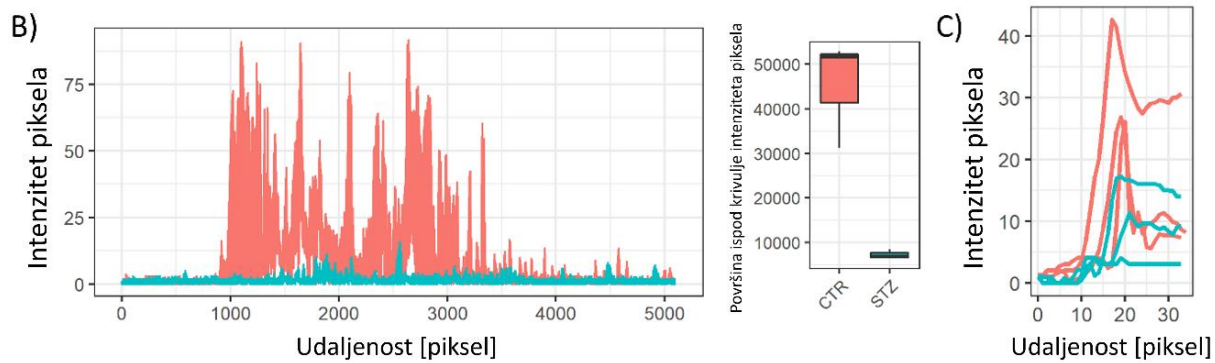
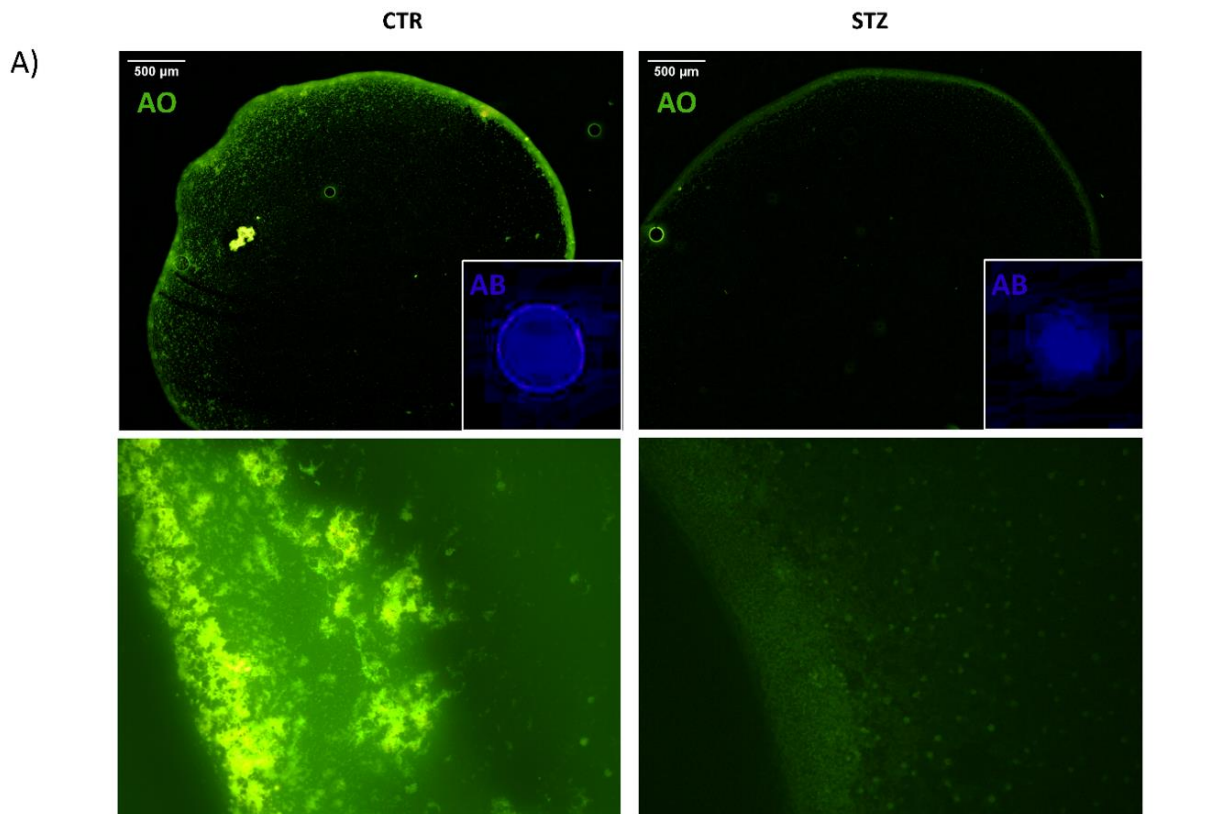


**Slika 13. Dizajn pokusa za izolaciju probavne sluzi kontrolnih životinja i štakorskog modela sporadične Alzheimerove bolesti (STZ-icv). STZ – streptozotocin; CTR – kontrolna skupina.**



**Slika 14. Biokemijska analiza probavne sluzi štakorskog modela sporadične Alzheimerove bolesti (STZ).** A) UV-Vis spektar probavne sluzi (lijevo) i površina ispod krivulje koja odražava razrjeđenje (desno); B) Sadržaj soli, nukleinskih kiselina, i proteina; C) Odnos između apsorbancije uzoraka (uz log-transformiranu y os) i valne duljine; D) Procjene izvedene iz linearnog modela koji odražava koncentraciju proteina u probavnoj sluzi; E) Procjene izvedene iz linearnog modela koji odražava intenzitet alcijanofilnog signala (ABL; engl. Alcian blue); F) Procjene izvedene iz linearnog modela koji odražava maksimalnu silu izmjerenu pomoću mastPASTA adaptera (vrijednost je obrnuto proporcionalna kapacitetu lubrikacije) korištenjem probavne sluzi; G) Procjene izvedene iz linearnog modela koji odražava oksidacijsko-redukcijski potencijal (ORP) probavne sluzi; H) Procjene izvedene iz linearnog modela koji odražava vrijednost redoks permanganometrije na nitrocelulozi (NRP) (biljeg ukupnog reduktivnog kapaciteta) probavne sluzi; I) Procjene izvedene iz linearnog modela koji odražava ukupni reduktivni kapacitet izmjeren kvantifikacijom promjene apsorbancije metastabilnog radikal-kationa 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline)(ABTS) probavne sluzi; J) Procjene izvedene iz linearnog modela koji odražava lipidnu peroksidaciju na temelju koncentracije spojeva reaktivnih s tiobarbiturnom kiselinom (TBARS) u probavnoj sluzi. Uz sve procjene srednjih vrijednosti prikazani su 95% intervali pouzdanosti te kontrasti tretmana koji prikazuju veličinu učinka.

Izmijenjena svojstva i sadržaj probavne sluzi mogli bi narušiti kapacitet stvaranja sluzne barijere koja štiti sluznicu od intraluminalnih mikroorganizama i toksina. Kapacitet stvaranja funkcionalne sluzne barijere ispitan je pokusom odlaganja sluzne kapi *in vitro*. Kap probavne sluzi odložena na mikroskopsko staklo pokazala je smanjen kapacitet stvaranja agregata glikoproteina koji nalikuju na sluznu barijeru na periferiji kapi koji su svojstveni za probavnu sluz kontrolnih životinja (Slika 15A,C). Uz izostanak agregacije alcijanofilne tvari na periferiji kapi uočen je i smanjeni kapacitet vezanja zakiseljenog akridin narančastog (Slika 15A,B). Zakiseljena otopina akridin narančastog pokazuje različita spektralna fluorescencijska svojstva prilikom vezanja za prokariotske i eukariotske stanice (564–566) što je iskorišteno za analizu akridin narančastog vezanog za strukturu agregiranih glikoproteina koja nalikuju sluznoj barijeri. Analiza raščlanjene fluorescencije zakiseljenog akridin narančastog pokazala je da je u STZ-icv sluzi smanjen kapacitet vezanja čestica koje fluoresciraju zeleno i crveno (Slika 15D,E). Slaganje sluzne barijere, osim o koncentraciji gradivnih tvari, ovisi i o vanjskim učincima poput pH (611). Mjerenjem pH mukusa pomoću timolsulfoneftaleina utvrđena je smanjena kiselost STZ-icv sluzi koja bi mogla biti uzrok opaženog smanjenog kapaciteta stvaranja struktura nalik sluznoj barijeri (Slika 15F)(553).

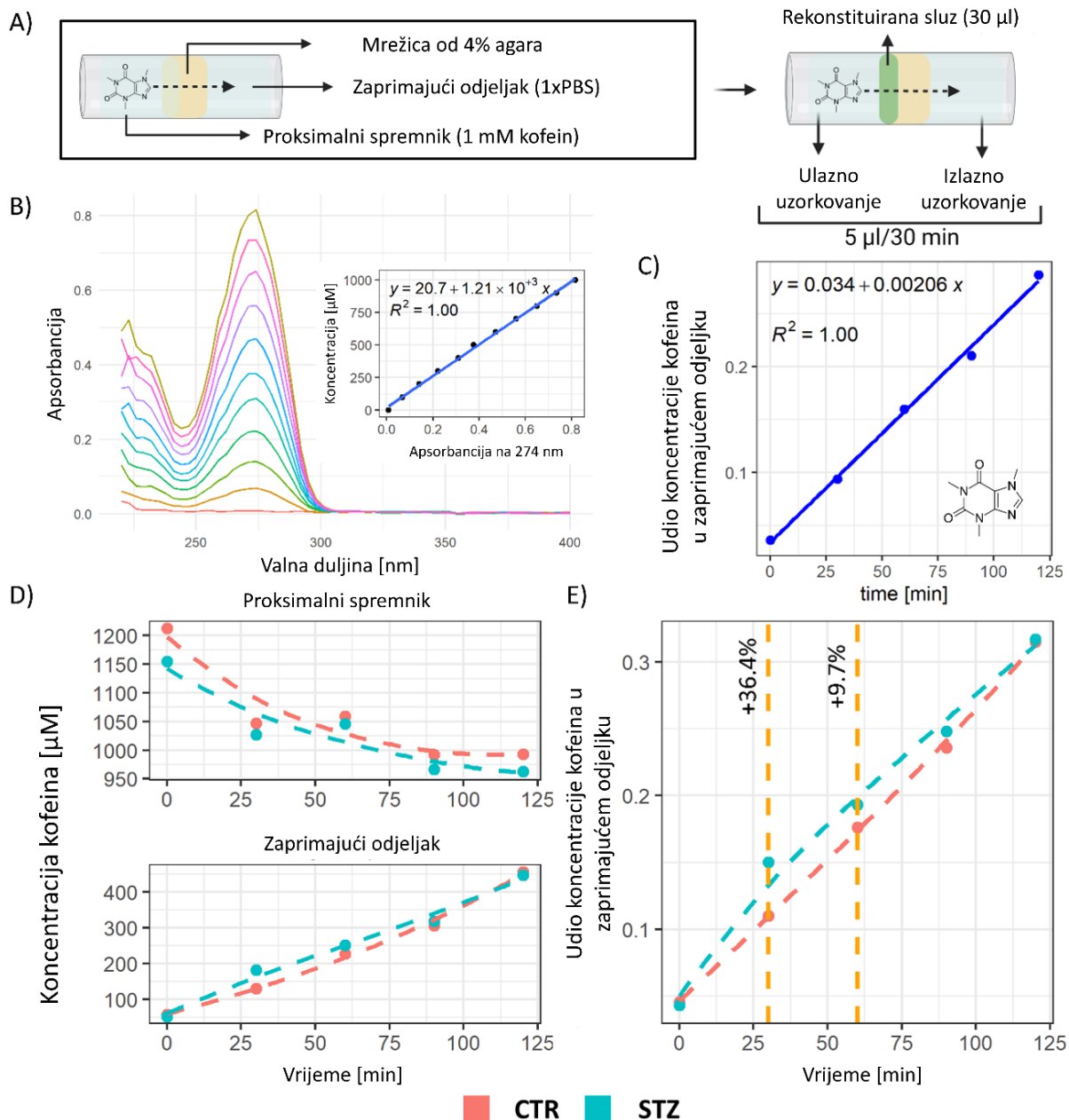




**Slika 15. Agregacija probavne sluzi u sporadičnom modelu Alzheimerove bolesti (STZ) i vezanje akridinofilnih čestica.** A) Reprezentativne epifluorescencijske snimke bojanja akridin narančastim (AO; veliki okvir) i alcijanskim modrilom (ABL; mali umetnuti okvir) prikazuju izraženu zonu agregacije u kontrolnim životinjama te izostanak agregacijske zone u STZ životinja; B) Prikaz linijskih profila intenziteta agregacijske zone prikazane u (A)(lijevo) uz izračun kumulativnog intenziteta metodom površine ispod krivulje (kutijasti dijagram s prikazom medijana i interkvartilnog raspona)(desno); C) Prikaz linijskih profila agregacijske zone kapi probavne sluzi nakon ABL bojanja; D) Procjene izvedene iz linearnog modela koje odražavaju ukupnu segmentiranu površinu AO signala usnimljenog pomoću dva seta postavki ekscitacijsko-emisijskih filtera; E) Procjene izvedene iz linearnog modela koje odražavaju broj segmentiranih čestica AO signala usnimljenog pomoću dva seta postavki ekscitacijsko-emisijskih filtera; F) Kutijasti dijagram (uz prikaz medijana i interkvartilnog raspona) koji prikazuje pH sluzi izdvojene iz probavnog sustava STZ i CTR životinja. Uz procjene iz modela prikazani su 95% intervali pouzdanosti i kontrasti koji ukazuju na veličinu učinka.

Naposljetku, pomoću *in vitro* pokusa difuzije kofeina kroz barijeru rekonstituirane sluzi, provjereno je hoće li narušen sastav te funkcionalni kapacitet sluzi izdvojene iz probavnog sustava STZ-icv životinja doista pogodovati većoj izloženosti sluznice malim intraluminalnim molekulama. Esej je proveden na način da je združena probavna sluz prvo rekonstituirana na mrežici od 4% agara te je potom korištena kao barijera difuziji kofeina u PBS-u (Slika 16A). Esej je proveden nakon uspostavljanja optimalnih uvjeta difuzije kofeina te postavljanja zadovoljavajućeg modela za mjerenje koncentracije na temelju apsorpcijskog vrška pri 274 nm (Slika 16B,C). U skladu s prijašnjim nalazima, koji upućuju na smanjen funkcionalni kapacitet STZ-icv probavne sluzi, esej difuzije kofeina potvrdio je veću propusnost rekonstituirane STZ-icv sluzne barijere za molekule kofeina *ex vivo* (Slika 16D,E)(553).

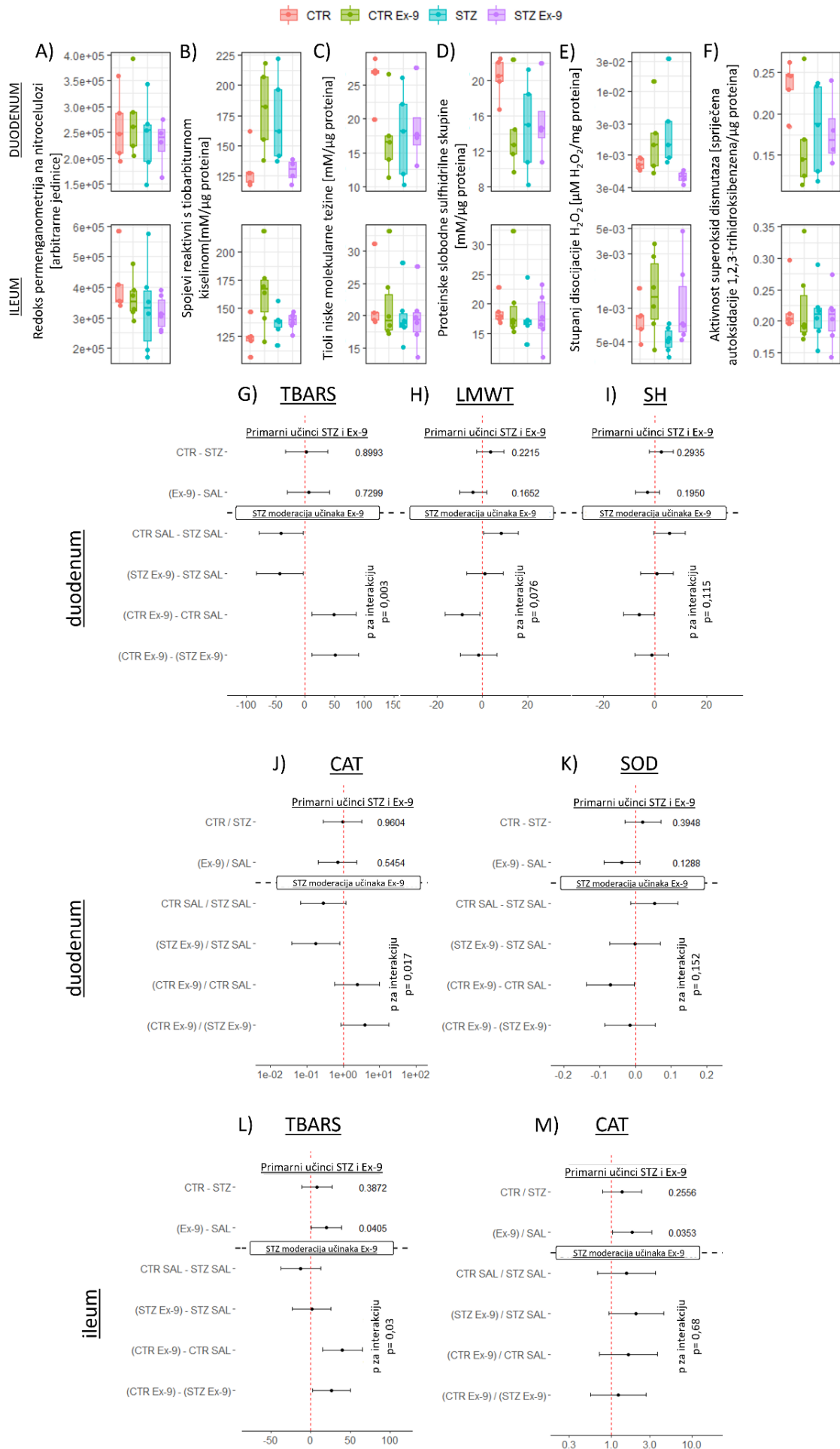




**Slika 16. *In vitro* difuzijski pokus pomoću kombinirane membrane od agara i rekonstituirane probavne sluzi za procjenu učinka sluzne barijere na difuziju malih molekula. A) Shematski prikaz pokusa; B) UV-Vis spektralni profil različitih koncentracija kofeina u fosfatima puferiranoj fiziološkoj otopini (PBS; engl. phosphate-buffered saline); C) Model difuzije kofeina kroz agaroznu membranu; D) Modeli koji odražavaju koncentracije kofeina u proksimalnom i distalnom odjeljku difuzijske komore; E) Model difuzije kofeina kroz agaroznu membranu pojačanu slojem rekonstituirane probavne sluzi i usporedba difuzijskih profila u komorama s rekonstituiranom sluzi prikupljenom iz probavnog sustava CTR i STZ životinja.**

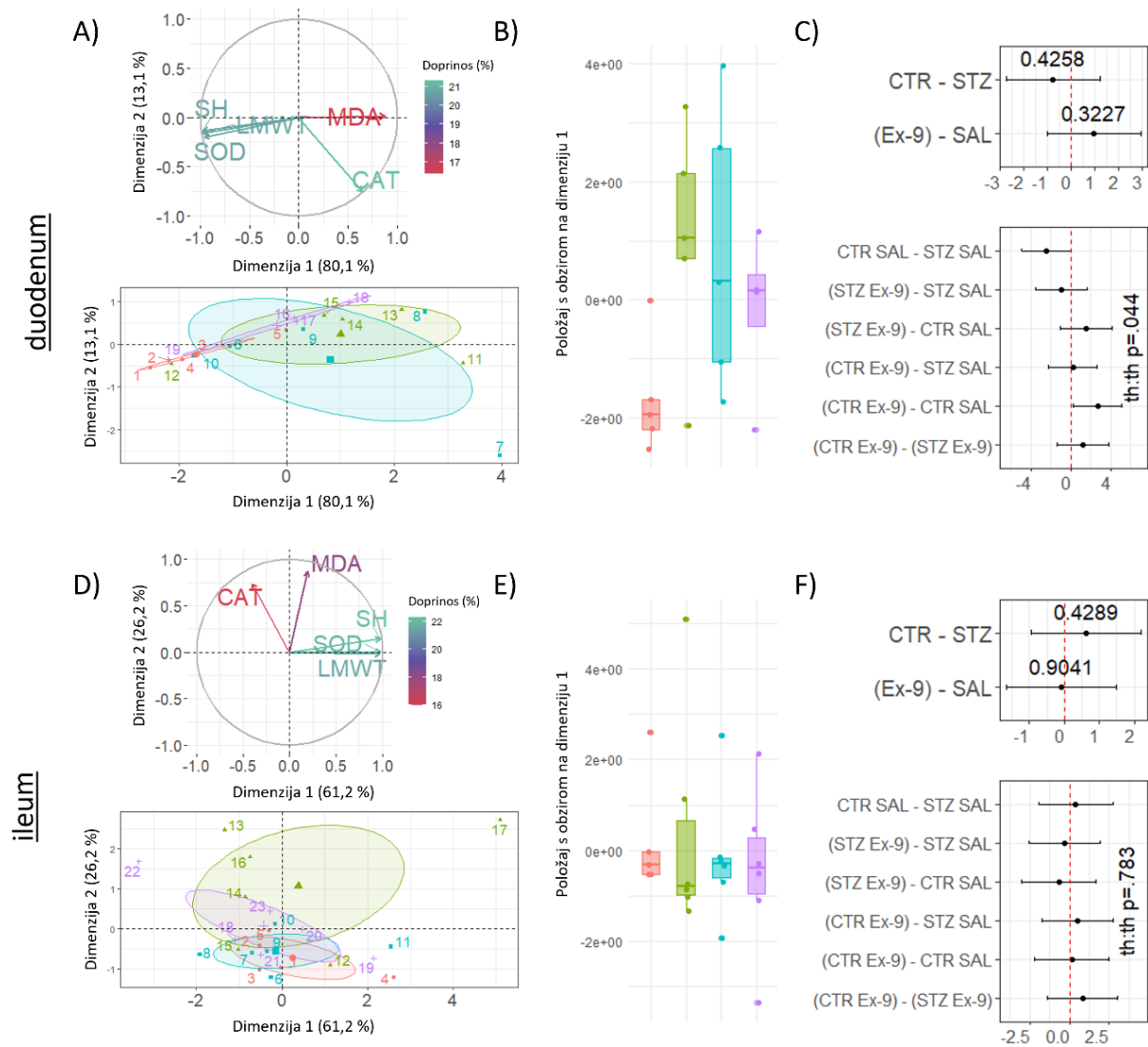
### **5.1.2. Dishomeostaza barijere probavnog sustava povezana je s ispadom funkcije inkretinske osovine mozak-crijevo u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti**

Dishomeostaza crijevne barijere i oksidacijski stres probavnog sustava ispitani su u kontekstu inkretinske osovine mozak-crijevo inhibicijom središnjih GLP-1 receptora (Slika 2). Inhibicija GLP-1R nije ostvarila značajne učinke na ukupni reduktivni kapacitet izmjeren NRP-om u duodenumu i ileumu (Slika 17A). Inhibicija GLP-1R-a pojačala je peroksidaciju lipida u duodenumu i ileumu kontrolnih životinja, dok je u duodenumu STZ-icv životinja opažen suprotni učinak (Slika 17B,G,L). U kontrolnih životinja inhibicija središnjih GLP-1R-a rezultirala je sniženjem niskomolekularnih tiola i sulfhidrila (Slika 17C,D,H,I), dok je u STZ-icv duodenumu učinak izostao. U ileumu nije bilo naglašenog učinka niti u jednoj skupini (Slika 17C,D,H,I). Učinak središnje primjene inhibitora GLP-1R-a na stupanj disocijacije  $H_2O_2$  u duodenumu nalikovao je učinku na lipidnu peroksidaciju – inhibicija je rezultirala povećanjem disocijacije  $H_2O_2$  u kontrolnih životinja, dok je u STZ-icv opažen suprotni učinak (Slika 17E,J,M). U ileumu, primjena inhibitora uzrokovala je porast disocijacijskog kapaciteta u obje skupine životinja (Slika 17E,J,M). Učinak inhibitora GLP-1R-a na aktivnost SOD-a nalikovala je učinku na koncentraciju niskomolekularnih tiola i sulfhidrila. U kontrolnih životinja, središnjom primjenom GLP-1R inhibitora aktivnost SOD-a je smanjena, dok u STZ-icv duodenumu nije bilo promjene (Slika 17F,K). U ileumu, središnja inhibicija GLP-1R-a nije ostvarila značajne učinke niti u jednoj skupini (Slika 17F,K)(535).



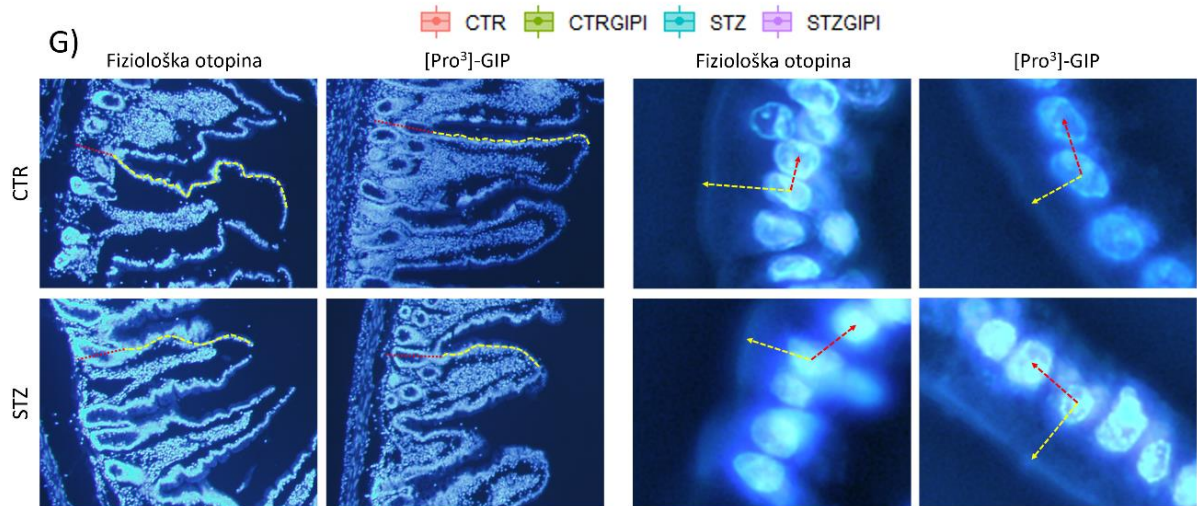
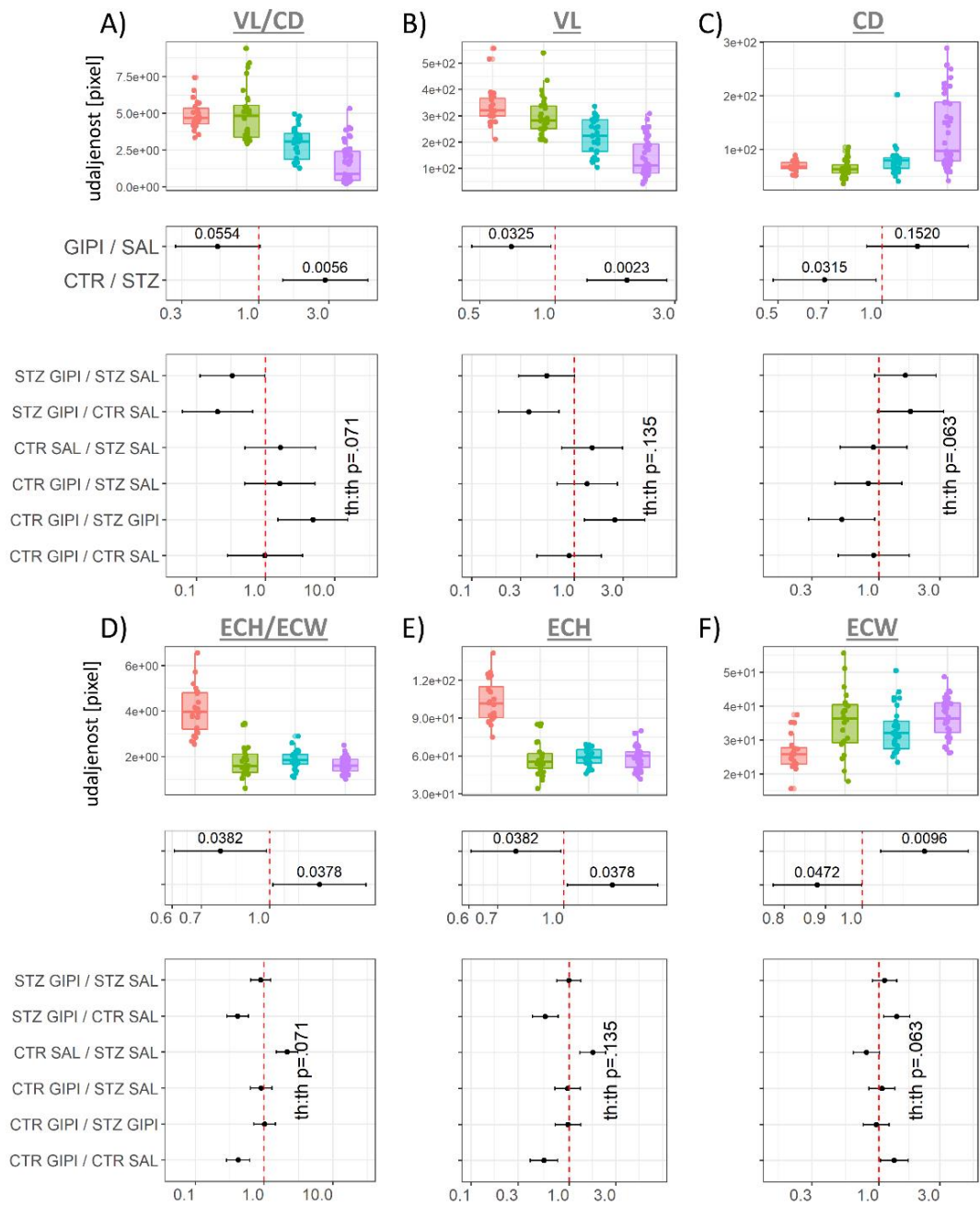
**Slika 17. Biljezi redoks homeostaze u duodenumu i ileumu u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti (STZ) sa ili bez središnje inhibicije receptora za peptid-1 sličan glukagonu eksendin-3(9-39) amidom (Ex-9).** A) Ukupni reduktivni kapacitet izmjeren redoks permanganometrijom na nitrocelulozi (NRP); B) Proizvodi lipidne peroksidacije izmjerene kvantifikacijom spojeva reaktivnih s tiobarbiturnom kiselinom (TBARS); C) Tioli niske molekularne mase (LMWT); D) Slobodne sulfhidrilne skupine proteina (SH); E) Stupanj disocijacije vodikovog peroksida (CAT); F) Ukupna aktivnost superoksid-dismutaza (SOD). Procjene primarnih učinaka te interakcije tretmana STZ i Ex-9 u duodenumu iz linearnog modela uz prikaz procjene veličine učinaka uz 95% intervale pouzdanosti za TBARS (G), LMWT (H), SH (I), CAT (J) i SOD (K). Procjene primarnih učinaka te interakcije tretmana STZ i Ex-9 u ileumu iz linearnog modela uz prikaz procjene veličine učinaka uz 95% intervale pouzdanosti za TBARS (L) i CAT (M).

Promjene cjelokupnog sustava redoks homeostaze u duodenumu i ileumu ispitane su metodom analize glavnih komponenti koja je potvrdila da je na temelju svih izmjerenih biljega moguće razlikovati STZ-icv životinje, te životinje sa središnjom inhibicijom GLP-1R-a od kontrolnih na temelju rezultata iz duodenuma (Slika 18A-C), ali ne i na temelju rezultata iz ileuma (Slika 18D-F). Rezultati iz duodenuma potvrdili su da središnja inhibicija GLP-1R-a ne ostvaruje naglašene učinke na redoks homeostazu u tkivu duodenuma STZ-icv životinja (Slika 18A-C)(535).



**Slika 18. Analiza glavnih komponenti biljega oksidativnog stresa u duodenumu i ileumu u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti (STZ) sa ili bez središnje inhibicije receptora za peptid-1 sličan glukagonu eksendin-3(9-39) amidom (Ex-9).** Analiza glavnih komponenti biljega redoks homeostaze u duodenumu (A) i ileumu (D). Prikazan je dijagram doprinosa pojedinih varijabli (gore) te položaj pojedinih životinja u odnosu na biplot (dolje). Osjenčane površine označavaju eliptoidna polja 95% pouzdanosti oko baricentra skupina. Kutijasti dijagram (medijan i interkvartilni raspon) koji prikazuje položaj pojedinih životinja u odnosu na prvu glavnu komponentu (B,E). Dijagram učinaka s točkama procjene uz 95% intervale pouzdanosti iz linearnog modela za glavne učinke (gore) te iz modela s interakcijom tretmana STZ i Ex-9 (dolje)(C,F). SH – sulfhidrilne skupine proteina; SOD – ukupna aktivnost superoksid dismutaza; LMWT – koncentracija niskomolekularnih tiola; MDA – malondialdehid (istovjetno s TBARS – spojevi reaktivni s tiobarbiturnom kiselinom); CAT – aktivnost katalaze (kapacitet disocijacije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

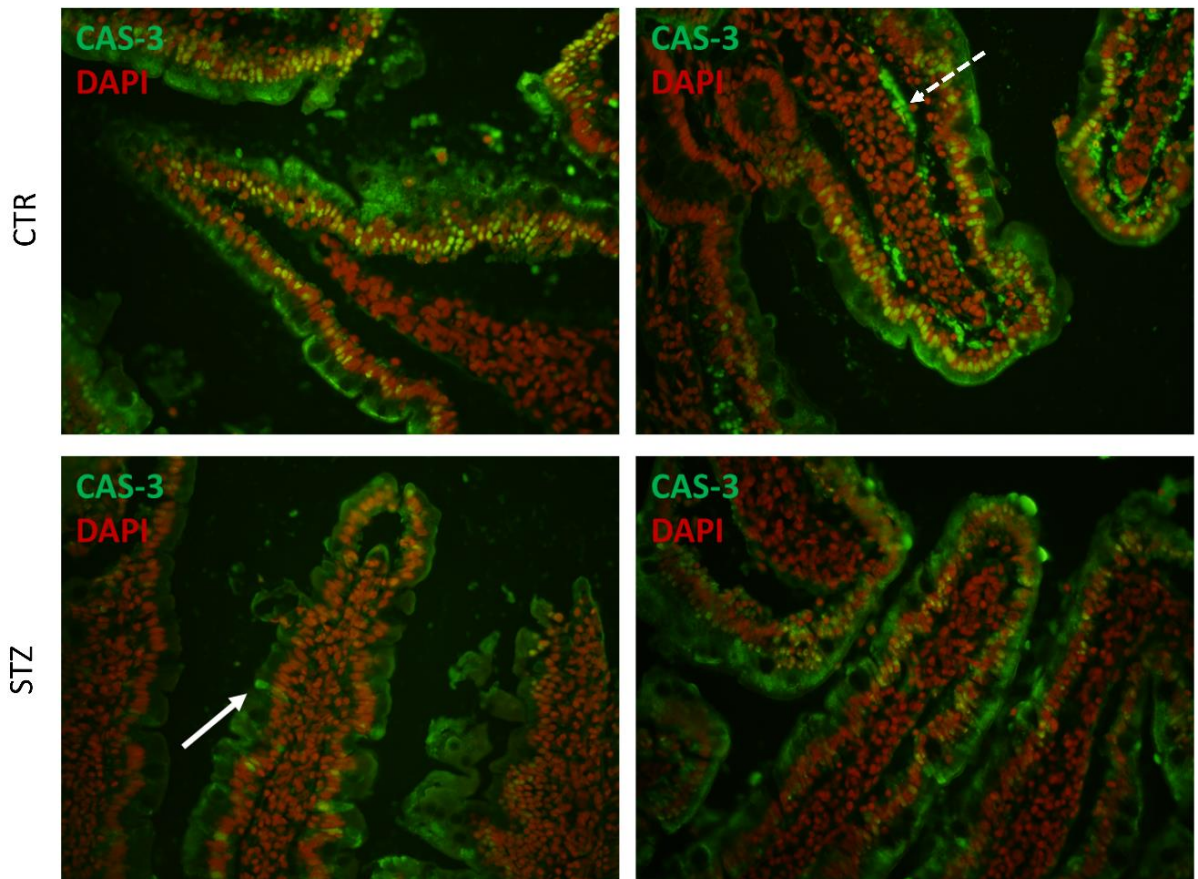
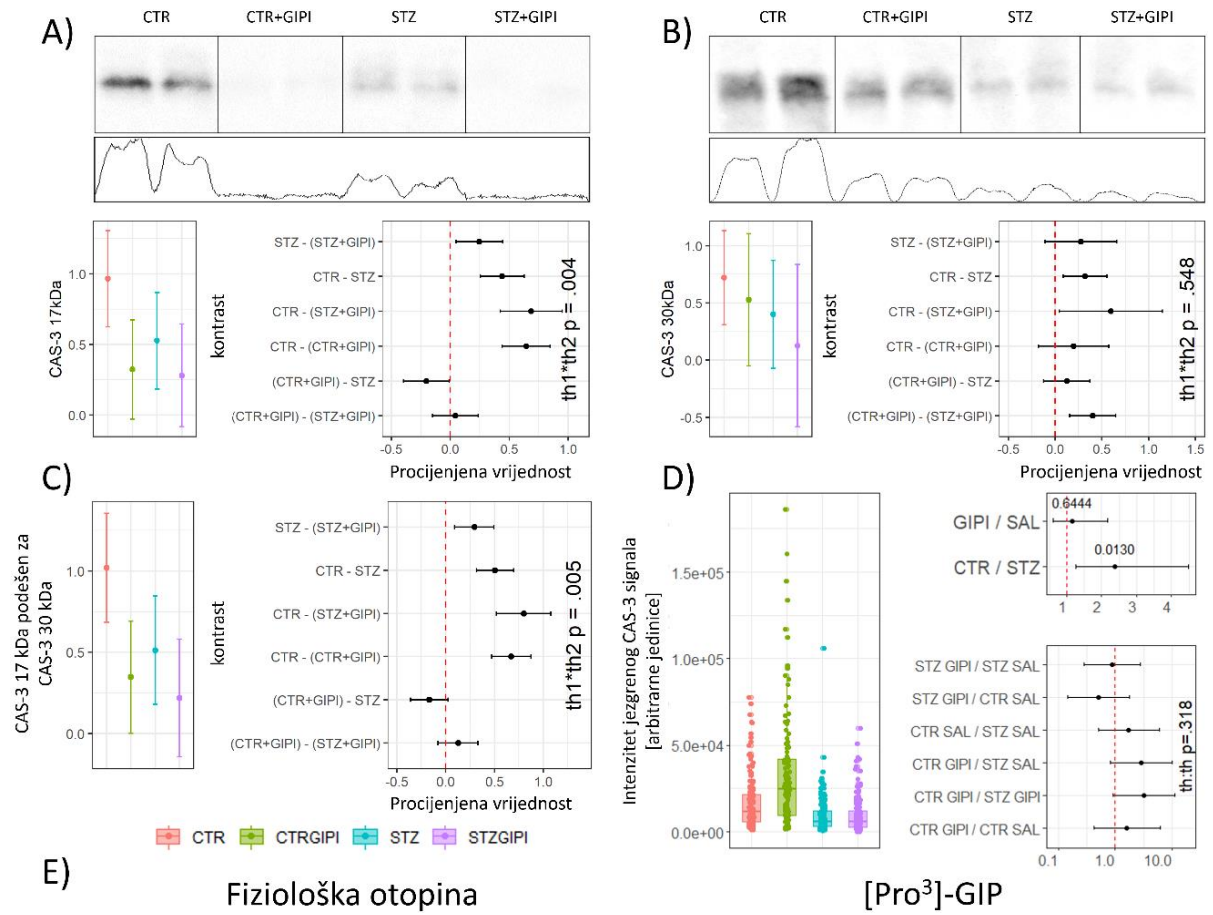
Središnja inhibicija inkretinskih receptora ostvarila je učinak i na strukturne i funkcionalne komponente crijevne barijere (Slika 9). Rezultati morfometrije resica i kripti duodenuma pokazali su da, iako središnja inhibicija GIP receptora (GIP-R) ne utječe na morfometrijski pokazatelj obrtaja stanica (omjer duljine resica i dubine susjednih kripti) u kontrolnih životinja, u STZ-icv duodenumu inhibicija inkretinske osi dovodi do dodatnog smanjenja (Slika 19A). Uočeno znatno sniženje omjera uzrokovano je ne samo smanjenjem prosječne duljine resica STZ-icv životinja uslijed tretmana GIP-R inhibitorom (Slika 19B), već i znatnim porastom dubine kripti (Slika 19C). Na razini morfometrije pojedinih epitelnih stanica inhibicija GIP-R-a dovela je do smanjenja omjera visine i širine stanica u kontrolnih životinja dok u STZ-icv epitelu inhibicija nije dovela do dodatnog smanjenja (Slika 19D). Uočeno smanjenje kod kontrolnih životinja bilo je uzorkovano skraćivanjem (Slika 19E) i širenjem stanica (Slika 19F). Uz kvantitativne morfometrijske analiza prikazani su reprezentativni uzorci (Slika 19G).



**Slika 19. Morfometrijska analiza crijevnih resica i epitelnih stanica u duodenumu u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti (STZ) sa ili bez središnje inhibicije receptora za inzulinotropni polipeptid ovisan o glukozi [Pro3]-GIP (GIPI).** A) Neobrađeni podaci, dijagram primarnih učinaka, te dijagram učinaka iz mješovitog linearnog modela s interakcijom tretmana s omjerom duljine resica (VL; engl. villus length) i dubine kripti (CD; crypt depth)(VL/CD)(A), VL (B), CD (C), omjerom visine epitelnih stanica vrška resice (ECH; engl. epithelial cell height) i širine epitelnih stanica (ECW; epithelial cell width)(ECH/ECW)(D), ECH (E) i ECW (F) kao zavisnim varijablama. G) Reprezentativne epifluorescencijske snimke duodenalne sluznice Lijevo: Reprezentativna slika duodenalne resice uz prikaz procjene duljine resice (žuta isprekidana linija) i dubine kripti (crvena isprekidana linija) s jezgrama stanica označenim 4',6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI); Desno: Prikaz epitelne površine uz prikaz procjene visine epitelne stanice (žuta isprekidana strelica) i širine (udaljenosti) epitelnih stanica (crvena isprekidana strelica) s jezgrama stanica označenih fluoroforom DAPI.

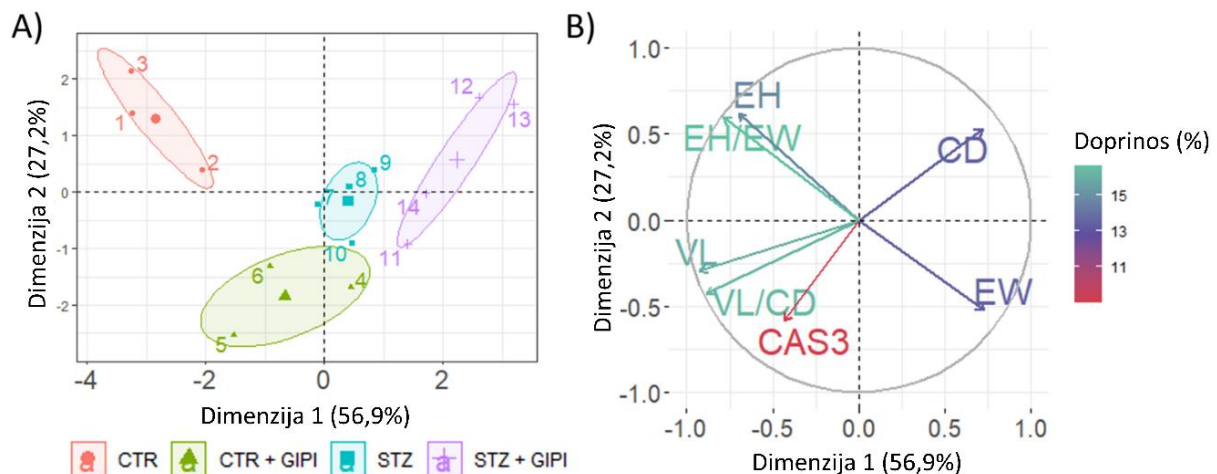
Učinak središnje inhibicije GIP-R-a na apoptozu stanica duodenalnog epitela ispitan je analizom izražaja proteina Western blotom te imunofluorescencijom tehnikom pojačavanja fluorescentnog signala uz katalizirano odlaganje fluorescentnih biljega. Središnja inhibicija GIP-R-a smanjila je izražaj aktivnog (17 kDa) fragmenta kaspaze-3 u kontrolnim životinjama dok je kod STZ-icv životinja (kod kojih je razina bazalno smanjena) došlo do znatno manje naglašenog dodatnog smanjenja (Slika 20A). Analizom inaktivnog fragmenta uočeno je da se smanjenje apoptoze u STZ-icv posredovano snižavanjem aktivacije kaspaze-3 ne događa samo na razini aktivacije proteina cijepanjem već i na razini izražaja izvornog inaktivnog proteina, a središnja inhibicija GIP-R-a rezultirala je dodatnim snižavanjem izražaja u obje skupine životinja (Slika 20B). Analiza koncentracije aktivnog fragmenta kaspaze-3, podešena za izražaj ukupne kaspaze, pokazala je da je put apoptoze u kontrolnih životinja značajno potisnut središnjom inhibicijom GIP-R-a (Slika 20C). Istovremeno, inhibicija središnjih GIP-R-a u STZ-icv životinja rezultirala je blagim dodatnim utišavanjem apoptoze na sličnu razinu kao u inhibitorom tretiranih kontrolnih životinja (Slika 20C). Imunofluorescencijom pomoću kataliziranog polaganja fluorescentnih biljega potvrđena je supresija apoptoze u STZ-icv životinja dok je akutni učinak GIP-R inhibicije bio slabije izražen (Slika 20D,E).





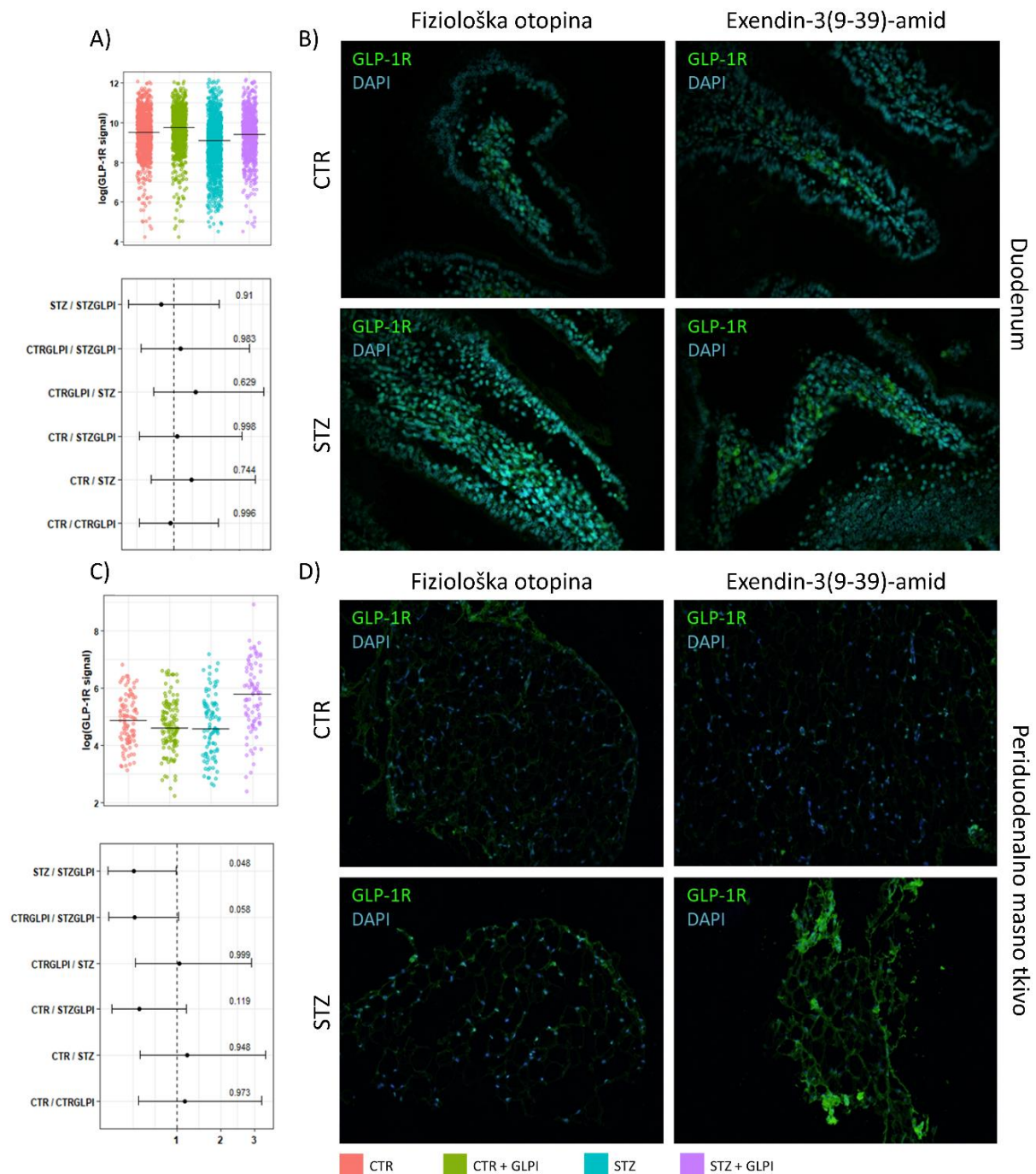
**Slika 20. Učinak središnje inhibicije receptora za inzulinotropni polipeptid ovisan o glukozi (GIP) [Pro3]-GIP-om na duodenalni izražaj te aktivaciju kaspaze-3 (CAS-3).** A) Repräsentativne Western blot trake te rezultati modela za 17 kDa proizvod CAS-3 koji predstavlja aktivni fragment izdvojen iz neaktivnog zimogena od 30 kDa duodenumau; B) Repräsentativne Western blot trake te rezultati modela za 30 kDa neaktivni zimogen CAS-3; C) Rezultati modela aktivnog 17 kDa fragmenta CAS-3 podešenog za koncentraciju neaktivnog 30 kDa zimogena CAS-3 u homogenatima duodenuma; D) Kvantifikacija jezgrenog signala aktivnog fragmenta CAS-3 iz epifluorescencijskih snimaka nakon kataliziranog polaganja fluorescentnih biljega. Jezgreni signal procijenjen je na temelju jezgrenih maski dobivenih segmentacijom signala jezgara nakon vezanja 4',6-diamidino-2-fenilindola (DAPI) uz pomoć treniranja Weka algoritama za strojno učenje; E) Repräsentativne snimke dobivene metodom višestrukog pojačanja fluorescentnog signala pomoću dostavljanja biotiniziranih peroksidaza reakcijom avidina i biotina te dostavom fluorescentnih biljega pomoću tiramidne amplifikacije. Isprekidana strelica označava snažno nakupljanje CAS-3 signala u skupini subepitelnih stanica u CTR GIPI skupini. Puna strelica označava stanicu s očuvanim CAS-3 signalom u STZ skupini koja nalikuje na enteroendokrine stanice.

Multivarijatna analiza morfometrijskih podataka te izražaja aktivnog fragmenta kaspaze-3 pokazala je da je na temelju navedenih parametara moguće razlikovati sve četiri skupine životinja – kontrolne životinje, STZ-iev štakorski model sAB-a, te obje skupine nakon središnje inhibicije GIP-R-a (Slika 21A) ukazujući na postojanje međudjelovanja učinaka STZ i GIP-R inhibitora u kontekstu strukturalne i funkcionalne promjene crijevne barijere. Kombinacija morfometrijskih parametara i izražaj aktivnog fragmenta kaspaze-3 objasnili su gotovo 57% varijance pokusa pri čemu je aktivnost kaspaze-3 bila združena s duljinom resica, dubinom kripti te njihovim omjerom (Slika 21B).



**Slika 21. Multivarijatna eksploracija strukturalnih promjena i promjena vezanih u izražaj CAS-3 pomoću analize glavnih komponenti.** A) Biplot dijagram koji prikazuje položaj pojedinih životinja u odnosu na prve dvije glavne komponente koje objašnjavaju 56,9% i 27,2% varijance. Grupe su opisane položajem pojedinih životinja te osjenčanim elipsama 95% pouzdanosti oko središta mase skupina. B) Prikazan je biplot prve i druge glavne komponente uz položaj vektora čija projekcija na osi odgovara doprinosima pojedinim komponentama. EH – visina epitelnih stanica; EW – širina epitelnih stanica; VL – duljina resica; CD – dubina kripti; CAS3 – aktivacija kaspaze-3.

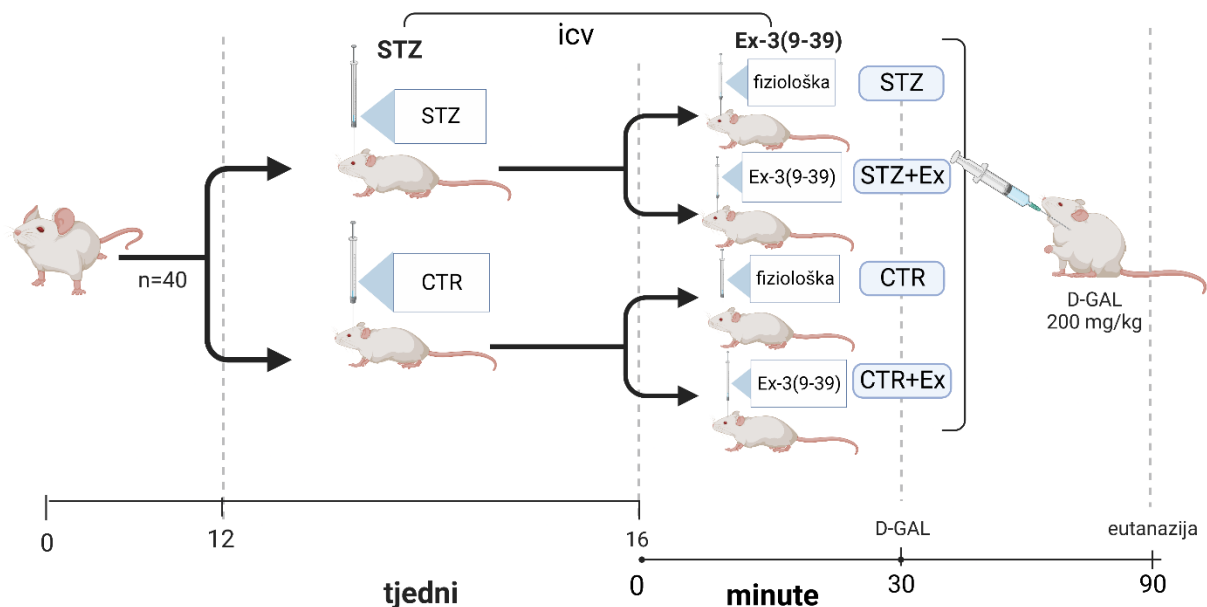
Inkretinski sustav u STZ-icv modelu sAB-a podrobnije je ispitan mjerenjem izražaja GLP-1R-a u tkivu duodenuma te u periduodenalnom masnom tkivu u kojima bi GLP-1 mogao ostvarivati učinke parakrinom signalizacijom (Slika 2). Obilježavanje GLP-1R-a u duodenumu prvenstveno je otkrilo signal u područja lakteala koji nije upućivao na postojanje razlike u izražaju GLP-1R-a između kontrolnih i STZ-icv životinja te između životinjama tretiranih fiziološkom otopinom te onih u kojih je proveden postupak inhibicije središnjih GLP-1R-a (Slika 22A,B). U periduodenalnom masnom tkivu nije bilo razlike izražaja GLP-1R-a između kontrolnih i STZ-icv životinja, no uočeno je da središnja inhibicija GLP-1 receptora potiče izražaj u STZ-icv životinja dok je isti učinak izostao u kontrolnoj skupini (Slika 22C,D).



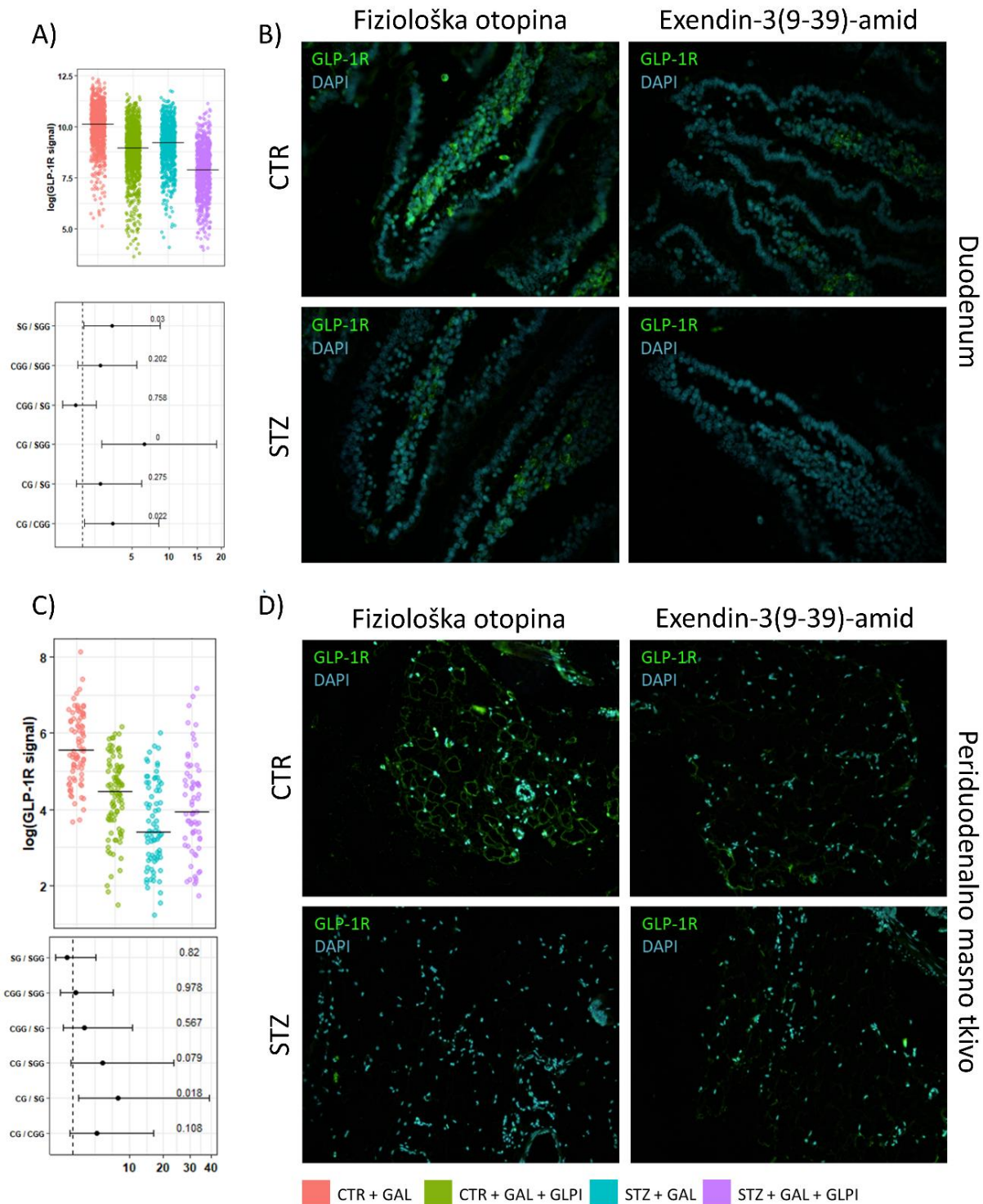
**Slika 22. Izražaj receptora za glukagonu sličan peptid-1 (GLP-1R) u duodenumu i periduodenalnom masnom tkivu u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti (STZ) sa ili bez središnje inhibicije receptora za peptid-1 sličan glukagonu (GLP-1R) exendin-3(9-39)-amid.** A) Neobrađeni podaci (gore) i dijagram učinaka iz mješovitog linearnog modela (dolje) za integriranu gustoću signala iz duodenuma; B) Reprezentativne epifluorescencijske snimke duodenuma s GLP-1R obilježenim zeleno i staničnim jezgrama obilježenim plavo; C) Neobrađeni podaci (gore) i dijagram učinaka iz mješovitog linearnog modela (dolje) za integriranu gustoću signala iz periduodenalnog masnog tkiva; D) Reprezentativne epifluorescencijske snimke periduodenalnog masnog tkiva s GLP-1R obilježenim zeleno i staničnim jezgrama obilježenim plavo.



Opisani učinak ispitan je u izdvojenom pokusu u kojem su sve životinje uz središnju inhibiciju receptora akutno oralno tretirane otopinom D-galaktoze (200 mg/kg) pomoću orogastrične sonde (Slika 23). Uočen je isti obrazac izražaja GLP-1R-a, prvenstveno u području lakteala. Akutni tretman D-galaktozom otkrio je razlike u regulaciji GLP-1R-a u duodenumu s obzirom da je izražaj nakon tretmana u STZ-icv životinja bio niži nego u kontroli, a središnji tretman GLP-1R inhibitorom dodatno je smanjio izražaj receptora u obje skupine životinja (Slika 24A,B). Niži izražaj GLP-1R-a u STZ-icv opažen je i u periduodenalnom masnom tkivu gdje je, kao i bez tretmana D-galaktozom, opažena interakcija tretmana STZ-icv i GLP-1R inhibitorom s obzirom da je središnja inhibicija inkretinske osi suprimirala izražaj GLP-1R-a u kontrolnih životinja, a povećala izražaj u STZ-icv skupini (Slika 24C,D).

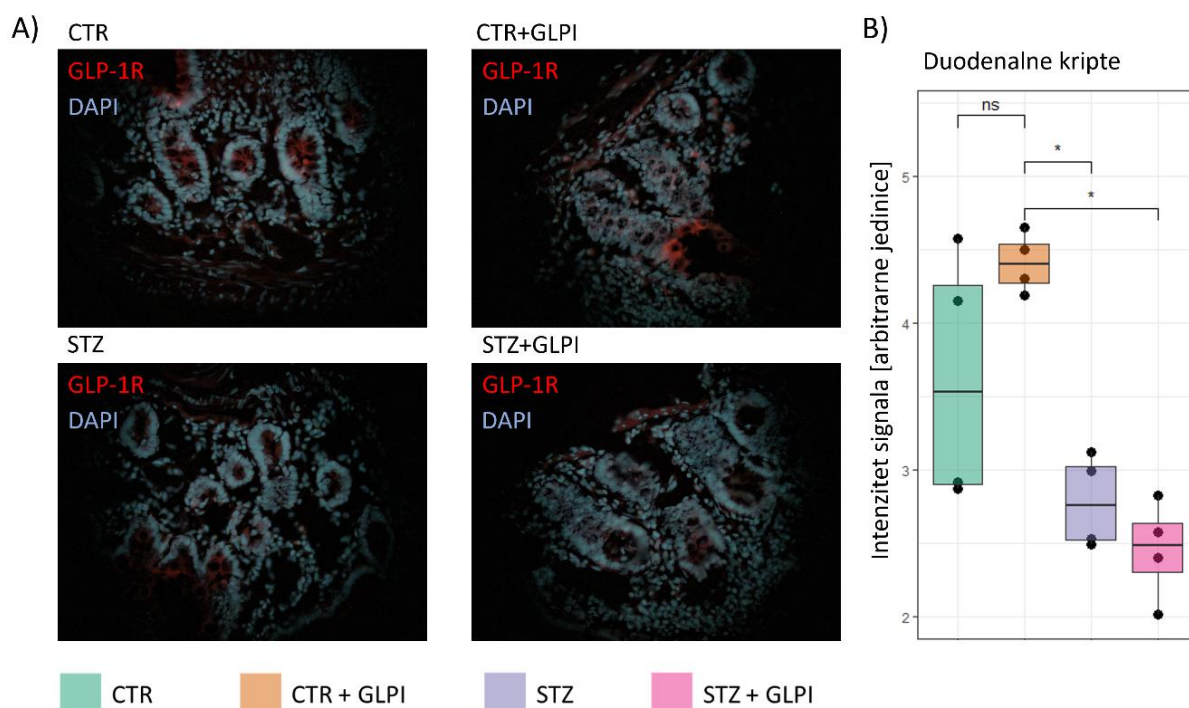


**Slika 23.** Dizajn eksperimenta u kojem su prikupljena tkiva za analizu učinaka akutnog oralnog tretmana D-galaktozom (200 mg/kg) nakon akutne središnje inhibicije receptora za za glukagonu sličan peptid-1 (GLP-1) u probavnom sustavu kontrolnih životinja i štakorskog modela sporadične Alzheimerove bolesti izazvanog intracerebroventrikularnom primjenom streptozotocina (STZ-icv). STZ – streptozotocin; CTR – kontrolna skupina; Ex-3(9-39) – eksendin-3(9-39) amid, inhibitor receptora za GLP-1.



**Slika 24. Izražaj receptora za glukagonu sličan peptid-1 (GLP-1R) u duodenumu i periduodenalnom masnom tkivu nakon akutnog tretmana oralnom otopinom D-galaktoze u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti sa (CG, SG) ili bez (CGG, SGG) središnje primjene inhibitora za GLP-1R (GLPI). A) Neobrađeni podaci (gore) i dijagram učinaka iz mješovitog linearnog modela (dolje) za integriranu gustoću signala iz duodenuma; B) Reprezentativne epifluorescencijske snimke duodenuma s GLP-1R obilježenim zeleno i staničnim jezgrama obilježenim plavo; C) Neobrađeni podaci (gore) i dijagram učinaka iz mješovitog linearnog modela (dolje) za integriranu gustoću signala iz periduodenalnog masnog tkiva; D) Reprezentativne epifluorescencijske snimke periduodenalnog masnog tkiva s GLP-1R obilježenim zeleno i staničnim jezgrama obilježenim plavo.**

Analiza izražaja GLP-1R-a u duodenalnim kriptama (u pokusu bez akutnog tretmana D-galaktozom (Slika 2)) pokazala je supresiju signala u STZ-icv skupini životinja, te kao i u prethodnim pokusima, interakciju između tretmana STZ-icv i GLP-1R inhibitora s obzirom da je tretman inhibitorom uzrokovao povećanje izražaja u kontrolnih životinja, a pad u STZ-icv modelu sAB (Slika 25A,B).

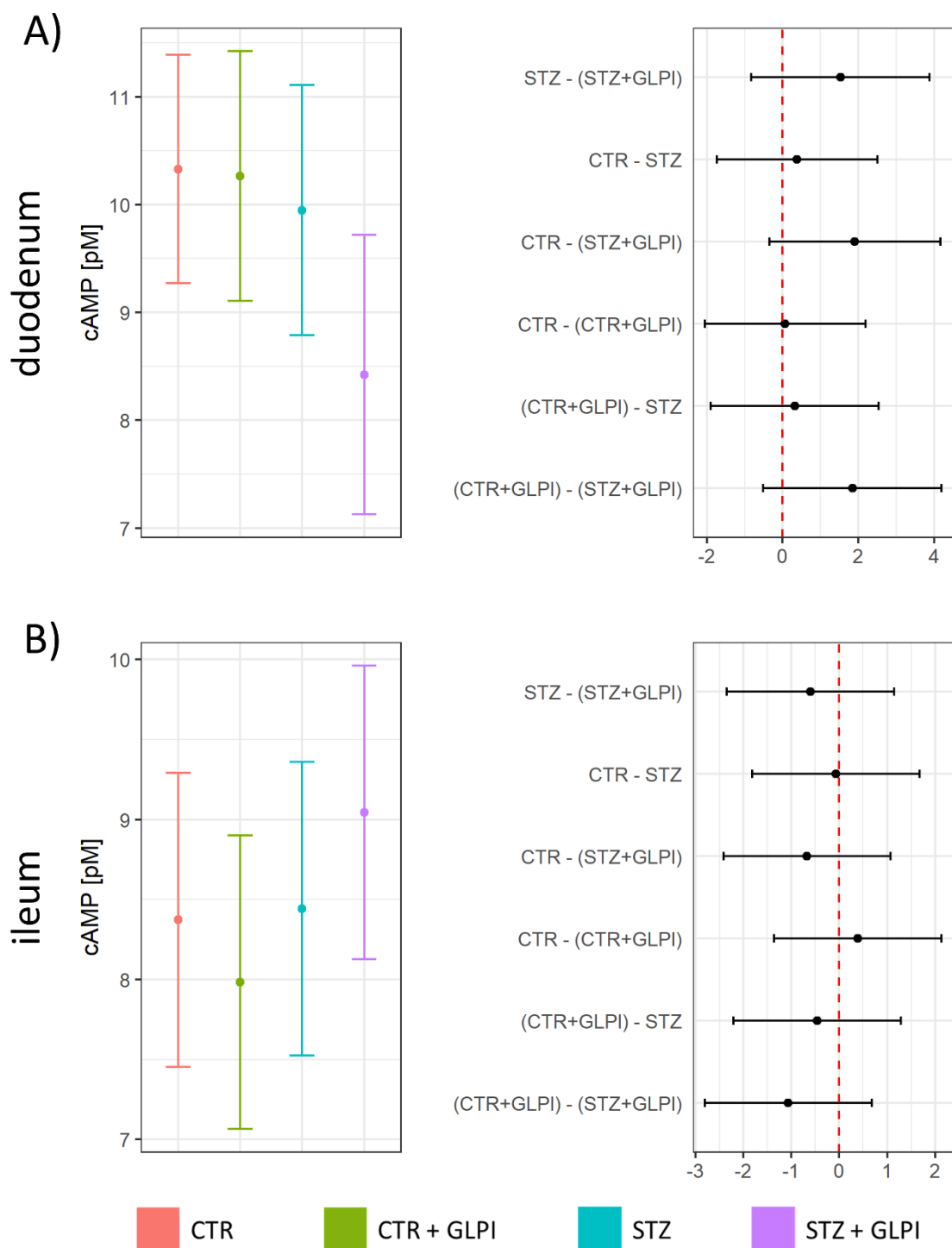


**Slika 25. Izražaj receptora za glukagonu sličan peptid-1 (GLP-1R) u duodenalnim kriptama u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti (STZ) sa ili bez središnje primjene inhibitora GLP-1R (GLPI).** A) Reprezentativne epifluorescencijske snimke duodenuma s GLP-1R obilježenim crveno i staničnim jezgama obilježenim plavo; B) Neobrađeni podaci te kutijasti dijagram ingetirane gustoće signala GLP-1R u kriptama. \* $p < 0,05$ ; ns  $p > 0,05$  (Wilcoxonov neparametrijski rank test).

Izražaj receptora na membrani stanica ne mora nužno biti u svezi sa signalizacijom te je u tkivu duodenuma izmjerena koncentracija cAMP-a, drugog glasnika koji služi kao posrednik signala vezanja GLP-a 1 za GLP-1R. Zanimljivo, koncentracija cAMP-a bila je podjednaka u svim skupinama osim u STZ-icv životinja nakon središnje inhibicije GLP-1R-a gdje je koncentracija cAMP-a bila snižena (Slika 26A). Opaženo sniženje cAMP-a u skladu je s opaženim promjenama te ukazuje na moguću lokalnu funkcionalnu supresiju GLP-1 sustava koja se otkriva u slučaju u kojem je GLP-1 signalizacija fiziološki aktivirana (npr. prisutnost hranjivih

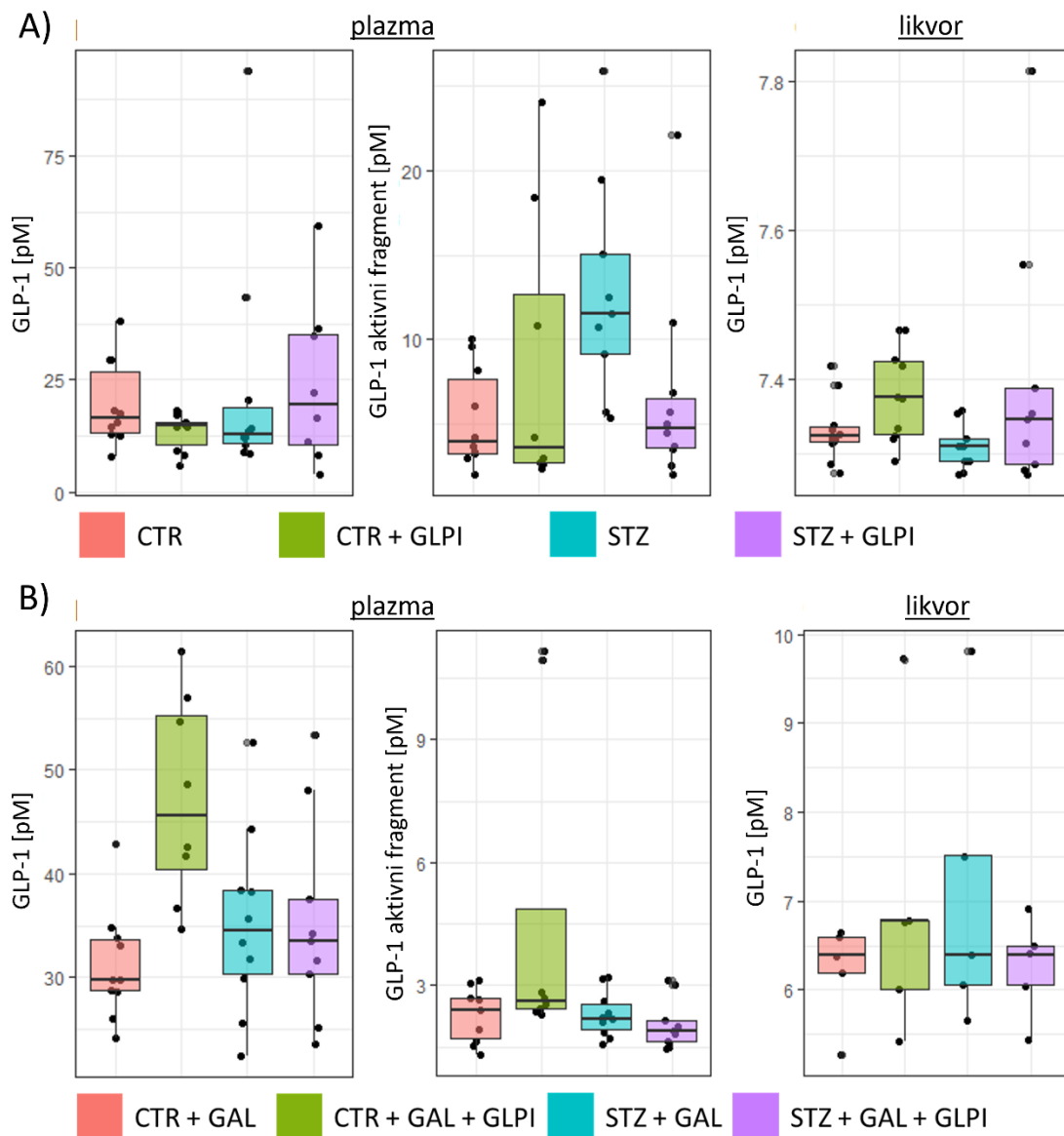
tvori poput D-galaktoze u lumenu (Slika 24)), te koja uzrokuje kompenzatorno povećanje izražaja u okolnom periduodenalnom masnom tkivu (Slika 22). Zanimljivo, koncentracija cAMP-a u ileumu ukazala je na obrnuti obrazac s povećanjem koncentracije u STZ-icv životinja nakon središnje inhibicije GLP-1R-a (Slika 26B) što govori u prilog ranije uočenoj regionalnoj specifičnosti odgovora na STZ-icv, te bi moglo, kao i izražaj GLP-1R-a u periduodenalnom masnom tkivu (Slika 22), govoriti u prilog kompenzatornom povećanju izražaja GLP-1R-a i GLP-1 signalizacije u okolnim tkivima.





**Slika 26. Analiza cikličkog adenozin-monofosfata (cAMP) izmjenjenog pomoću imunoenzijske tehnike duodenumu i ileumu u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti (STZ) sa ili bez središnje primjene inhibitora za peptid-1 sličan glukagonu (GLPI). A) Procjene srednje vrijednosti i 95% intervali pouzdanosti izvedeni iz linearnog modela koji odražava koncentraciju cAMP u duodenumu (A) i ileumu (B)(lijevo) te kontrasti tretmana koji prikazuju veličine učinaka (desno). Uz procjene srednjih vrijednosti prikazani su 95% intervali pouzdanosti.**

Ukupni GLP-1 te njegova aktivna frakcija izmjereni su u plazmi i cerebrospinalnom likvoru kontrolnih i STZ-icv životinja akutno intracerebroventrikularno tretiranih inhibitorom GLP-1R-a (Slika 2), te u ponovljenom pokusu s istovjetnim eksperimentalnim dizajnom u kojem su sve skupine životinja akutno primile otopinu D-galaktoze orogastričnom sondom (Slika 23). Iako nije uočena naglašena razlika u koncentraciji ukupnog GLP-a 1 u plazmi između kontrolnih i STZ-icv životinja tretiranih ili netretiranih GLP-1R inhibitorom, STZ-icv životinje imale su višu koncentraciju aktivnog fragmenta koja je spuštена na vrijednosti usporedive s onima izmjerenima u kontrolnih životinja nakon središnje primjene GLP-1R inhibitora (Slika 27A). U likvoru je uočeno povećanje u skupinama tretiranim GLP-1R inhibitorom (Slika 27A). U pokusu istog dizajna, ali u kojem su sve skupine životinja akutno oralno tretirane D-galaktozom (200 mg/kg) pomoću orogastrične sonde, opaženo je povećanje ukupnog GLP-a 1 u plazmi u odgovoru na središnju inhibiciju GLP-1R-a u kontrolnih životinja, dok je u STZ-icv skupini ovo povećanje izostalo (Slika 27B). Obrazac koncentracije aktivnog fragmenta GLP-a 1 u plazmi također je ukazao na interakciju tretmana STZ-om i GLP-1R inhibitorom s obzirom da je u kontrolnoj skupini uočeno povežanje, dok je u STZ-icv životinja zabilježeno neznatno sniženje medijana (Slika 27B). U cerebrospinalnom likvoru nije bilo zamjetnih promjena koncentracije GLP-a 1 (Slika 27B).



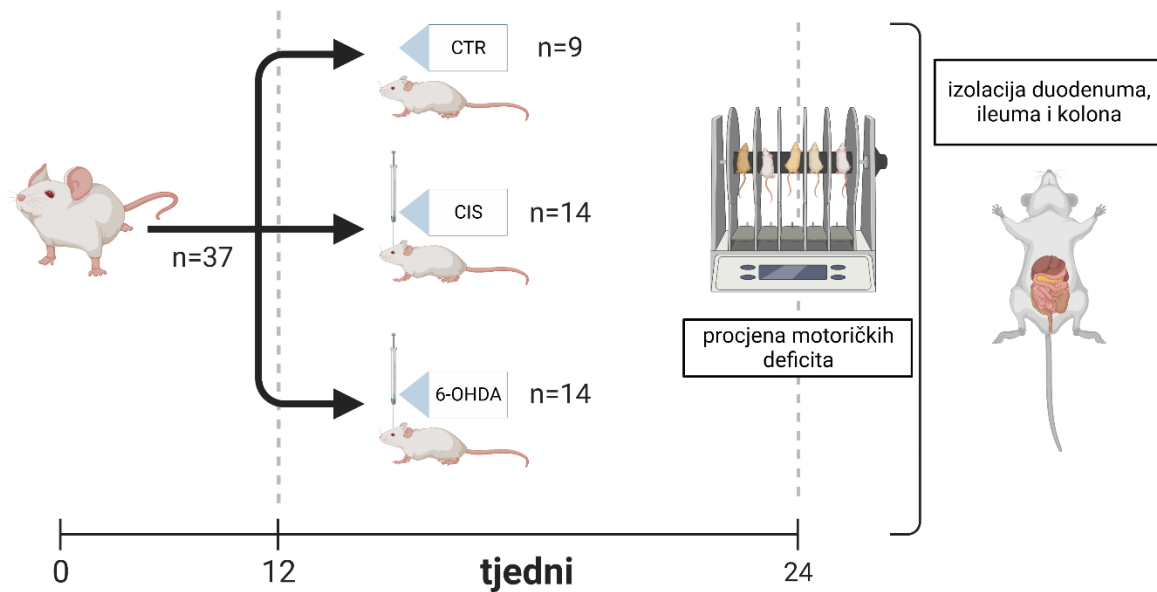
**Slika 27. Koncentracija peptida-1 sličnog glukagonu (GLP-1) i inzulotropnog polipeptida ovisnog o glukozi (GIP) u plazmi i likvoru. A) procjene u pokusu bez akutnog oralnog tretmana D-galaktozom; B) procjene u pokusu s akutnim oralnim tretmanom D-galaktozom. CTR – kontrola; STZ – štakorski model sporadične Alzheimerove bolesti; inhibitor receptora za peptid-1 sličan glukagonu (GLPI); GAL – galaktoza.**

## **5.2.Poremećaji u probavnom sustavu štakorskog modela Parkinsonove bolesti**

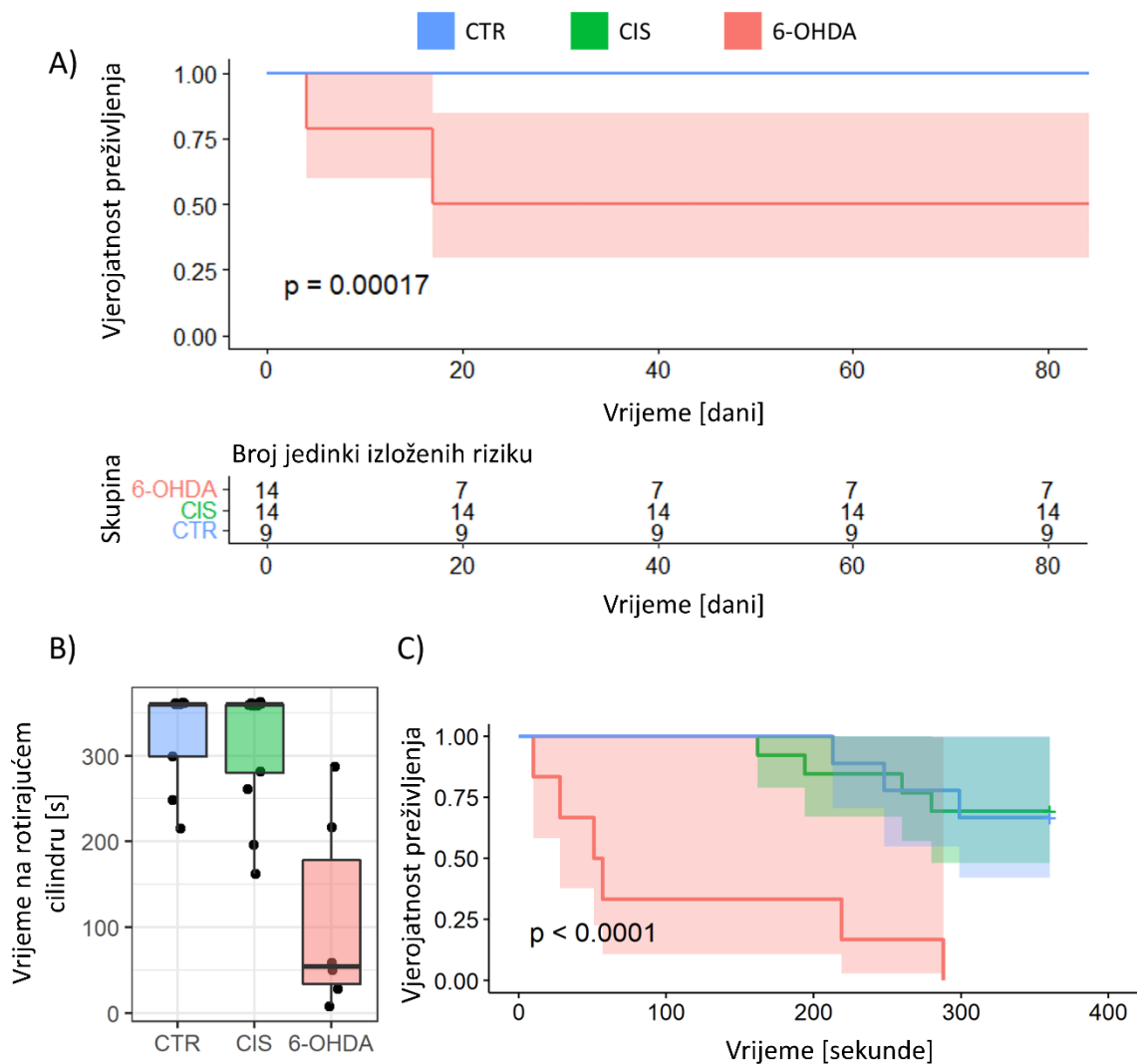
Iako u literaturi postoje podaci o promjenama strukture i funkcije probavnog sustava u 6-OHDA modelu PB-a, promjene redoks homeostaze do sad nisu sustavno istražene. Sukladno rezultatima pokusa na STZ-icv modelu AB-a (gdje je opisan poremećaj redoks homeostaze), a sukladno cilju 1, ispitani su biljezi redoks sustava u probavnom sustavu 6-OHDA modela PB-a. Obzirom da nisu pronađeni dokazi promjene biljega redoks homeostaze u tri različita anatomska segmenta crijeva (duodenum, ileum i kolon) istraživanja nisu proširena kao u slučaju STZ-icv modela sAB-a.

### **5.2.1. Štakorski model Parkinsonove bolesti izazvan intrastrijatalnom primjenom 6-hidroksidopamina nije povezan s razvojem crijevne dishomeostaze**

Redoks homeostaza istražena je u štakorskom modelu PB-a izazvanom intrastrijatalnom primjenom 6-OHDA-a uz korištenje dvojnih kontrola (CTR – intaktne životinje; CIS – kontrolne životinje koje su intrastrijatalno primile vehikul istim postupkom kojim je dostavljen 6-OHDA) kako bi se kvantificirao doprinos traume izazvane intrastrijatalnim davanjem opaženim promjenama (Slika 28). Model PB-a izazvan intrastrijatalnom primjenom 6-OHDA-a bio je okarakteriziran izraženim ispadanjem i mortalitetom kao što je pokazala analiza preživljavanja (Slika 29A). Stopa smrtnosti u životinja tretiranih 6-OHDA-om bila je 50% u prvih 4 tjedna pokusa, te se stabilizirala na 57% u zadnjoj točki mjerenja (Slika 29A). Testom rotirajućeg cilindra potvrđen je motorički deficit u 6-OHDA životinja, a u istom testu nije bilo razlike između CTR i CIS skupina. S obzirom na izražen učinak stroga, podaci dobiveni testiranjem pomoću kotrljajućeg cilindra analizirani su analizom preživljenja (Slika 29B,C)(533).



**Slika 28.** Dizajn pokusa za analizu biljega redoks homeostaze u probavnom sustavu štakorskog modela Parkinsonove bolesti izazvanog bilateralnom intrastrijatalnom primjenom 6-hidroksidopamina (6-OHDA). Korištene su dvije kontrolne skupine kako bi se procenio učinak invazivnog intrastrijatalnog tretmana na opažene promjene: intaktne životinje (CTR) i životinje intrastrijatalno tretirane vehikulom (za procjenu učinka 6-OHDA).



**Slika 29. Analiza preživljenja i motoričke funkcije u štakorskom modelu Parkinsonove bolesti (6-OHDA), te u intaktnih kontrolnih štakora (CTR) i kontrolnih štakora u kojih je intrastrijatalno dostavljen vehikul (CIS).** A) Krivulje preživljenja i tablica rizika za preživljenje; B) Izvedba na testu rotirajućeg cilindra. Rezultati su prikazani pomoću točaka neobrađenih vrijednosti te pomoću kutijastih dijagrama s medijanom i interkvartilnim rasponom; C) Analiza preživljenja izvedbe na testu rotirajućeg cilindra kako bi se u statističkom modelu uzeo u obzir naglašeni učinak stropa u kontrolnim skupinama. Vrijeme predstavlja kumulativno vrijeme provedeno u testu.

Nakon što je, na temelju izraženih motoričkih deficita, zaključeno da dobiveni model odgovara modelu PB-a opisanom u literaturi, izmjereni su biljezi redoks homeostaze u duodenumu, ileumu, i kolonu sve tri skupine životinja. Analizom sva tri crijevna segmenta zaključeno je da bilateralno intrastrijatalno davanje 6-OHDA-a povezano s motoričkim deficitima nije dostatno za narušavanje crijevne redoks homeostaze (12 tjedana nakon davanja 6-OHDA-a)(Slika 30, Tablica 2). Jedini naglašeno promijenjeni biljeg bila je lipidna peroksidacija u duodenumu koja

je (suprotno od očekivanog) u CIS i 6-OHDA skupini bila utišana. Postojanje istovjetne promjene u CIS i 6-OHDA skupini govori da je opisano vjerojatno uzrokovano postupkom intrastrijatalne dostave, a ne 6-OHDA-om (Slika 30, Tablica 2). Ostali biljezi redoks homeostaze bili su podjednaki u skupinama bez obzira na mjereni segment probavne cijevi što je govorilo u prilog malim učincima i velikoj nesigurnosti procjene. Disocijacija  $H_2O_2$  ukazala je na sličan obrazac smanjene aktivnosti u 6-OHDA skupini preokrenut u slučaju prisutnosti inhibitora katalaze (AZD-a) u duodenumu i ileumu, što bi moglo ukazivati na pojačanu ovisnost o katalazi za uklanjanje  $H_2O_2$  u tankom crijevu 6-OHDA modela PB-a. Međutim, učinci 6-OHDA-a na disocijaciju  $H_2O_2$  sa ili bez AZD-a bili su maleni (posebno u kontekstu činjenice da se aktivnost katalaze nerijetko mijenja eksponencijalno) te praćeni velikom nesigurnosti procjene. Nadalje, regresijska analiza učinka tretmana na ukupnu disocijaciju  $H_2O_2$  podešena za kapacitet disocijacije  $H_2O_2$  neosjetljive na AZD za čitavo tanko crijevo (segment crijeva uključen u analizu kao kovarijat) nije pružila dokaza za potvrdu postavljene hipoteze (533).

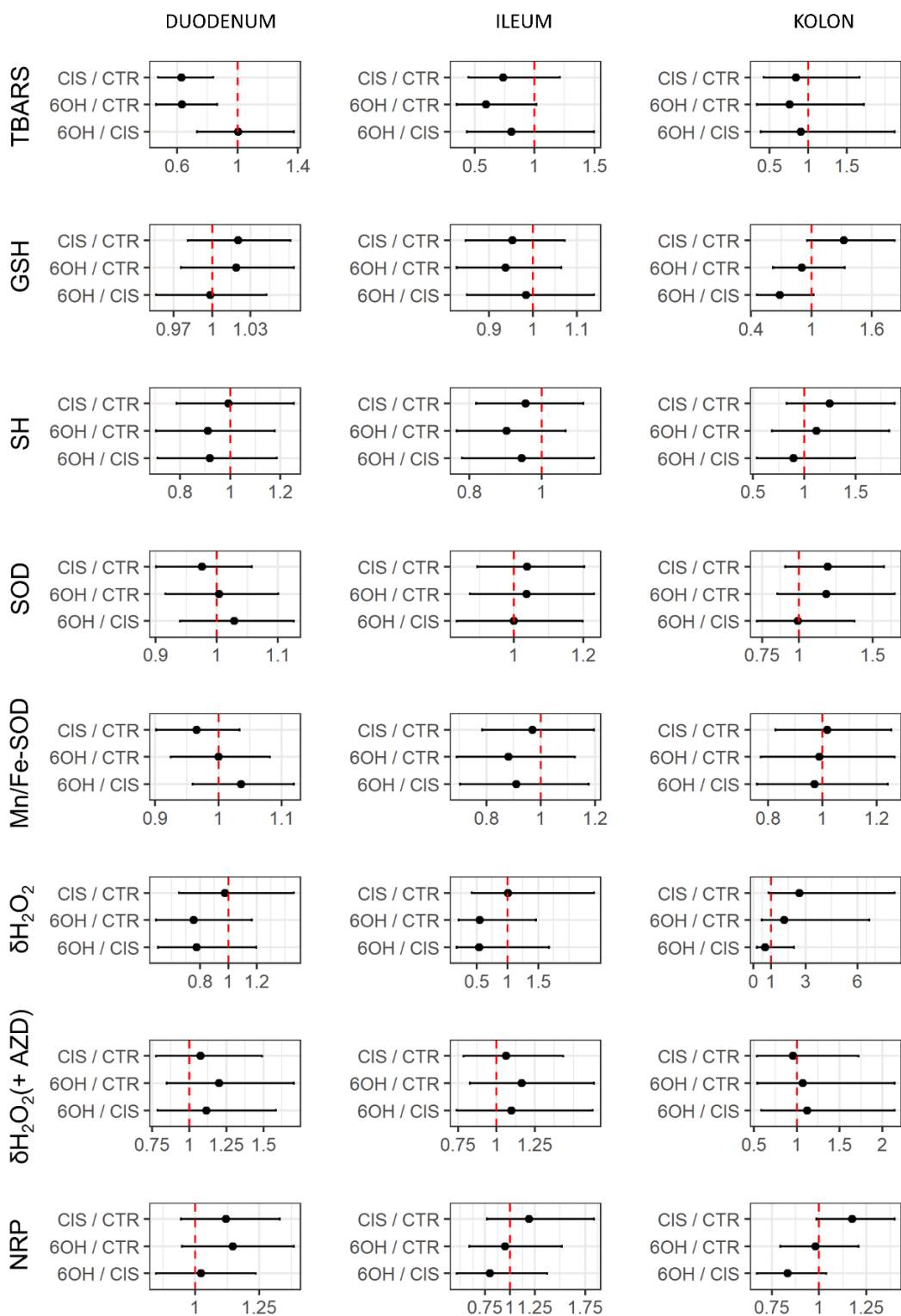
**Tablica 2 Rezultati regresijskih modela (srednje procijenjene vrijednosti i granice 95% intervala pouzdanosti) za biljege redoks homeostaze u duodenumu, ileumu, i kolonu u štakorskom modelu Parkinsonove bolesti izazvanom intrastrijatalnom dostavom 6-hidroksidopamina (6-OHDA), te u intaktnih kontrolnih štakora (CTR) i kontrolnih štakora u kojih je intrastrijatalno dostavljen vehikul (CIS).**

Biljeg	Skupina	Procijenjena vrijednost	Interval pouzdanosti
<b>duodenum</b>			
TBARS [ $\mu\text{M}$ ]	CTR	5.11	4.33 – 6.02
	CIS	3.21	2.73 – 3.79
	6-OHDA	3.23	2.64 – 3.94
GSH [M]	CTR	0.48	0.47 – 0.49
	CIS	0.49	0.48 – 0.50
	6-OHDA	0.49	0.48 – 0.51
SH [M]	CTR	0.60	0.53 – 0.69
	CIS	0.60	0.52 – 0.69
	6-OHDA	0.55	0.47 – 0.65
$\delta\text{THB}$ apsorbancija	CTR	0.16	0.15 – 1.17
	CIS	0.16	0.15 – 0.16
	6-OHDA	0.16	0.15 – 0.17
$\delta\text{THB}$ apsorbancija (+ 2mM KCN)	CTR	0.17	0.17 – 0.18
	CIS	0.17	0.16 – 0.17
	6-OHDA	0.17	0.17 – 0.18
$\delta\text{H}_2\text{O}_2$ [mM/min]	CTR	3.53	2.81 – 4.44
	CIS	3.45	2.74 – 4.33
	6-OHDA	2.67	2.03 – 3.51
$\delta\text{H}_2\text{O}_2$ (+ 0.025 mM AZD) [mM/min]	CTR	1.92	1.59 – 2.31
	CIS	2.06	1.71 – 2.48
	6-OHDA	2.30	1.85 – 2.87
NRP [arbitrarne jedinice]	CTR	10314.82	9341.93 – 11389.04
	CIS	11554.68	10466.98 – 12755.41
	6-OHDA	11826.50	10488.88 – 13334.71
<b>ileum</b>			
TBARS [ $\mu\text{M}$ ]	CTR	8.67	6.62 – 11.37
	CIS	6.38	4.73 – 8.60
	6-OHDA	5.14	3.58 – 7.39
GSH [M]	CTR	0.38	0.36 – 0.41
	CIS	0.37	0.34 – 0.39
	6-OHDA	0.36	0.33 – 0.39
SH [M]	CTR	0.53	0.48 – 0.57
	CIS	0.50	0.46 – 0.55
	6-OHDA	0.48	0.42 – 0.53
$\delta\text{THB}$ apsorbancija	CTR	0.09	0.08 – 0.09
	CIS	0.09	0.08 – 0.10
	6-OHDA	0.09	0.08 – 0.10



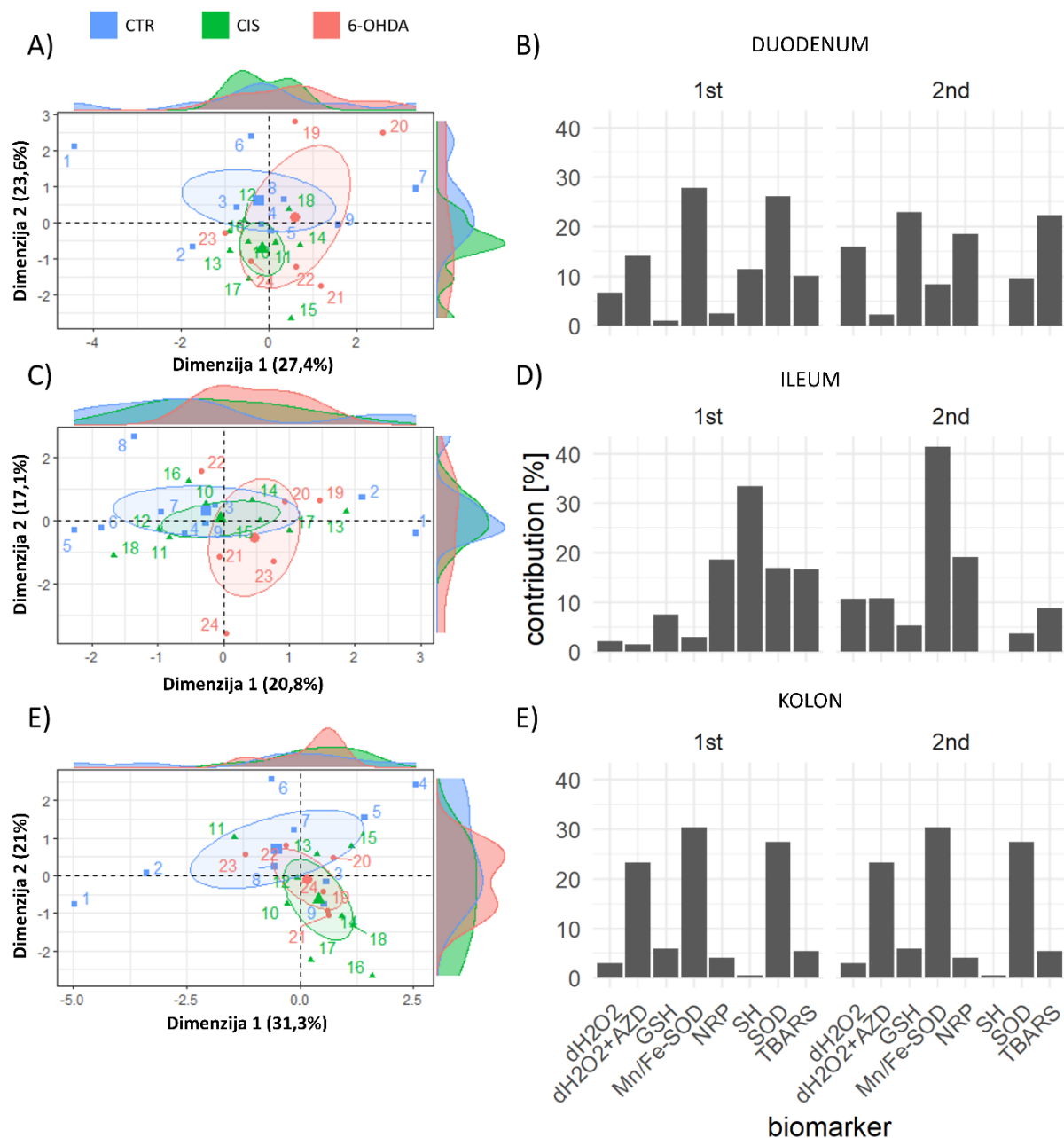
δTHB apsorbancija (+ 2mM KCN)	CTR	0.08	0.07 – 0.09
	CIS	0.08	0.07 – 0.09
	6-OHDA	0.07	0.06 – 0.09
δH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [mM/min]	CTR	2.11	1.32 – 3.38
	CIS	2.14	1.26 – 3.61
	6-OHDA	1.16	0.60 – 2.24
δH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (+ 0.025 mM AZD) [mM/min]	CTR	1.96	1.66 – 2.30
	CIS	2.08	1.73 – 2.49
	6-OHDA	2.28	1.81 – 2.86
NRP [arbitrarne jedinice]	CTR	6549.74	5186.74 – 8299.73
	CIS	7786.60	5993.22 – 10116.63
	6-OHDA	6206.71	4515.62 – 8531.13
kolon			
TBARS [μM]	CTR	17.87	12.00 – 26.62
	CIS	15.03	9.97 – 22.67
	6-OHDA	13.57	7.98 – 23.09
GSH [M]	CTR	0.41	0.34 – 0.50
	CIS	0.55	0.45 – 0.66
	6-OHDA	0.37	0.29 – 0.48
SH [M]	CTR	0.48	0.38 – 0.61
	CIS	0.60	0.47 – 0.76
	6-OHDA	0.54	0.39 – 0.74
δTHB apsorbancija	CTR	0.05	0.05 – 0.06
	CIS	0.06	0.06 – 0.08
	6-OHDA	0.06	0.05 – 0.08
δTHB apsorbancija (+ 2mM KCN)	CTR	0.07	0.07 – 0.08
	CIS	0.08	0.07 – 0.09
	6-OHDA	0.07	0.06 – 0.09
δH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [mM/min]	CTR	2.17	1.14 – 4.13
	CIS	5.72	3.09 – 10.58
	6-OHDA	3.83	1.72 – 8.51
δH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (+ 0.025 mM AZD) [mM/min]	CTR	1.69	1.21 – 2.36
	CIS	1.62	1.17 – 2.23
	6-OHDA	1.81	1.19 – 2.74
NRP [arbitrarne jedinice]	CTR	14164.69	12794.49 – 15681.63
	CIS	16629.04	14973.85 – 18467.19
	6-OHDA	13876.57	12116.68 – 15892.08

Sve vrijednosti predstavljaju izlazne parametre iz modela u kojemu je koncentracija proteina u uzorku definirana kao kovarijata. TBARS – spojevi reaktivni s tiobarbiturnom kiselinom (indikator lipidne peroksidacije); GSH – glutation (najzastupljeniji niskomolekularni tiol); SH – brojnost sulfhidrilnih skupina; δTHB – promjena apsorbancije 1,2,3-trihidroksibenzena (obrnuto proporcionalna aktivnosti superoksid-dismutaze); AZD – natrijev azid; NRP – redoks permanganometrija na nitrocelulozi.



**Slika 30. Dijagrami učinaka iz modela biljega redoks homeostaze izvedenih na temelju mjerenja u duodenumu, ileumu, i kolonu u štakorskom modelu Parkinsonove bolesti (6-OHDA), te u intaktnih kontrolnih štakora (CTR) i kontrolnih štakora u kojih je intrastrijatalno dostavljen vehikul (CIS). U svim modelima koncentracija proteina korištena je kao kovarijata. TBARS – spojevi reaktivni s tiobarbiturnom kiselinom (indikator lipidne peroksidacije); GSH – glutation (najzastupljeniji niskomolekularni tiol); SH – brojnost sulfhidrilnih skupina;  $\delta$ THB – promjena apsorbancije 1,2,3-trihidroksibenzena (obrnuto proporcionalna aktivnosti superoksid-dismutaze); AZD – natrijev azid; NRP – redoks permanganometrija na nitrocelulozi.**

Bez obzira na izostanak očitih razlika između skupina moguće je da su pojedini putevi povezani s redoks homeostazom suptilno promijenjeni što bi moglo biti vidljivo na razini pojedinih jedinki u eksperimentu. Kako bi se provelo detaljnije ispitivanje biljega redoks homeostaze i prividnog izostanka promjena, provedena je multivarijatna analiza svih izmjerenih biljega u sva tri segmenta crijeva pomoću analize glavnih komponenti. Multivarijatna analiza objasnila je skromni udio varijance za sve segmente crijeva (pomoću prve glavne komponente objašnjeno je 27,4% varijance za duodenum, 20,8% za ileum, te 31,3% za kolon). U analizi glavnih komponenti nije uočeno naglašeno grupiranje biljega vezanih uz redoks homeostazu niti u jednom anatomskom segmentu što pruža dodatne dokaze za izostanak redoks dishomeostaze u crijevu u 6-OHDA štakorskom modelu PB-a 12 tjedana nakon intrastrijatalne primjene toksina (533).



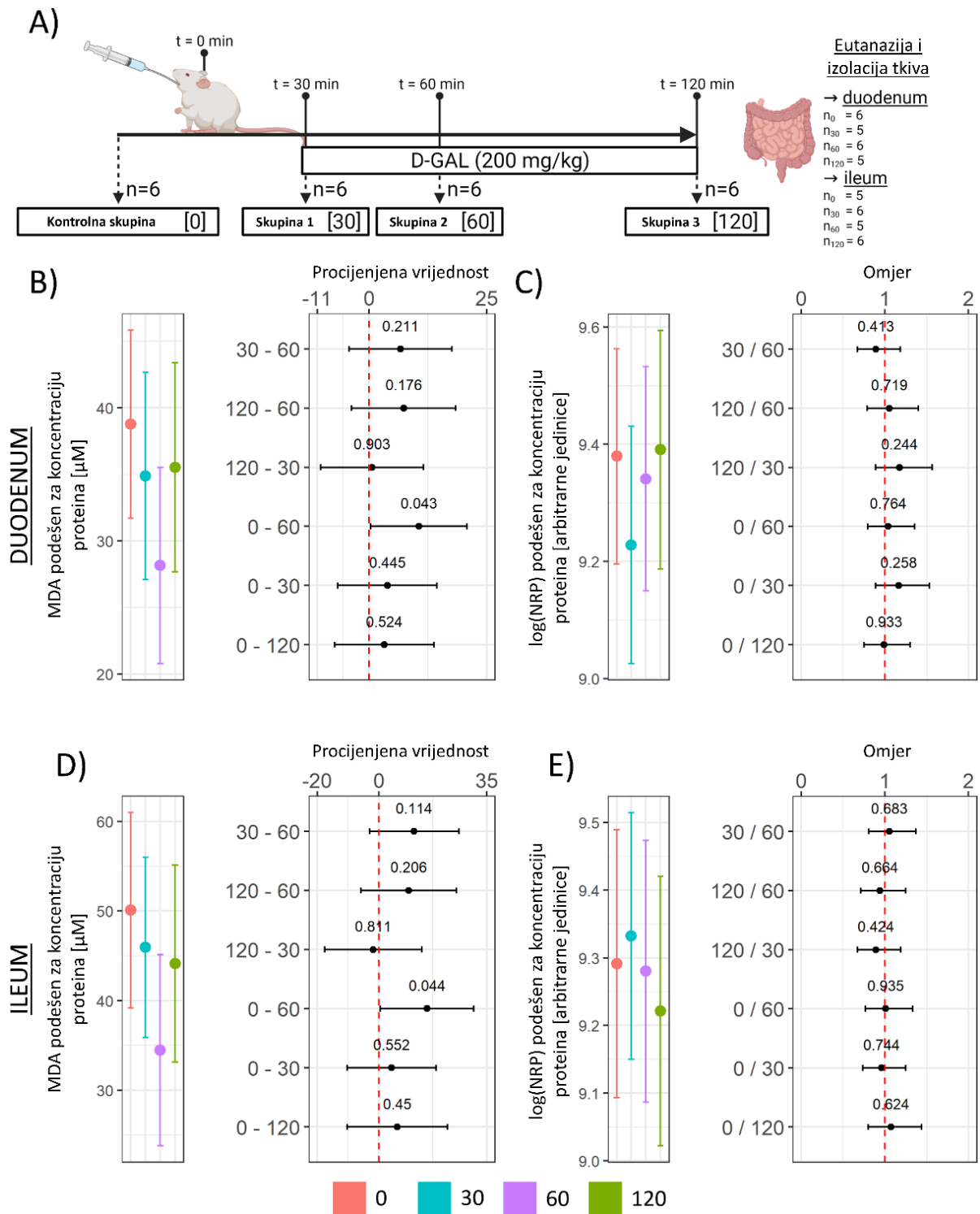
**Slika 31. Analiza glavnih komponenti biljega redoks homeostaze u duodenumu, ileumu, i kolonu u štakorskom modelu Parkinsonove bolesti (6-OHDA), te u intaktnih kontrolnih štakora (CTR) i kontrolnih štakora u kojih je intrastrijatalno dostavljen vehikul (CIS).** Biplot dijagram dobiven analizom glavnih komponenti biljega redoks homeostaze u duodenumu (A), ileumu (C) i kolonu (E) s prikazanim individualnim životinjama uz osjenčane elipse 95% pouzdanosti oko središta mase skupina; Biplot dijagram doprinosa pojedinih varijabli prve dvije glavne komponente dobivene analizom glavnih komponenti biljega redoks homeostaze u duodenumu (B), ileumu (D) i kolonu (E). dH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – razlika koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; dH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+AZD – razlika koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u prisutnosti NaN<sub>3</sub>; GSH – glutation; Mn/Fe-SOD – mitohondrijska frakcija superoksid dismutaza; NRP – redoks permanganometrija na nitrocelulozi; SH – koncentracija slobodnih sulfhidrilnih skupina; SOD – ukupna aktivnost superoksid-dismutaza; TBARS – spojevi reaktivni s tiobarbiturnom kiselinom.

### **5.3. Učinci oralne galaktoze na štakorske modele sporadične Alzheimerove bolesti i Parkinsonove bolesti**

U štakorskim modelima AB-a i PB-a, detaljno su ispitani učinci oralnog tretmana D-galaktozom koji je u prethodnim istraživanjima pokazao neuroprotektivne učinke (330,497,537,612). Budući da ne postoje podaci o akutnim učincima oralnog tretmana D-galaktozom na redoks homeostazu, prvo su provedena ispitivanja na zdravim životinjama s ciljem razumijevanja učinaka D-galaktoze na biljege redoks sustava u probavnom i središnjem živčanom sustavu. U akutnim pokusima na zdravim životinjama opisano je blagotvorno djelovanje D-galaktoze na redoks homeostazu u probavnom sustavu (554), plazmi i mozgu (561) te su ispitani su učinci kroničnog oralnog tretmana u modelima sAB-a i PB-a. Obzirom da su potvrđeni neuroprotektivni učinci D-galaktoze tijekom kroničnog tretmana u STZ-icv modelu sAB-a, a da rezultati analize biljega redoks homeostaze nisu pokazali da D-galaktoza djeluje modulacijom redoks homeostaze probavnog sustava, istraživanja su dodatno proširena ispitivanjem učinaka D-galaktoze u crijevu u kontekstu modulacije SCFA-a, BCFA-a i crijevne mikrobiote (provedeno temeljem suradnje uspostavljene s laboratorijem prof. Catherine Stanton i prof. Paula Rossa (APC Microbiome Ireland i Teagasc Food Research Centre, Cork, Irska)).

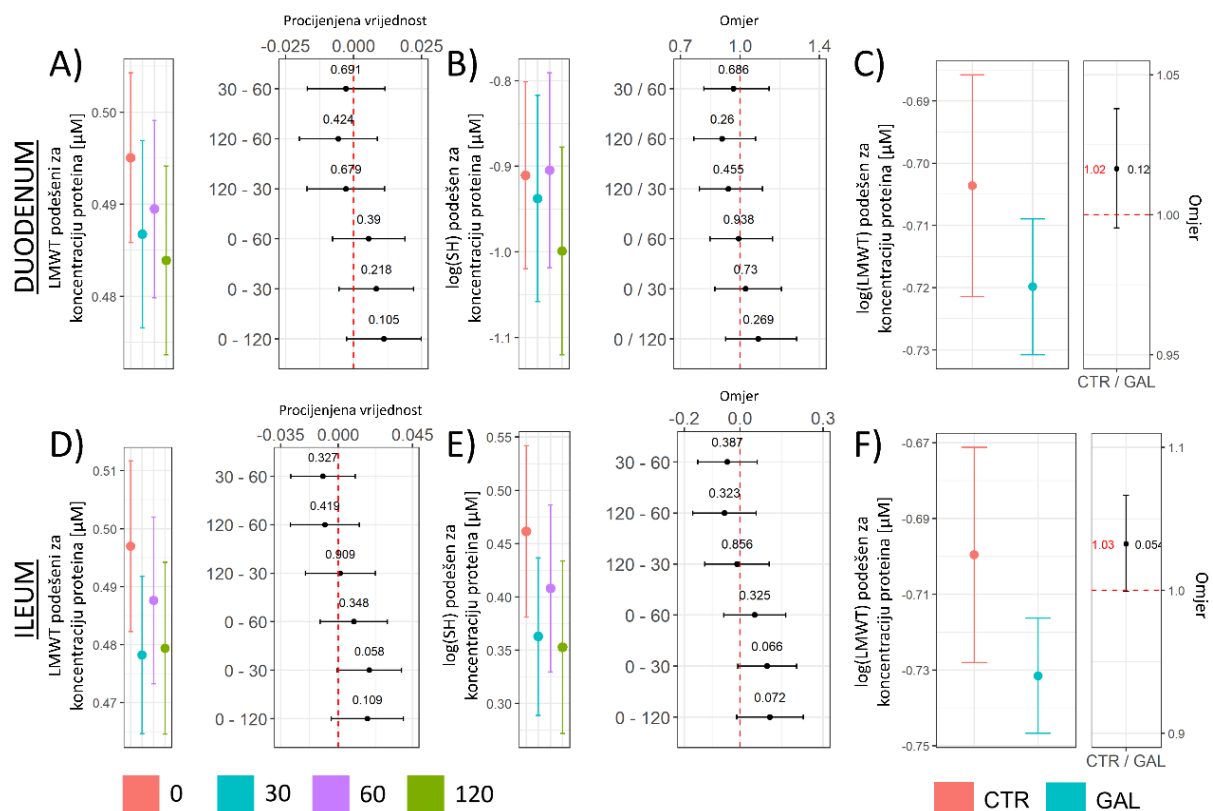
#### **5.3.1. Akutno primijenjena oralna galaktoza modulira redoks homeostazu u probavnom sustavu i mozgu zdravih štakora**

S obzirom da je primjena oralne otopine D-galaktoze pokazala neuroprotektivne učinke u STZ-icv modelu sAB-a (330,497,537,612), ispitani su učinci oralne D-galaktoze na redoks homeostazu u probavnom sustavu štakora. U akutnom *in vivo* pokusu ispitan je vremenski obrazac promjena redoks sustava u duodenumu i ileumu (dijelovima crijeva do kojih D-galaktoza dopire nakon oralnog davanja)(Slika 32A). Akutna oralna primjena otopine D-galaktoze (200 mg/kg) uzrokovala je o vremenu ovisno utišavanje peroksidacije lipida u duodenumu i ileumu (Slika 32B,D) s najnižim vrijednostima 60 min nakon dostave orogastričnom sondom. Ukupni reduktivni kapacitet izmjeren pomoću NRP-a pokazao je neznatne promjene u oba tkivna segmenta (Slika 32C,E)(533).



**Slika 32. Eksperimentalni dizajn, koncentracija spojeva reaktivnih s tiobarbiturnom kiselinom (TBARS) i ukupni reduktivni kapacitet izmjeren redoks permanganometrijom na nitrocelulozi (NRP) u duodenumu i ileumu štakora nakon akutne oralne primjene otopine D-galaktoze. A)** Eksperimentalni dizajn. Procjene izvedene iz linearnog modela koji odražava koncentraciju TBARS u duodenumu (B) i ileumu (D)(lijevo) te kontrasti tretmana koji prikazuju veličinu učinka (desno). Uz procjene srednjih vrijednosti prikazani su 95% intervali pouzdanosti. Procjene izvedene iz linearnog modela koji odražava NRP u duodenumu (C) i ileumu (E)(lijevo) te kontrasti tretmana koji prikazuju veličinu učinka (desno). Uz procjene srednjih vrijednosti prikazani su 95% intervali pouzdanosti.

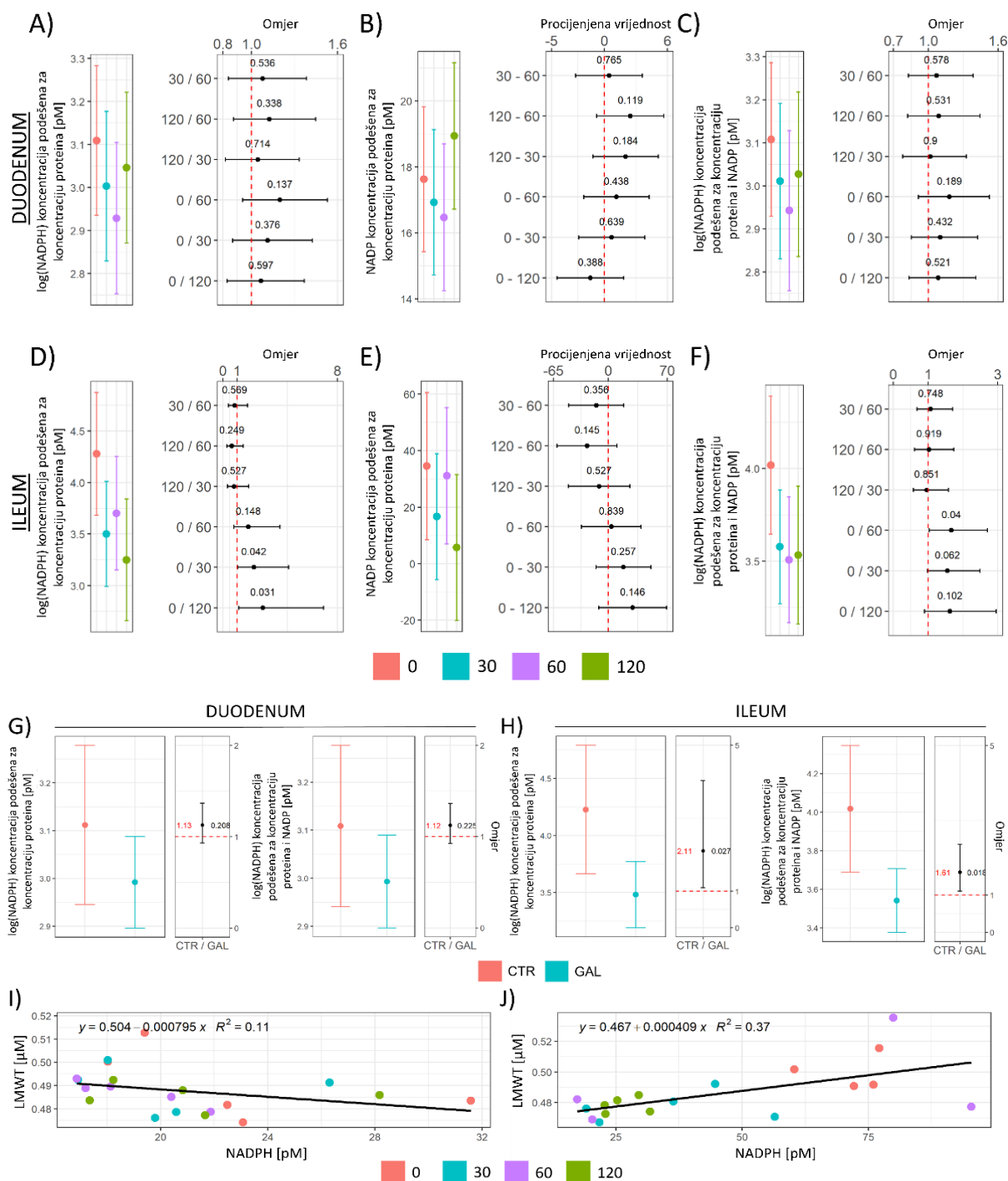
Biokemijska pozadina utišane lipidne peroksidacije ispitana je mjerenjem koncentracije niskomolekularnih tiola i slobodnih proteinskih sulfhidrilnih skupina. Tretman D-galaktozom uzrokovao je smanjenje niskomolekularnih tiola u duodenumu i u ileumu uz naglašeniji pad u distalnom tankom crijevu (Slika 33A,D). U duodenumu je uočen trend smanjenja dostupnih sulfhidrilnih skupina 120 min nakon tretmana (Slika 33B). U ileumu je smanjena koncentracije proteinskih sulfhidrila uočena već 30 min nakon oralnog tretmana D-galaktozom (Slika 33E). Zbirni model pokazao je da ta akutni oralni tretman otopinom D-galaktoze rezultira smanjenjem crijevnih niskomolekularnih tiola što bi moglo ukazivati na trošenje medijatora nukleofilnog tonusa (Slika 33C,F)(554).



**Slika 33. Koncentracija niskomolekularnih tiola (LMWT) i slobodnih sulfhidrilnih skupina proteina (SH) u duodenumu i ileumu štakora nakon akutnog oralnog tretmana otopinom D-galaktoze.** Procjene izvedene iz linearnog modela koji odražava koncentraciju LMWT u duodenumu (A) i ileumu (D)(lijevo) te kontrasti tretmana koji prikazuju veličinu učinka (desno). Uz procjene srednjih vrijednosti prikazani su 95% intervali pouzdanosti. Procjene izvedene iz linearnog modela koji odražava koncentraciju SH u duodenumu (B) i ileumu (E)(lijevo) te kontrasti tretmana koji prikazuju veličinu učinka (desno). Uz procjene srednjih vrijednosti prikazani su 95% intervali pouzdanosti. Procjene izvedene iz skupnog linearnog modela koji odražava koncentraciju LMWT nakon tretmana D-galaktozom u duodenumu (C) i ileumu (F)(lijevo) te kontrasti tretmana koji prikazuju veličinu učinka (desno). Uz procjene srednjih vrijednosti prikazani su 95% intervali pouzdanosti.

Koncentracija NADPH-a, najvažnijeg reducirajućeg ekvivalenta u stanici koji omogućava obnavljanje najzastupljenijeg niskomolekularnog tiola, GSH-a, izmjerena je s ciljem boljeg razumijevanja opaženog sniženja koncentracije tiola. Učinak D-galaktoze na koncentraciju NADPH-a u duodenumu i ileumu odražavao je obrazac opažen prilikom mjerenja niskomolekularnih tiola. D-galaktoza uzrokovala je sniženje NADPH-a koje je bilo više izraženo u ileumu (Slika 34A-H). S obzirom da je NADPH supstrat za glutation-reduktazu, enzim koji katalizira redukciju oksidiranog u reducirani GSH (613), te da je GSH predominantni niskomolekularni tiol u životinjskim stanicama (614), postavili smo hipotezu da bi opaženi fenomen D-galaktozom uzrokovanog pada niskomolekularnih tiola i NADPH-a mogao ukazivati na zajednički biološki fenomen aktivacije trošenja nukleofila. Zanimljivo, iako je u ileumu pronađena povezanost između koncentracije tiola i NADPH-a (Slika 34J), navedeno nije bio slučaj u duodenumu (Slika 34I) – moguće zbog suviše malenih učinaka koji su ostali „skriveni“ zbog znatne varijance ili zbog D-galaktozom uzrokovanog biokemijskog raspredanja NADPH-a i GSH-a (npr. povećano trošenje NADPH-a u biokemijskim putevima u kojima ne nastaje GSH)(554).





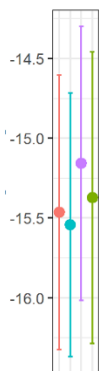
**Slika 34. Koncentracija reduciranog i ukupnog nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfata (NADPH i NADP) u duodenumu i ileumu štakora nakon akutnog oralnog tretmana otopinom D-galaktoze.** Procjene izvedene iz linearnog modela koji odražava koncentraciju NADPH u duodenumu (A) i ileumu (D)(lijevo) te kontrasti tretmana koji prikazuju veličinu učinka (desno). Procjene izvedene iz linearnog modela koji odražava koncentraciju NADP u duodenumu (B) i ileumu (E)(lijevo) te kontrasti tretmana koji prikazuju veličinu učinka (desno). Procjene izvedene iz linearnog modela koji odražava koncentraciju NADPH podešenu za koncentraciju NADP u duodenumu (C) i ileumu (F)(lijevo) te kontrasti tretmana koji prikazuju veličinu učinka (desno). Procjene izvedene iz skupnog linearnog modela koji odražava koncentraciju NADPH i NADPH podešenog za NADP u duodenumu (G) i ileumu (H) nakon tretmana otopinom D-galaktoze i kontrasti tretmana koji prikazuju veličinu učinka (lijevo). Korelacija koncentracije LMWT i NADPH u duodenumu (I) i ileumu (J). Uz procjene svih srednjih vrijednosti prikazani su intervali pouzdanosti.

Stanični niskomolekularni tioli važan su supstrat za glutation-peroksidaze (GPx; EC 1.11.1.9), obitelj enzima koji štite stanice od oksidativnog oštećenja katalizirajući redukciju  $H_2O_2$  u  $H_2O$  i lipidnih hidroperoksida u alkohole. Kapacitet disocijacije  $H_2O_2$  bio je povećan u duodenumu 60 min nakon tretmana oralnom D-galaktozom (0/60 CI: 0.54–1;  $t_{16} = -2.10$ ;  $p = 0.051$ |30/60 CI: 0.49–0.95;  $t_{16} = -2.46$ ;  $p = 0.025$ )(Slika 35A), dok je peroksidacijski kapacitet ostao nepromijenjen u ileumu (Slika 35C). Bazalna koncentracija  $H_2O_2$  nije bila bitno promijenjena u duodenumu (Slika 35B), dok je u ileumu uočen trend smanjenja u životinja tretiranih D-galaktozom (Slika 35D). Tretman D-galaktozom povećao je ukupnu aktivnost SOD-a u duodenumu (Slika 35E) (aktivnost enzima obrnuto je proporcionalna promjeni apsorbancije THB-a), dok je tijekom ispitivanja aktivnosti mitohondrijske frakcije uočeno smanjenje (Slika 35F). U ileumu, tretman D-galaktozom uzrokovao je povećanje ukupne aktivnosti SOD-a nakon 60 i 120 min (Slika 35G), a aktivnost Mn-SOD-a bila je uvećana jedino nakon 120 min (Slika 35H)(554).

**DUODENUM**

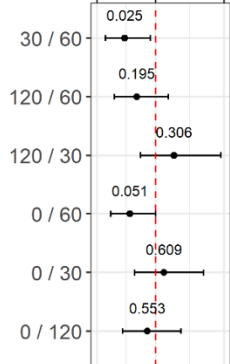
**A)**

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disocijacija podešena za koncentraciju proteina i bazalnu vrijednost H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M/min]



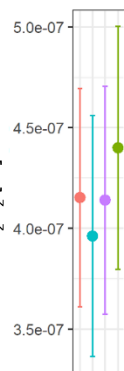
Omjer

0.4 1.0 1.7



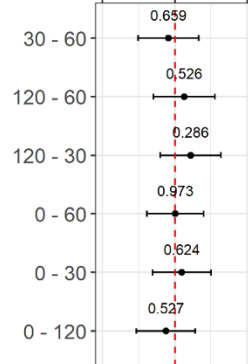
**B)**

Bazalna koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M]



Procijenjena vrijednost

-2e-07 0e+00 2e-07



**ILEUM**

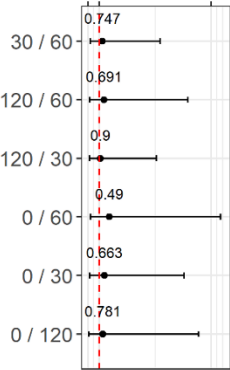
**C)**

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disocijacija podešena za koncentraciju proteina i bazalnu vrijednost H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M/min]



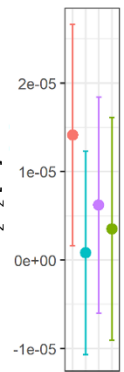
Omjer

0.110 10.0



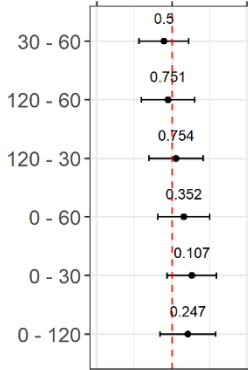
**D)**

Bazalna koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M]



Procijenjena vrijednost

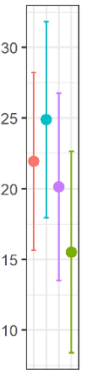
-5e-05 0e+00 5e-05



**DUODENUM**

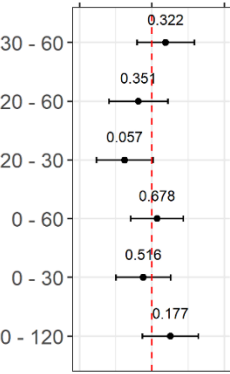
**E)**

Porast THB apsorbancije podešen za bazalnu apsorbanciju i koncentraciju proteina



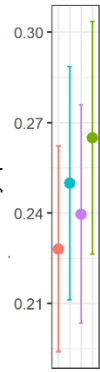
Procijenjena vrijednost

-0.25 0.00 0.25



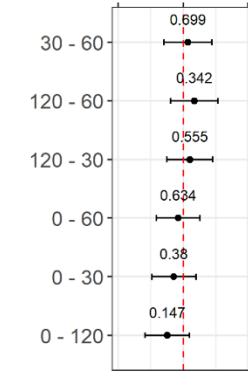
**F)**

Porast THB apsorbancije uz 2mM KCN podešen za bazalnu apsorbanciju i koncentraciju proteina



Procijenjena vrijednost

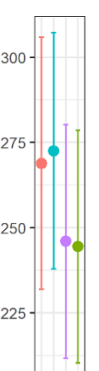
-0.15 0.00 0.15



**ILEUM**

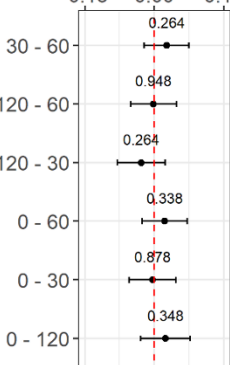
**G)**

Porast THB apsorbancije podešen za bazalnu apsorbanciju i koncentraciju proteina



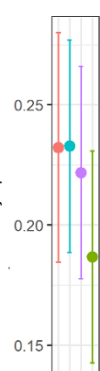
Procijenjena vrijednost

-0.15 0.00 0.15



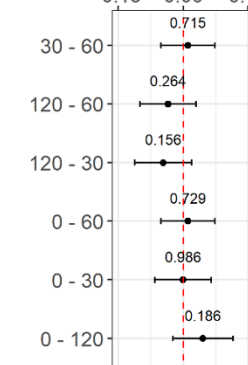
**H)**

Porast THB apsorbancije uz 2mM KCN podešen za bazalnu apsorbanciju i koncentraciju proteina



Procijenjena vrijednost

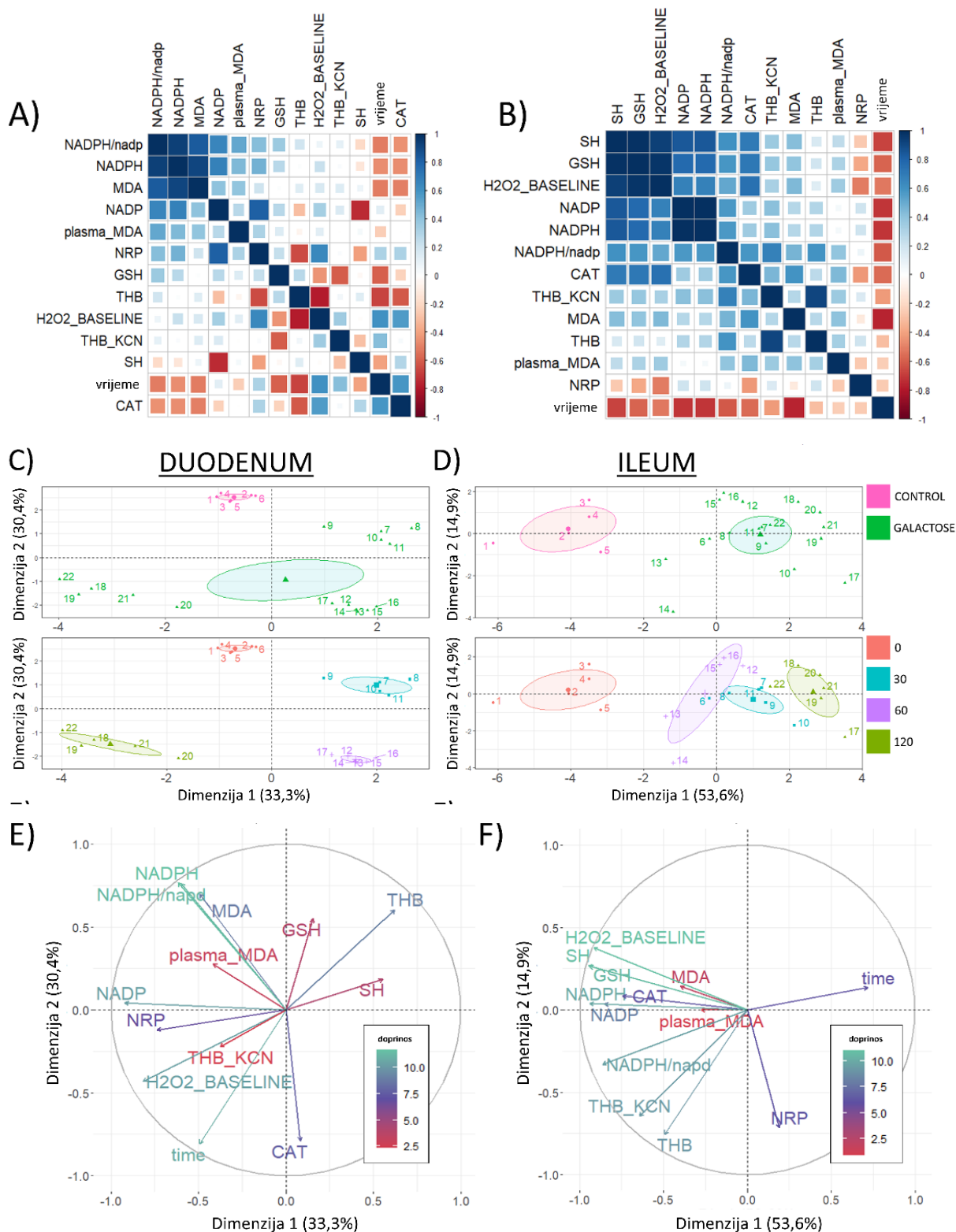
-0.15 0.00 0.15



**Slika 35. Bazalna koncentracija i kapacitet disocijacije  $H_2O_2$  i aktivnost superoksid-dismutaza (SOD) izmjerena posredno na temelju promjene porasta apsorbanције 1,2,3-trihidroksibenzena (THB) u duodenumu i ileumu štakora nakon akutnog oralnog tretmana otopinom D-galaktoze.** Procjene izvedene iz linearnog modela koji odražava kapacitet disocijacije  $H_2O_2$  u duodenumu (A) i ileumu (C)(lijevo) te kontrasti tretmana koji prikazuju veličinu učinka (desno). Procjene izvedene iz linearnog modela koji odražava bazalnu koncentraciju  $H_2O_2$  u duodenumu (B) i ileumu (D)(lijevo) te kontrasti tretmana koji prikazuju veličinu učinka (desno). Procjene izvedene iz linearnog modela koji odražava porast apsorbanције THB (ukupnu aktivnost SOD) u duodenumu (E) i ileumu (G)(lijevo) te kontrasti tretmana koji prikazuju veličinu učinka (desno). Procjene izvedene iz linearnog modela koji odražava porast apsorbancije THB u prisutnosti KCN (aktivnost Mn/Fe-SOD) u duodenumu (F) i ileumu (H)(lijevo) te kontrasti tretmana koji prikazuju veličinu učinka (desno). Uz procjene svih srednjih vrijednosti prikazani su 95% intervali pouzdanosti.

Opća povezanost svih biljega redoks homeostaze istražena je Spearmanovom korelacijom na temelju rangiranja procjena dobivenih iz opisanih modela (Slika 36). Promjene TBARS-a u plazmi uključene su u analizu kako bi se razjasnilo odražavaju li pojedine promjene lokalne ili sistemske učinke. Vrijeme je uvedeno u analizu kao kontinuirana varijabla radi lakše procjene obrasca akutnih učinaka D-galaktoze. Na ovaj su način, pojednostavljenim modelom, vjerno opisane monotone promjene (npr. promjene niskomolekularnih tiola u duodenumu), ali ne i nemonotone promjene (npr. duodenalni NADP). S obzirom na biološki kontekst (podaci odražavaju relativno kratki vremenski tijek događaja po dostavljanju otopine D-galaktoze), opažene monotone povezanosti (naglašene ovim pristupom), vjerojatno odražavaju najvažnija biološka zbivanja. Sve korelacije prikazane su po principu grupiranja na temelju analize glavnih komponenti. U duodenumu, najsnažniji je učinak grupiranja opažen za koncentraciju NADPH-a, NADP-ispravljenog NADPH-a, NADP-a, te MDA-a (TBARS-a)(Slika 36A). Koncentracija TBARS-a u plazmi bila je najsnažnije povezana ( $\rho = 0.51$ ) s NADPH-om (ispravljenim za koncentraciju NADP-a) dok je nešto slabija povezanost opažena između TBARS-a u plazmi i duodenumu ( $\rho = 0.40$ ) (Slika 36A). Najsnažniju korelaciju s tkivnim reduktivnim kapacitetom (NRP-om) pokazali su NADP ( $\rho = 0.81$ ) i THB ( $\rho = -0.66$ ) što je govorilo u prilog povećanog reduktivnog kapaciteta tkiva u kojem je bila izraženija aktivnost SOD-a. Proteklo vrijeme i tvari koje posreduju nukleofilni tonus (NADPH ispravljen za koncentraciju NADP-a, NADPH-a, GSH/LMWT-a, SH-a) pokazali su dosljednu negativnu korelaciju (vrijeme i NADPH ispravljen za koncentraciju NADP-a ( $\rho = -0.51$ ), NADPH-a ( $\rho = -0.47$ ), GSH/LMWT-a ( $\rho = -0.59$ ), SH-a ( $\rho = -0.40$ )) (Slika 36A). Istovremeno, tretman D-galaktozom uzrokovao je porast aktivnosti SOD-a (THB  $\rho = -0.68$ ) i katalaza/peroksidaza ( $\rho = 0.58$ ), što je uzrokovalo smanjenje lipidne peroksidacije (TBARS/MDA  $\rho = -0.52$ )(Slika 36A), što govori u prilog hipotezi da je opaženo trošenje nukleofilnih supstrata bilo vjerojatnije povezano s aktivacijom mehanizama zaštite redoks homeostaze nego s redoks dishomeostazom

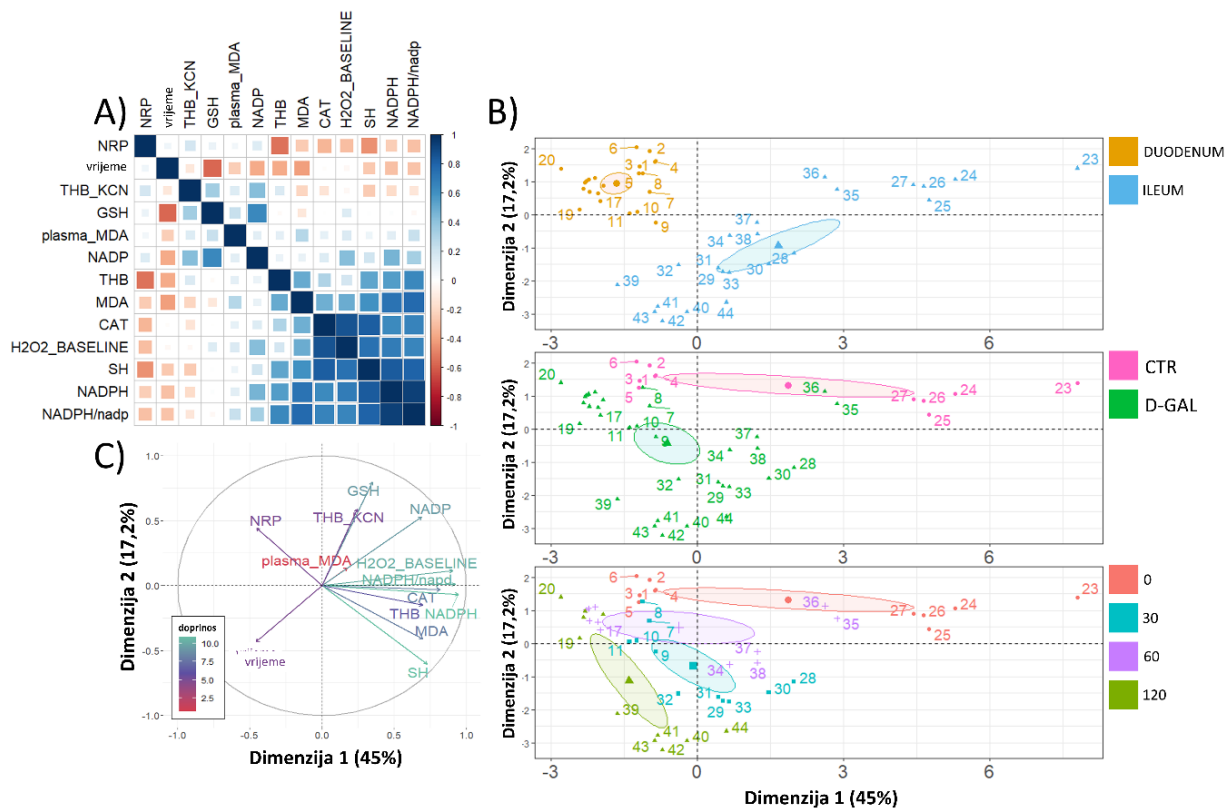
koja teži elektrofilnom opterećenju i oksidativnom stresu. U ileumu je uočen sličan fenomen grupiranja molekularnih posrednika koji održavaju nukleofilni tonus, međutim, suprotno opaženom u tkivu duodenuma, LMWT/GSH i SH grupirali su se skupa s NADP-om i NADPH-om (Slika 36B), potencijalno ukazujući na snažniji učinak na redoks homeostazu s obzirom da je u ileumu uočeno izraženije trošenje nukleofilnih supstrata. Istovjetno obrascu opaženom u duodenumu, u ileumu je opažena negativna korelacija vremena od početka izloženosti D-galaktozi i posrednika nukleofilnog tonusa – SH-a ( $\rho = -0.67$ ), LMWT/GSH-a ( $\rho = -0.58$ ), NADP-a ( $\rho = -0.71$ ), NADPH-a ( $\rho = -0.71$ ), te NADPH-a ispravljenog za koncentraciju NADP-a ( $\rho = -0.62$ ) (Slika 36B). Nadalje, kao i u duodenumu, vrijeme proteklo od tretmana D-galaktozom bilo je u pozitivnoj korelaciji s aktivnosti SOD-a (iako je u ileumu snažnija korelacija uočena za Mn-SOD: THB (obrnuto proporcionalno aktivnosti SOD-a)  $\rho = -0.30$ ; THB KCN (obrnuto proporcionalno aktivnosti Mn-SOD-a)  $\rho = -0.42$ ) i u negativnoj korelaciji s produktima peroksidacije lipida ( $\rho = -0.76$ ) (Slika 36B). Za razliku od obrasca u duodenumu, u ileumu je postojala pozitivna korelacija TBARS-a s aktivnosti katalaza/peroksidaza ( $\rho = 0.59$ ), a negativna s vremenom proteklom od tretmana D-galaktozom ( $\rho = -0.56$ ) (Slika 36B). Komplementarna eksplorativna analiza provedena je izdvajanjem glavnih komponenti. U duodenumu, tretman D-galaktozom primarno je bio u ravnini s drugom glavnom komponentom kojoj su najviše doprinosile varijable: katalaze/peroksidaze (15,7%), NADPH-a (14,8%), NADPH-a ispravljenog za koncentraciju NADP-a (14,7%), te TBARS/MDA-a (12,3%) (Slika 36C,E). U kontekstu vremena, najveći je pomak paralelan s drugom komponentom opažen između vremenskom razmaka između 30 i 60 min (Slika 36C). Promjene između 0 i 30 min, te 60 i 120 min bile su poravnate s prvom glavnom komponentom s pozitivnim vektorom za rani pomak (između 0 i 30 min), a negativnim za kasni pomak (60 i 120 min). Prvoj komponenti najviše je doprinosila varijabla NADP-a (19,6%), a bazalna koncentracija  $H_2O_2$  i NRP doprinosili su s 15,4% i 12,6%. U ileumu, tretman D-galaktozom i promjene u vremenu ekskluzivno su zahvaćeni prvom komponentom koja je objašnjavala 53,6% varijance (u usporedbi s drugom koja je objašnjavala tek 14,9%) (Slika 36D,F). Najznačajniji doprinos prvoj komponenti ostvarile su varijable SH-a (12,9%), NADPH-a (12,7%), te LMWT/GSH-a (12,7%) – sve biljezi biološkog sustava zaduženog za održavanje nukleofilnog tonusa redoks homeostaze. Doprinos koncentracije TBARS-a u plazmi bio je zanemariv u duodenumu (3,3% i 1,2% za prve dvije komponente) i u ileumu (0,5% i 0% u ileumu) ukazujući na to da su opisane promjene odražavale lokalne, a ne sistemske prilagodbe redoks sustava (Slika 36)(554).



**Slika 36. Korelacije biljega redoks homeostaze u duodenumu i ileumu štakora nakon akutnog oralnog tretmana otopinom D-galaktoze.** Spearmanove rang korelacije biljega redoks homeostaze u duodenumu (A) i ileumu (B) poredanih po prvoj komponenti iz analize glavnih komponenti. Analiza glavnih komponenti biljega redoks homeostaze u duodenumu (C) i ileumu (D). Biplot prikazuje položaj pojedinih životinja u odnosu na prvu i drugu glavnu komponentu. Boje prikazuju tretman (gore: bazalna kontrola u usporedbi s tretmanom oralnom otopinom D-galaktoze) i vrijeme od izlaganja tretmanu (dolje: bazalna kontrola u usporedbi sa stanjem 30, 60, i 120 min po izlaganju otopini D-galaktoze). Doprinos pojedinih biljega redoks homeostaze prvim dvjema glavnim komponentama u duodenumu

(E) i ileumu (F). Doprinos varijable prikazan je pomoću vektora i proporcionalan je projekciji na osi. NRP – redoks permanganometrija na nitrocelulozi; time – vrijeme od izlaganja D-galaktozi (kontinuirana varijabla izražena u minutama); THB\_KCN – indikator aktivnosti Mn/Fe-SOD; GSH – glutation; MDA – malondialdehid; NADP – indikator ukupne aktivnosti SOD; CAT – aktivnost katalaze; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>\_BASELINE – koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, SH – slobodne sulfhidrilne skupine; NADPH – reducirani nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfat; NADPH/nadp – omjer koncentracija NADPH i NADP.

Naposlijetku, korelacije ranga ispitane su združeno za oba tkiva (duodenum i ileum) s ciljem istraživanja povezanosti promjena redoks sustava čitavog tankog crijeva. Analiza rang korelacija ukazala je na ustaljeni obrazac negativne korelacije između vremena proteklog od davanja otopine D-galaktoze i LMWT/GSH-a ( $\rho = -0.57$ ), lipidne peroksidacije ( $\rho = -0.41$ ), i NADP-a ( $\rho = -0.37$ )(Slika 37A). Vrijeme proteklo od tretmana D-galaktozom također je bilo u pozitivnoj korelaciji s ukupnom aktivnosti SOD-a (THB  $\rho = -0.37$ )(Slika 37A). Uočena je negativna korelacija između aktivnosti SOD-a i TBARS-a (THB  $\rho = 0.50$ ), koja vjerojatno ukazuje na ulogu superoksidnih radikala u formiranju lipidnih peroksilnih radikala – ključan korak u propagaciji lipidne peroksidacije (615). Pozitivna korelacija TBARS-a i molekularnih posrednika nukleofilnog tonusa (NADPH-a korigiranog za NADP ( $\rho = 0.77$ ) i NADPH-a ( $\rho = 0.74$ )) odražavala je D-galaktozom potaknutu aktivaciju sustava obrane od elektrofila koji troši nukleofilne supstrate (Slika 37A). Multivarijatnom komplementarnom analizom pomoću analize glavnih komponenti jasno su razdvojeni učinci: i) tkivnih segmenata (gornji dio); ii) tretmana galaktozom (srednji dio); te iii) vremena proteklog od tretmana (donji dio)(Slika 37B). Prvom glavnom komponentom objašnjeno je 45%, a drugom 17,2 % ukupne varijance (Slika 37B,C). Varijable koje su najviše doprinijele objašnjavanju prve glavne komponente bile su NADPH (15,3%), NADPH ispravljen za koncentraciju NADP-a (14,6%), te bazalna koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (14%)(Slika 37B,C)(554).

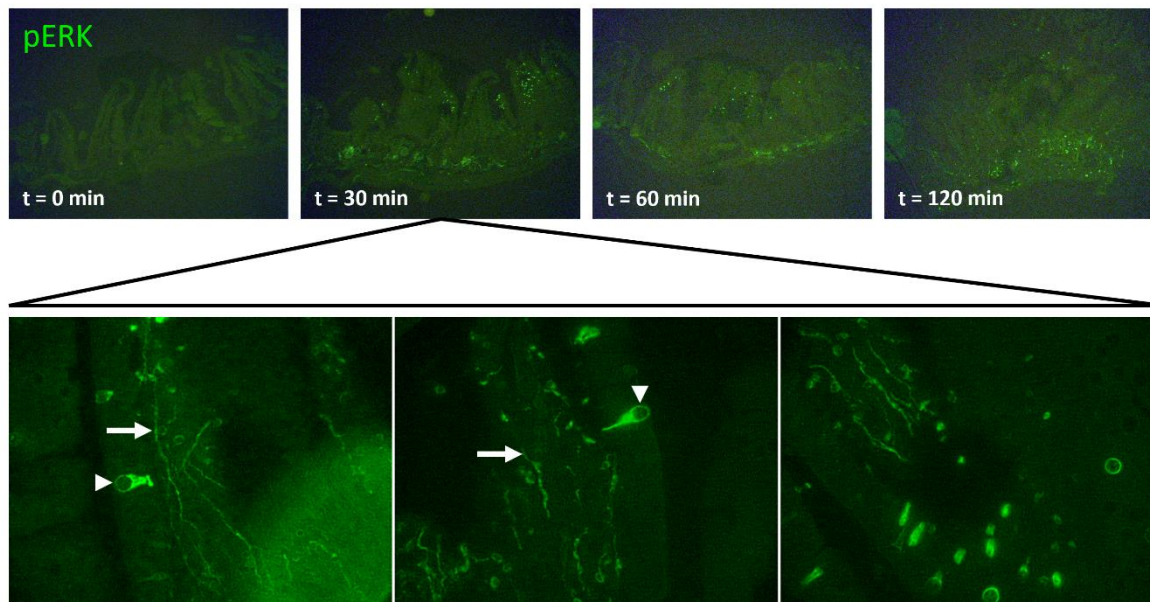


**Slika 37** Korelacije biljega redoks homeostaze i analiza glavnih komponenti u tankom crijevu (duodenumu i ileumu) štakora nakon akutnog oralnog tretmana otopinom D-galaktoze. A) Spearmanove rang korelacije biljega redoks homeostaze u tankom crijevu poredanih po prvoj komponenti iz analize glavnih komponenti; B) Biplot dijagram sastavljen na temelju analize glavnih komponenti koji prikazuje pojedine životinje u prostoru s obzirom na odnos s prvom i drugom glavnom komponentom. Bojama su označeni anatomski segment (gore: duodenum i ileum), tretman (sredina: bazalna kontrola u usporedbi s tretmanom D-galaktozom) i vrijeme od izlaganja otopini D-galaktoze (dolje: bazalne vrijednosti u usporedbi s 30, 60, ili 120 min nakon tretmana); C) Biplot dijagram doprinosa varijabli prvim dvjema glavnim komponentama. Doprinos je naznačen projekcijom vektora na pojedinu os te bojom. NRP – redoks permanganometrija na nitrocelulozi; time – vrijeme od izlaganja D-galaktozi (kontinuirana varijabla izražena u minutama); THB\_KCN – indikator aktivnosti Mn/Fe-SOD; GSH – glutation; MDA – malondialdehid; NADP – indikator ukupne aktivnosti SOD; CAT – aktivnost katalaze; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>\_BASELINE – koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, SH – slobodne sulfhidrilne skupine; NADPH – reducirani nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfat; NADPH/nadp – omjer koncentracija NADPH i NADP.

Jedna od hipoteza mehanizma blagotvornih učinaka D-galaktoze u štakorskom modelu sAB-a je djelovanje na enteroendokrine stanice te poticanje lučenja inkretina (330,497,537,612). Kako bi se dodatno istražio lokalni učinak D-galaktoze pomoću imunofluorescencije je ispitan izražaj fosforilirane frakcije kinaza kontroliranih izvanstaničnim signalima (pERK; *engl. phosphorylated extracellular signal-regulated kinases*). Analiza izražaja pERK-a ukazala je na znatan porast signala u duodenumu nakon tretmana oralnom D-galaktozom i to poglavito u stanicama koje oblikom odgovaraju enteroendokrinim stanicama (Slika 38). Uz enteroendokrine stanice uočen je pojačani izražaj pERK signala u vlaknima živčanih

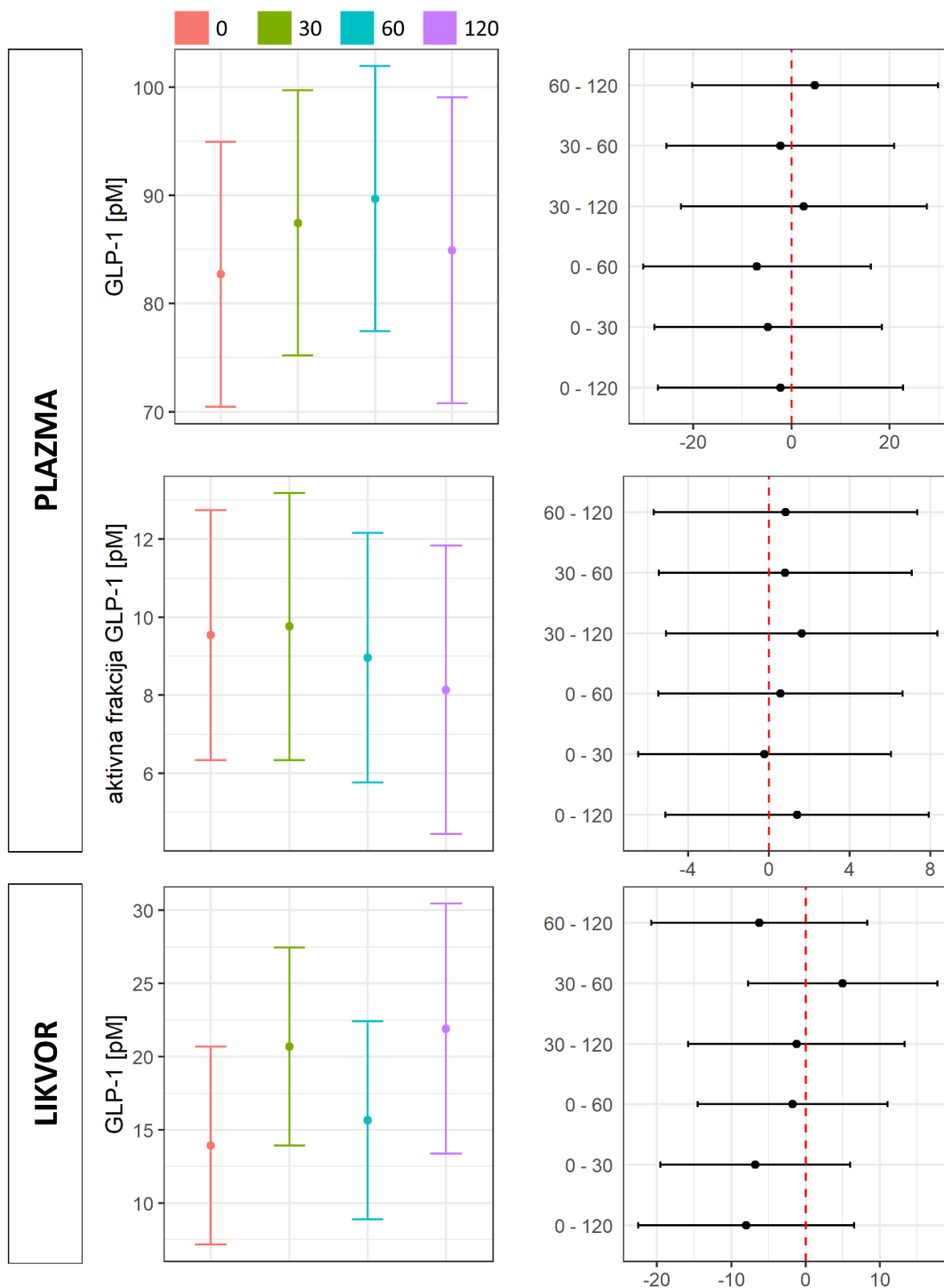


završetaka što bi, s obzirom da se pERK koristi kao biljeg neuronalne aktivacije (616,617), moglo ukazivati na aktivaciju sinapsi između enteroendokrinih stanica i neurona vagusa (618) – jedan od mogućih mehanizama blagotvornog djelovanja D-galaktoze (554).



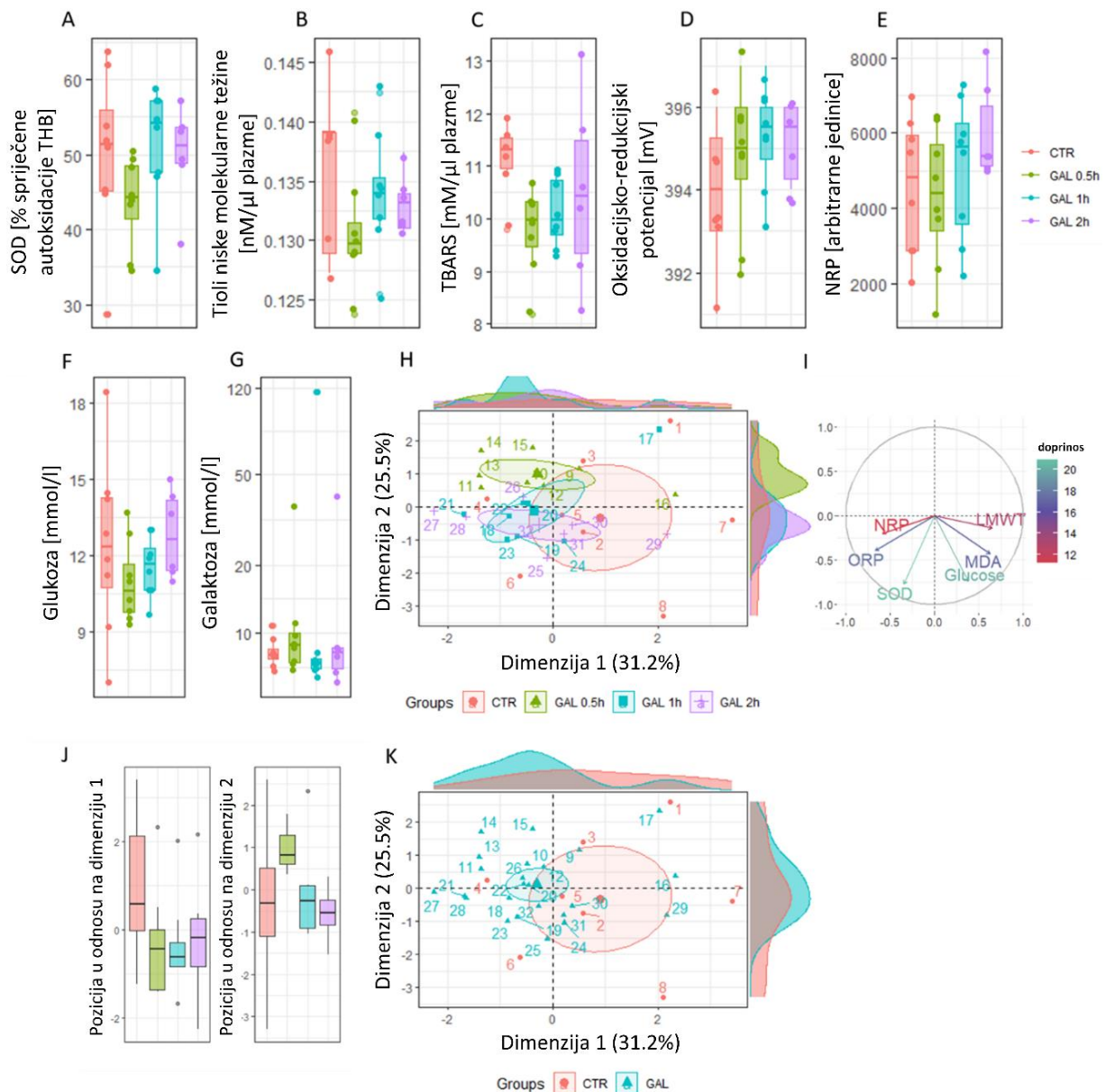
**Slika 38. Imunofluorescencijska analiza fosforilirane frakcije obitelji protein kinaza koje su regulirane izvanstaničnim signalom (pERK) u duodenumu štakora nakon akutnog oralnog tretmana D-galaktozom.** Gornji red: Prikaz širokog polja - izražaj pERK bazalno te nakon 30, 60, i 120 min nakon dostave otopine D-galaktoze putem orogastrične sonde. Donji red: Uvećani prikaz stanica s pERK pozitivnim izražajem u crijevnim resicama duodenuma 30 min nakon tretmana D-galaktozom. Signal je najizraženiji u stanicama koje morfološki nalikuju na enteroendokrine stanice te u vlaknima koja nalikuju na živčana vlakna koja stvaraju sinapse s enteroendokrinim stanicama.

U plazmi i cerebrospinalnom likvoru izmjerena je koncentracija GLP-a 1 te njegovog aktivnog fragmenta (Slika 39). S obzirom na prijašnje rezultate (537) i poznati kratki cirkulacijski poluvijek (619), ustanovljeno je da se akutno uvećana koncentracija GLP-a 1 u plazmi tijekom 30 min nakon davanja otopine D-galaktoze putem orogastrične sonde vraća na bazalne vrijednosti (u opisanom pokusu nisu uočena znatna odstupanja u vrijednostima ukupnog i aktivnog GLP-a 1)(Slika 39). Koncentracija GLP-a 1 u likvoru tijekom 120 min od davanja D-galaktoze nelinearno je porasla ~50%, međutim, među životinjama je uočena znatna varijabilnost odgovora te su procjene bile popraćene širokim intervalima pouzdanosti (Slika 39). Na temelju opaženih rezultata zaključeno je da, ukoliko su opažene promjene posredovane učincima GLP-a 1, to su isključivo odgođeni učinci signalizacije GLP-1R-a, a ne posljedice produljene izloženosti inkretinima.



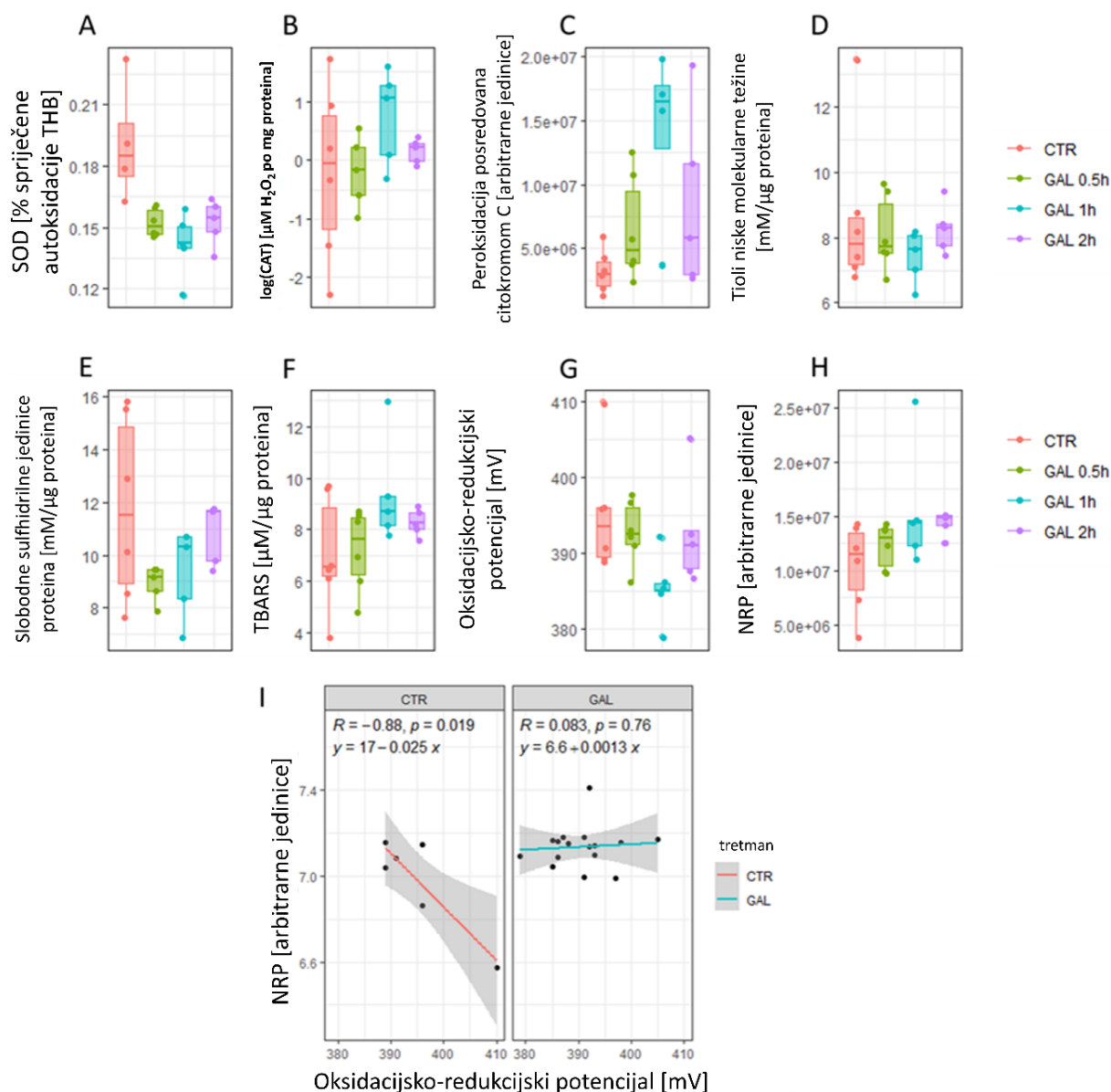
**Slika 39. Koncentracija peptida-1 sličnog glukagonu (GLP-1) u plazmi i likvoru štakora nakon akutnog oralnog tretmana D-galaktozom.** Gore: Procjene izvedene iz linearnog modela koji odražava koncentraciju GLP-1 i aktivnog fragmenta GLP-1 u plazmi (lijevo) te kontrasti tretmana koji prikazuju veličinu učinka (desno). Uz procjene srednjih vrijednosti prikazani su 95% intervali pouzdanosti; Dolje: Procjene izvedene iz linearnog modela koji odražava koncentraciju GLP-1 u cerebrospinalnom likvoru (lijevo) te kontrasti tretmana koji prikazuju veličinu učinka (desno). Uz procjene srednjih vrijednosti prikazani su 95% intervali pouzdanosti.

Promjene redoks homeostaze nakon akutnog oralnog tretmana D-galaktozom potom su ispitane u plazmi kako bi se dobio uvid u sustavnu redoks homeostazu. Akutni tretman oralnom D-galaktozom (200 mg/kg u bolusu) nije uzrokovao promjene koje bi ukazivale na povećanje oksidativnog stresa (Slika 40). Akutno je neznatno snižena aktivnost SOD-a (Slika 40A) dok kod koncentracije niskomolekularnih tiola, ORP-a i NRP-a nije bilo očitog odgovora na D-galaktozu (Slika 40B,D,E). Zanimljivo, najdosljednija promjena u plazmi bilo je smanjenje koncentracije proizvoda lipidne peroksidacije (TBARS-a) (Slika 40C). Na temelju mjerenja koncentracije glukoze i galaktoze (Slika 40F,G)(koje su ukazale na neznatno sniženje koncentracije glukoze te povezano s neznatnim povećanjem koncentracije D-galaktoze u prvoj vremenskoj točki, 30 min nakon davanja), u kontekstu ranijih podataka iz literature (akutna oralna primjena 200 mg/kg otopine D-galaktoze povećava galaktozu u plazmi prosječno za 111% 15 min nakon tretmana)(537), zaključeno je da je u prvoj mjernoj točki u navedenom eksperimentu (nakon 30 min) većina D-galaktoze već bila raspoređena u tkivo. Analizom glavnih komponenti zaključeno je da prva komponenta (koja objašnjava 31,2% varijance) opisuje učinak tretmana D-galaktozom (najveći doprinos imale su varijable MDA, ORP, te glukoza), dok je pomoću druge komponente (25,5% varijance) primarno razdvaja subakutni učinak tretmana (30 min) od odgođenog učinka i bazalnih vrijednosti (Slika 40H-K)(561).



**Slika 40. Biljezi redoks homeostaze u plazmi štakora nakon akutnog oralnog tretmana D-galaktozom.** A) Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD)(spriječena potpuna autoksidacija 1,2,3-trihidroksibenzena); B) Vrijednosti tiola niske molekularne mase; C) Koncentracija tvari reaktivnih s tiobarbiturnom kiselinom (TBARS); D) Oksidacijsko-redukcijski potencijal; E) Ukupni reduktivni kapacitet izmjeren pomoću redoks permanganometrije na nitrocelulozi (NRP); F) Glukoza; G) D-galaktoza. Biplot dijagram izveden iz analize glavnih komponenti biljega redoks homeostaze u plazmi s položajem životinja (H) i varijabli (I); J) Usporedba skupina životinja na temelju položaja u prostoru u odnosu na prvu i drugu glavnu komponentu; K) Biplot dijagram izveden iz analize glavnih komponenti biljega redoks homeostaze u kontekstu tretmana D-galaktozom. Osjenčani prostor predstavlja elipse 95% pouzdanosti oko središta mase skupina. NRP—ukupni reduktivni kapacitet izmjeren redoks permangenometrijom na nitrocelulozi; ORP – oksidacijsko-redukcijski potencijal; LMWT – koncentracija niskomolekularnih tiola; SOD – ukupni kapacitet superoksid-dismutaza; MDA – malondialdehid (indikator koncentracije spojeva reaktivnih s tiobarbiturnom kiselinom); Glucose – koncentracija glukoze u plazmi.

Tijekom analize redoks homeostaze hipokampusa uočen je drugačiji obrazac učinka D-galaktoze, vjerojatno jer je mozak, uz jetru, glavno mjesto nakupljanja i metaboliziranja galaktoze (498). U hipokampusu, tretman D-galaktozom uzrokovao je pad aktivnosti SOD-a (Slika 41A) te blagi porast ukupne peroksidacije (poglavito u vremenskoj točki nakon 60 min)(Slika 41B), a naglašeni porast peroksidacije posredovane citokromskim kompleksom (Slika 41C). Koncentracija niskomolekularnih tiola nije bila izmijenjena (Slika 41D), a kod analize sulfhidrilnih skupina proteina uočen je visok rasap u kontrolnoj skupini (bazalne vrijednosti) što je otežalo interpretaciju, međutim, opažen je porast vrijednosti od 30 do 120 min (Slika 41E). Koncentracija proizvoda peroksidacije lipida pokazala je trend rasta nakon tretmana (Slika 41F). Biljezi ukupnog reduktivnog kapaciteta pokazali su suptilan trend pada (ORP) i rasta (NRP) u vremenu nakon tretmana (Slika 41G,H). Zanimljivo, vrijednosti ORP-a i NRP-a, koje su u fiziološkim uvjetima obrnuto proporcionalne, pokazale su jasnu negativnu korelaciju samo u kontrolnoj skupini (Slika 41I) što govori u prilog hipotezi da tretman D-galaktozom dovodi do selektivnog učinka na neki od medijatora redoks homeostaze na koji je jedan od navedenih pokusa osjetljiviji (npr. NRP pokazuje smanjenu osjetljivost na promjene nekih niskomolekularnih tiola zbog slabog vezanja za nitroceluloznu membranu)(561).

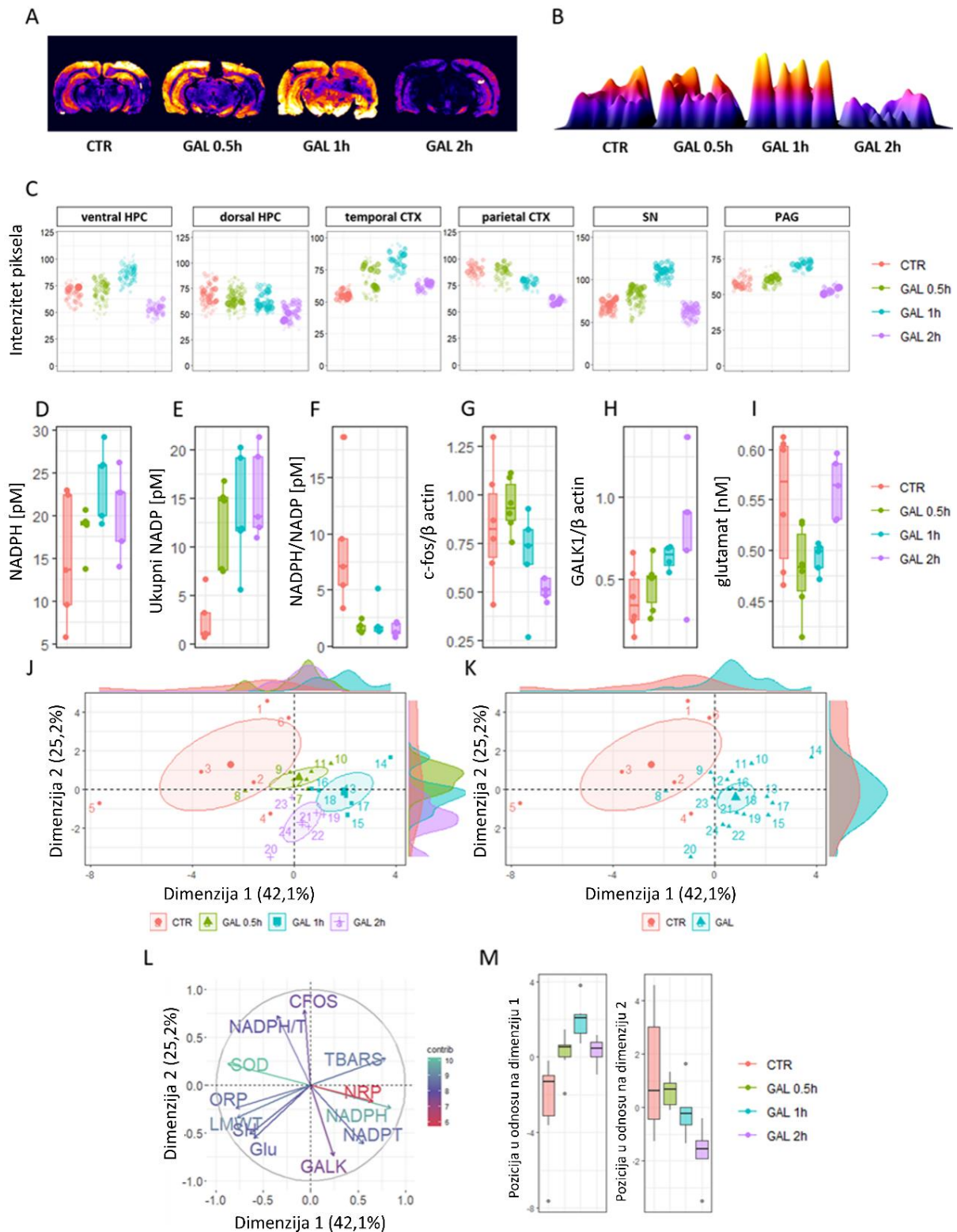


**Slika 41. Biljezi redoks homeostaze u hipokampusu štakora nakon akutnog oralnog tretmana D-galaktozom.** A) Ukupni kapacitet superoksid dismutaza (SOD); B) Kapacitet disocijacije  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; C) Aktivnost peroksidaza kompleksa citokroma (citokrom c); D) Koncentracija tiola niske molekularne mase (LMWT); E) Slobodne sulfhidrilne skupine; F) Lipidna peroksidacija; G) Oksidacijsko-redukcijski potencijal (ORP); H) Ukupni reduktivni potencijal izmjeren redoks permanganometrijom na nitrocelulozi (NRP); I) Linearna regresija NRP i ORP u tretiranih i netretiranih životinja. CTR – kontrolne životinje (bazalne vrijednosti); GAL – životinje oralno tretirane D-galaktozom.

Tkivo je dalje analizirano pomoću HistoNRP metode kojom su opažene prostorno-vremenske promjene reduktivnog kapaciteta uzrokovane akutnim oralnim tretmanom D-galaktozom (Slika 42A-C). Analizom cijelog mozga uočen je porast reduktivnog kapaciteta koji je bio najizraženiji 60 min nakon tretmana (Slika 42A,B). Analiza pojedinih anatomskih regija pokazala je da je opisani učinak ovisan o regiji, pa je tako porast reduktivnog kapaciteta bio izražen u ventralnom hipokampusu dok isti nije zabilježen u dorzalnom hipokampusu (Slika 42C). Osim toga, reduktivni kapacitet je porastao u temporalnoj moždanoj kori, SN-u, te

periakveduktalnoj sivoj tvari, dok je u parijetalnoj moždanoj kori tretman uzrokovao monotoni pad kapaciteta (Slika 42C). Tkivo je potom detaljnije analizirano s ciljem razjašnjavanja mogućih mehanizama koji bi mogli posredovati opažene učinke. Analiza NADPH-a pokazala je da tretman D-galaktozom uzrokuje porast NADPH-a, ali i izraženi porast ukupnog NADP-a (Slika 42D,E) što govori u prilog mogućoj snažnoj disinhibiciji evolucijski očuvanog oksidativnog kraka puta pentoza-fosfata (PPP; *engl. pentose phosphate pathway*) i NADP sustava koji služe kao glavna stanična zaštita od oksidativnog stresa i regulator nukleofilnog tonusa (561). Zbog znatnog povećanja NADP-a omjer NADPH-a i NADP-a bio je snižen što govori u prilog povećanom obrtaju reducirajućih ekvivalenata (Slika 42F). Zanimljivo, analizom izražaja c-fosa (biljega aktivacije neurona), te galaktokinaze-1 (ključnog enzima uskog grla metaboličkih putova D-galaktoze) ustanovljeno je da je tretman D-galaktozom, uz opisane promjene, doveo do pada aktivnosti neurona (monotoni pad izražaja c-fosa od 30 do 120 min Slika 42G) uz povećanje metaboličkog kapaciteta za galaktozu (monotono povećanje izražaja galaktokinaze-1 od 30 do 120 min (Slika 42H)). Koncentracija tkivnog glutamata prolazno je bila snižena nakon tretmana D-galaktozom te je nakon 120 min ponovno postigla bazalne vrijednosti (Slika 42I). Analizom glavnih komponenti promjena biljega redoks homeostaze te promjena NADP(H)-a, c-fosa, galaktokinaze-1 i glutamata objašnjeno je 42,1% (prva glavna komponenta) i 25,2% (druga glavna komponenta) varijance, a navedenom je analizom bilo moguće razdvojiti učinak tretmana galaktozom te pojedine točke u vremenu nakon izlaganja tretmanu (Slika 42J-M)(561).





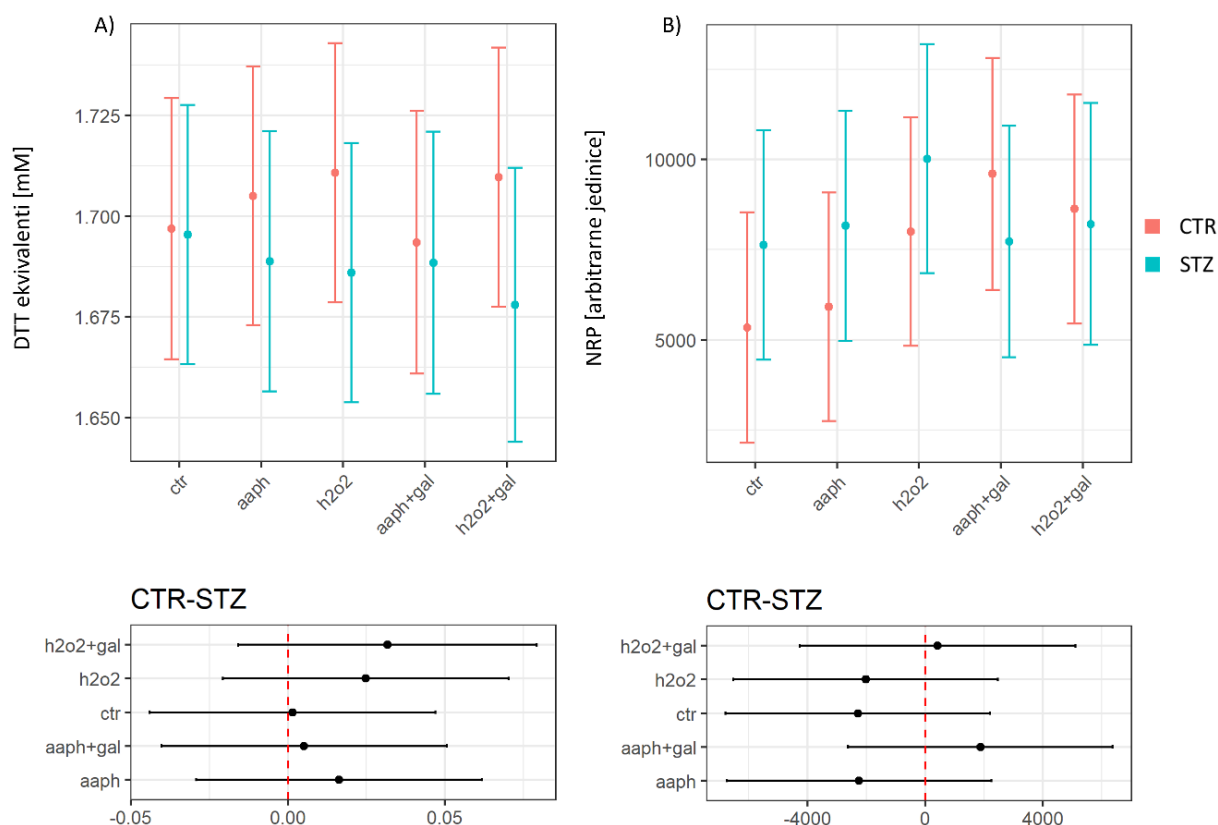
**Slika 42. Prostorno-vremenska analiza redoks homeostaze u mozgu štakora i analiza reduciranog i ukupnog nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfata (NADPH i NADP), c-fos, galaktokinaze i glutamata u hipokampusu nakon akutnog oralnog tretmana D-galaktozom.** A) Prostorna raspodjela reduktivnog kapaciteta izmjerena pomoću HistoNRP metode; B) Prikaz površine ispod prostora intenziteta iz analize prikazane pod (A); C) Analiza reduktivnog potencijala pojedinih regija mozga; D) NADPH u hipokampusu; E) Ukupna koncentracija NADP u hipokampusu; F) Omjer vrijednosti NADPH i NADP u hipokampusu; G) c-fos; H) galaktokinaza-1 (GALK-1); I) Glutamat; J) Biplot dijagram dobiven analizom glavnih komponenti sa skupinama (J) i tretmanom (K) prikazanim u



prostoru u odnosu na prve dvije glavne komponente; L) Biplot dijagram izveden iz analize glavnih komponenti koji prikazuje doprinos pojedinih varijabli u vidu vektora (projekcija vektora na os prikazuje doprinos varijable); M) Odnosi skupina u kontekstu položaja u odnosu na prvu i drugu glavnu komponentu prikazani kutijastim dijagramima. C-FOS – izražaj proteina c-fos u hipokampusu; NADPH/T – omjer reduciranog i ukupnog NADP; TBARS – koncentracija spojeva reaktivnih s tiobarbiturnom kiselinom; SOD – ukupna aktivnost superoksid-dismutaza; NRP – ukupni reduktivni kapacitet izmjeren pomoću redoks permanganometrije na nitrocelulozi; ORP – oksidacijsko-redukcijski potencijal; LMWT – koncentracija niskomolekularnih tiola; SH – koncentracija slobodnih sulfhidrilnih skupina proteina; NADPH – reducirani NADP; NADPT – ukupni NADP; Glu – glutamat; GALK – galaktokinaza-1.

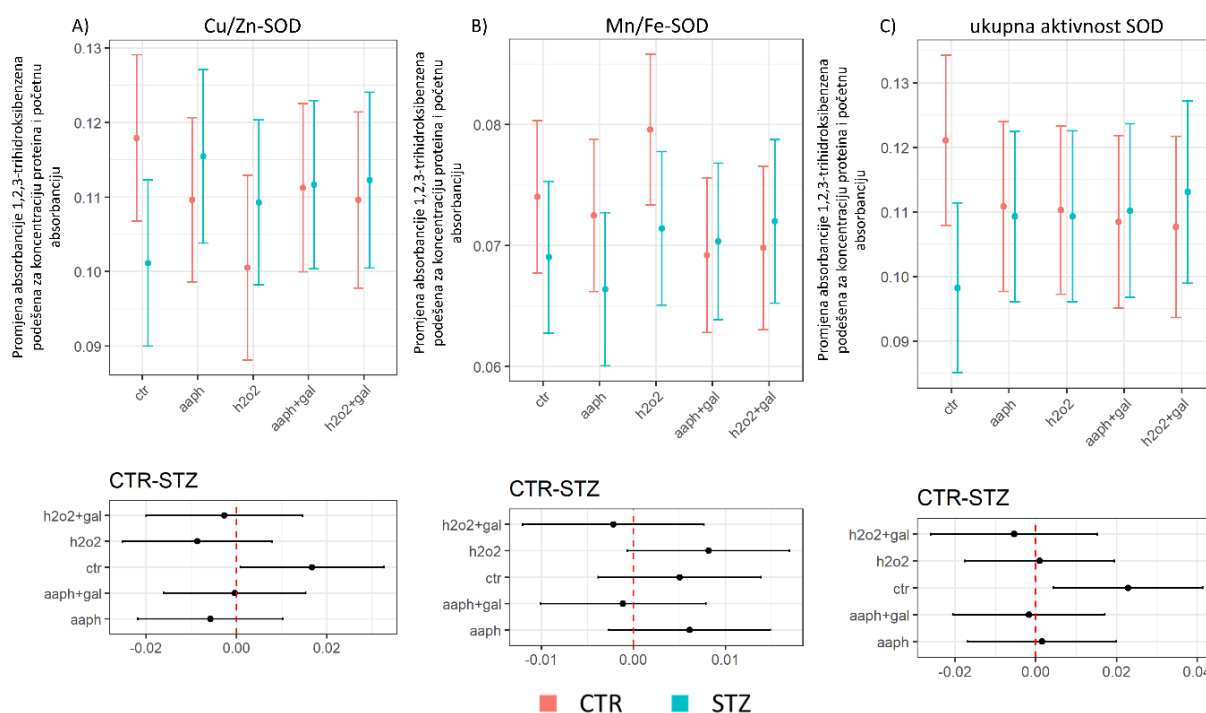
### **5.3.2. Učinci tretmana D-galaktozom na redoks homeostazu u probavnom sustavu štakorskog modela sporadične Alzheimerove bolesti**

Učinak D-galaktoze na redoks homeostazu crijeva mogao bi biti važan mehanizam neuroprotektivnih učinaka kroničnog tretmana oralnom D-galaktozom s obzirom na opisane promjene u probavnom sustavu STZ-icv životinja (534,535) te na opažene blagotvorne učinke D-galaktoze na lokalni redoks sustav u crijevu. Kako bi se bolje razjasnio mehanizam djelovanja D-galaktoze na sastavnice redoks homeostaze proveden je *ex vivo* pokus u kojem su učinci D-galaktoze ispitani tijekom oksidativnog iskušenja inkubacijom uz AAPH i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Slika 4). Ko-inkubacija duodenalnih prstenova u 100 mM D-galaktozi uz 200 μM AAPH uzrokovala je smanjenje reduktivnog kapaciteta mjerenog pomoću ABTS radikal-kation pokusa u kontrolnoj skupini, dok u STZ-icv životinja prisutnost D-galaktoze nije utjecala na reduktivni kapacitet (Slika 43A). Obrnuto, kod oksidativnog iskušenja pomoću H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, u kontrolnoj je skupini uz D-galaktozu uočen blaži pad reduktivnog kapaciteta nego kod STZ-icv (Slika 43A). U kontekstu bazalnih vrijednosti reduktivnog kapaciteta, ko-inkubacija s D-galaktozom uz AAPH dovela je do relativne normalizacije promjena samo u kontrolnoj skupini životinja (Slika 43A). Zanimljivo, prilikom NRP analize, dodatak 100 mM D-galaktoze doveo je do povećanja reduktivnog kapaciteta samo u kontrolnoj skupini uz AAPH, dok je uz H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> učinak u kontrolnoj skupini izostao, a u STZ-icv je uočen blagi pad kapaciteta (Slika 43A). U kontrolnoj skupini svi su tretmani doveli do povećanja NRP-a (posebno uz dodatak D-galaktoze) što bi moglo upućivati na potenciranje kompenzatornih mehanizama, dok u STZ-icv skupini nije bilo izraženih promjena (osim povećanja tijekom tretmana H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bez dodatka D-galaktoze).



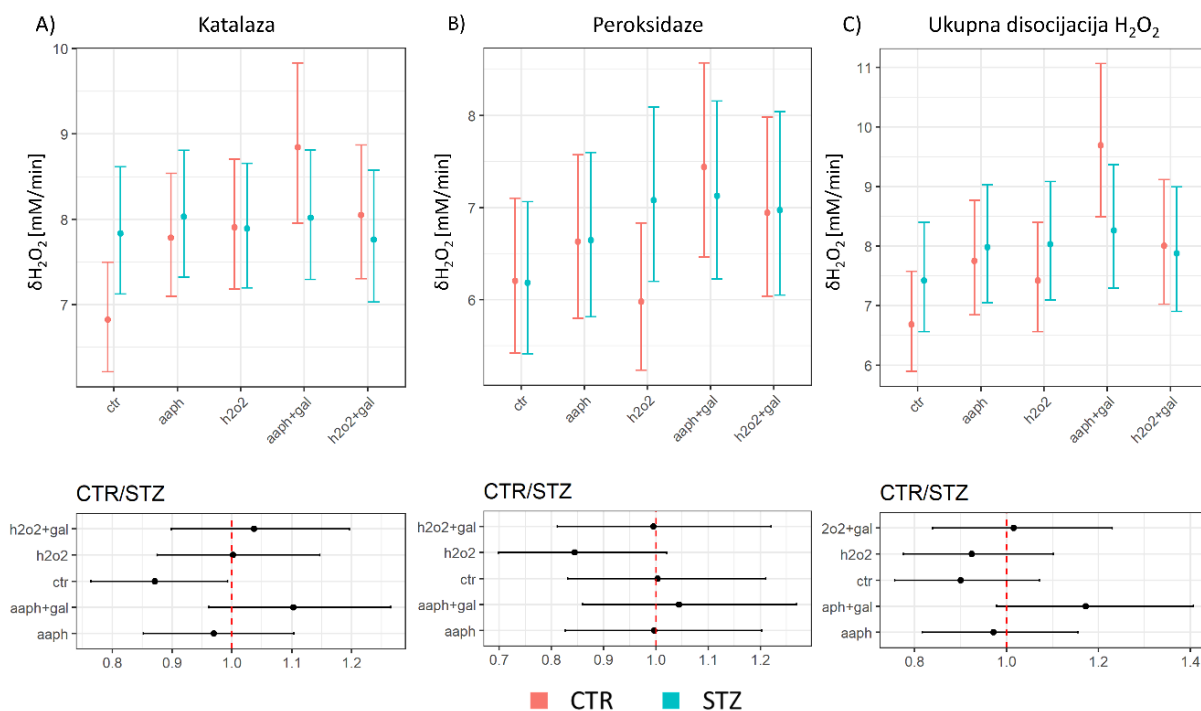
**Slika 43 Ukupni reduktivni kapacitet izmjeren u duodenumu u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti (STZ).** Grafovi prikazuju procjene izvedene iz linearnih mješovitih modela s modeliranom međuovisnosti ponovljenih tretmana s prstenovima iz svake životinje. A) Ukupni reduktivni kapacitet izmjeren pomoću metastabilnog ABTS radikal-kation pokusa izražen u jedinicama ditiotreitola (DTT). Procjene izvedene iz modela (gore) te kontrasti uz 95% intervale pouzdanosti (dolje); B) Ukupni reduktivni kapacitet izmjeren pomoću redoks permanganometrije na nitrocelulozi (NRP). Procjene izvedene iz modela (gore) te kontrasti uz 95% intervale pouzdanosti (dolje). AAPH – 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid.

Analiza aktivnosti frakcija SOD-a pokazala je da u STZ-icv životinja dodatak 100 mM D-galaktoze umanjuje pad aktivnosti Cu/Zn-SOD-a uočen kod inkubacije s AAPH-om dok kod kontrolnih životinja nisu uočene naglašene razlike (Slika 44A). Obrnuto, tijekom inkubacije s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dodatak 100 mM D-galaktoze umanjio je porast aktivnosti u kontrolnoj skupini dok kod STZ-icv nisu uočene naglašene razlike (Slika 44A). Dodatak D-galaktoze prevenirao je blagi porast aktivnosti mitohondrijske frakcije SOD-a koji uzrokuje AAPH u STZ-icv dok je u kontrolnih skupini porast aktivnosti potenciran (Slika 44B). Kod inkubacije s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> prisutnost D-galaktoze nije promijenila blagi pad u STZ-icv skupini dok se u kontrolnoj skupini aktivnost nije smanjila (kao što je uočeno uz inkubaciju s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) već je porasla (Slika 44B). Ukupna aktivnost SOD-a nije bila znatno izmijenjena inkubacijom uz 100 mM D-galaktoze (Slika 44C).



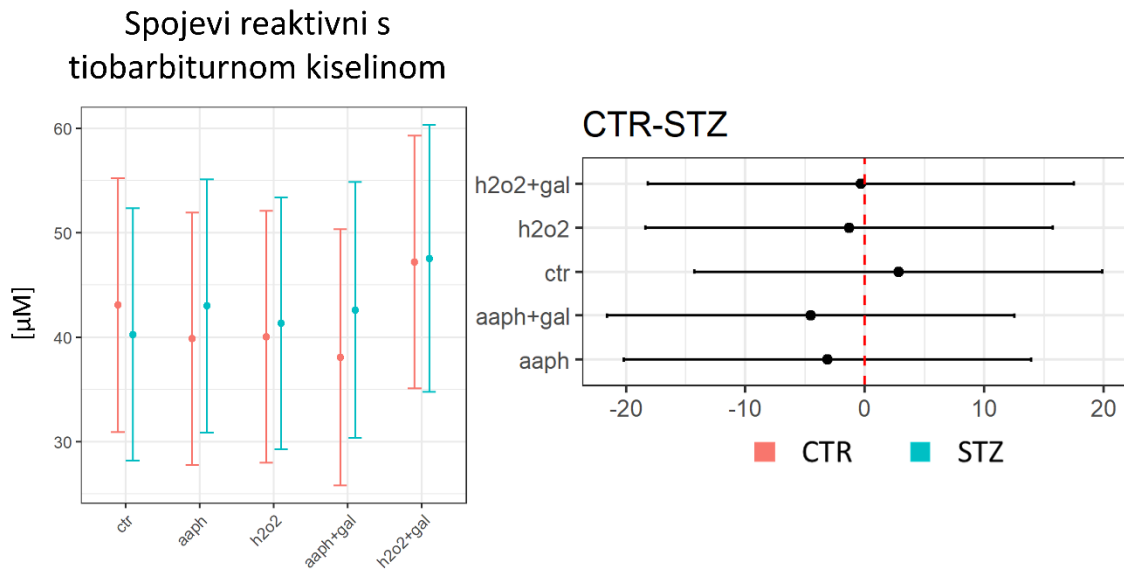
**Slika 44. Aktivnost superoksid dismutaza (SOD) u duodenu u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti (STZ).** Grafovi prikazuju procjene izvedene iz linearnih mješovitih modela s modeliranom međuovisnosti ponovljenih tretmana s prstenovima iz svake životinje. A) Aktivnost citoplazmatske Cu/Zn-SOD. Procjene izvedene iz modela (gore) te kontrasti uz 95% intervale pouzdanosti (dolje); B) Aktivnost mitohondrijske Mn/Fe-SOD. Procjene izvedene iz modela (gore) te kontrasti uz 95% intervale pouzdanosti (dolje); C) Ukupna aktivnost SOD. Procjene izvedene iz modela (gore) te kontrasti uz 95% intervale pouzdanosti (dolje). AAPH – 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid.

Aktivnost drugog glavnog enzimatskog antioksidansa, katalaze/peroksidaze, također nije bila bitno izmijenjena tretmanom D-galaktozom u STZ-icv skupini dok je u kontrolnoj skupini D-galaktoza u prisutnosti AAPH-a uzrokovala dodatno povećanje aktivnosti (Slika 45A). Aktivnost peroksidaza kod tretmana AAPH-om uz D-galaktozu bila je uvećana u obje skupine životinja (Slika 45B). Kod tretmana H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aktivnost peroksidaza ostala je neizmijenjena u STZ-icv životinja, a porasla je u kontroli na način da su obje skupine životinja imale podjednaku aktivnost nakon ko-inkubacije s 1,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i 100 mM D-galaktozom (Slika 45B). Ukupni kapacitet disocijacije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bio je povećan u kontrolnoj skupini kod inkubacije s AAPH-om i D-galaktozom (u usporedbi s inkubacijom samo s AAPH-om), a promjena je izostala u STZ-icv prstenovima (Slika 45C). Ko-inkubacija s D-galaktozom i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dovela je do blagog povećanja u kontrolnoj skupini, a u STZ-icv životinja aktivnost je ostala nepromijenjena (Slika 45C).



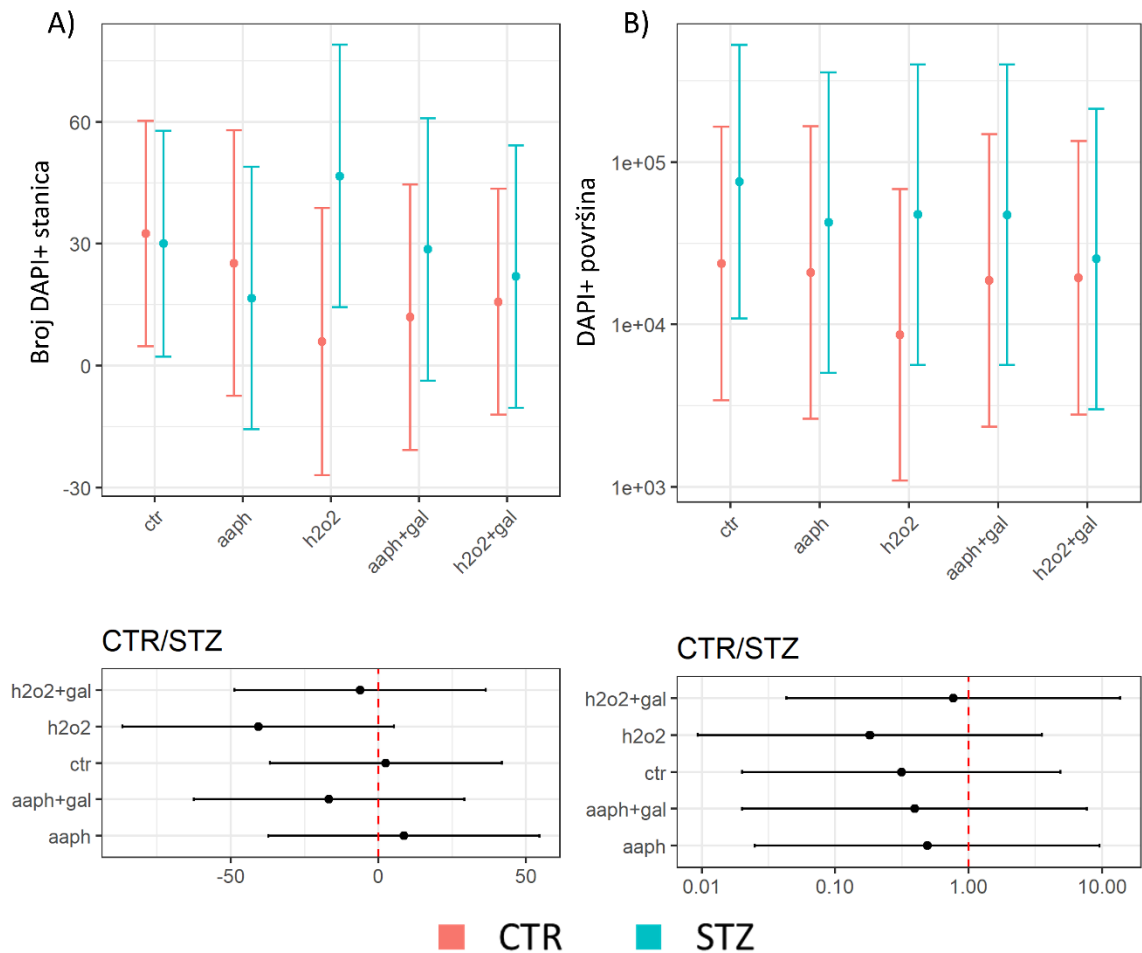
**Slika 45. Aktivnost katalaza i peroksidaza u duodenumu u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti (STZ).** Grafovi prikazuju procjene izvedene iz linearnih mješovitih modela s modeliranom međuovisnosti ponovljenih tretmana s prstenovima iz svake životinje. A) Aktivnost katalaza. Procjene izvedene iz modela (gore) te kontrasti uz 95% intervale pouzdanosti (dolje); B) Aktivnost peroksidaza. Procjene izvedene iz modela (gore) te kontrasti uz 95% intervale pouzdanosti (dolje); C) Ukupni kapacitet disocijacije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (združena aktivnost katalaza i peroksidaza). Procjene izvedene iz modela (gore) te kontrasti uz 95% intervale pouzdanosti (dolje). AAPH – 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid.

Analiza lipidne peroksidacije mjerenjem koncentracije TBARS-a nije ukazala na naglašene promjene između kontrolnih i STZ-icv prstenova (Slika 46). Ko-inkubacija s APPH-om i D-galaktozom nije se znatno razlikovala od inkubacije samo u prisutnosti AAPH-a (Slika 46), a ko-inkubacija s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i D-galaktozom uzorkovala je podjednako povećanje TBARS-a u obje skupine (Slika 46).



**Slika 46. Lipidna peroksidacija u duodenumu u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti (STZ).** Grafovi prikazuju procjene izvedene iz linearnih mješovitih modela s modeliranom međuovisnosti ponovljenih tretmana s prstenovima iz svake životinje. Lipidna peroksidacija procijenjena temeljem kvantifikacije koncentracije spojeva reaktivnih s tiobarbiturnom kiselinom. Procjene izvedene iz modela (lijevo) te kontrasti uz 95% intervale pouzdanosti (desno). AAPH – 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid.

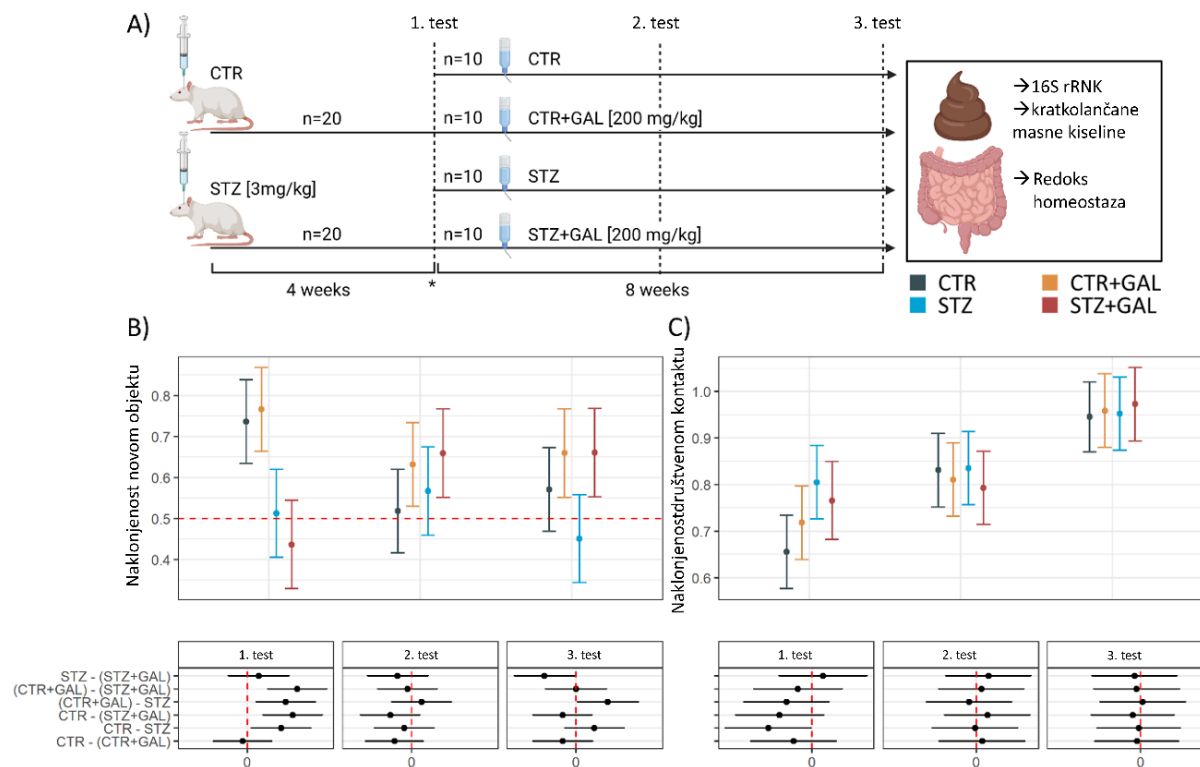
Naposljetku, ispitan je učinak D-galaktoze u kontekstu sprječavanja odumiranja stanica izloženih oksidativnom izazovu. Kod oksidativnog iskušanja izazvanog AAPH-om inkubacija s D-galaktozom smanjila je procijenjeni broj odumrlih stanica u kontrolnoj skupini, međutim u STZ-icv prstenovima prisutnost D-galaktoze imala je obrnuti učinak (Slika 47A). Kod inkubacije s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> D-galaktoza je smanjila izrazito povećanje odumiranja u STZ-icv skupini, dok je u kontroli uočen obrnuti učinak (Slika 47A). Rezultati alternativne metode procjene odumiranja ukazali su na izostanak učinka D-galaktoze kod oksidativnog oštećenja uzrokovanog AAPH-om (Slika 47B), dok je opaženi protektivni učinak D-galaktoze tijekom inkubacije s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u STZ-icv skupini potvrđen (Slika 47B).



**Slika 47. Procjena odumrlih stanica u duodenumu u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti (STZ) pomoću inkubacije s 4',6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI).** Grafovi prikazuju procjene izvedene iz linearnih mješovitih modela s modeliranom međuovisnosti ponovljenih tretmana s prstenovima iz svake životinje. A) Prosječni procijenjeni broj DAPI pozitivnih stanica po vidnom polju; B) Prosječna procijenjena DAPI pozitivna segmentirana površina po vidnom polju. AAPH – 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid.

*Ex vivo* i *in vivo* akutni pokusi pružili su dokaze koji ukazuju da bi D-galaktoza mogla modulirati crijevnu redoks homeostazu i tako ostvariti protektivni učinak u STZ-icv štakorskom modelu sAB-a te je potencijal D-galaktoze ispitan pomoću dugotrajnog *in vivo* pokusa u kojem su kontrolne i STZ-icv životinje bile izložene D-galaktozi tijekom 8 tjedana (s početkom 4 tjedna nakon davanja STZ-a) uz ponavljano ispitivanje objektnog pamćenja pomoću testa prepoznavanja novog objekta (Slika 48A). Prije početka kroničnog oralnog tretmana D-galaktozom (4 tjedna nakon STZ-icv), životinje iz skupine tretirane STZ-icv imale su značajno narušeno objektno pamćenje u usporedbi sa životinjama iz kontrolne skupine (Slika 48B). Tijekom tretmana, životinje su razdvojene u zasebne kaveze kako bi se osiguralo

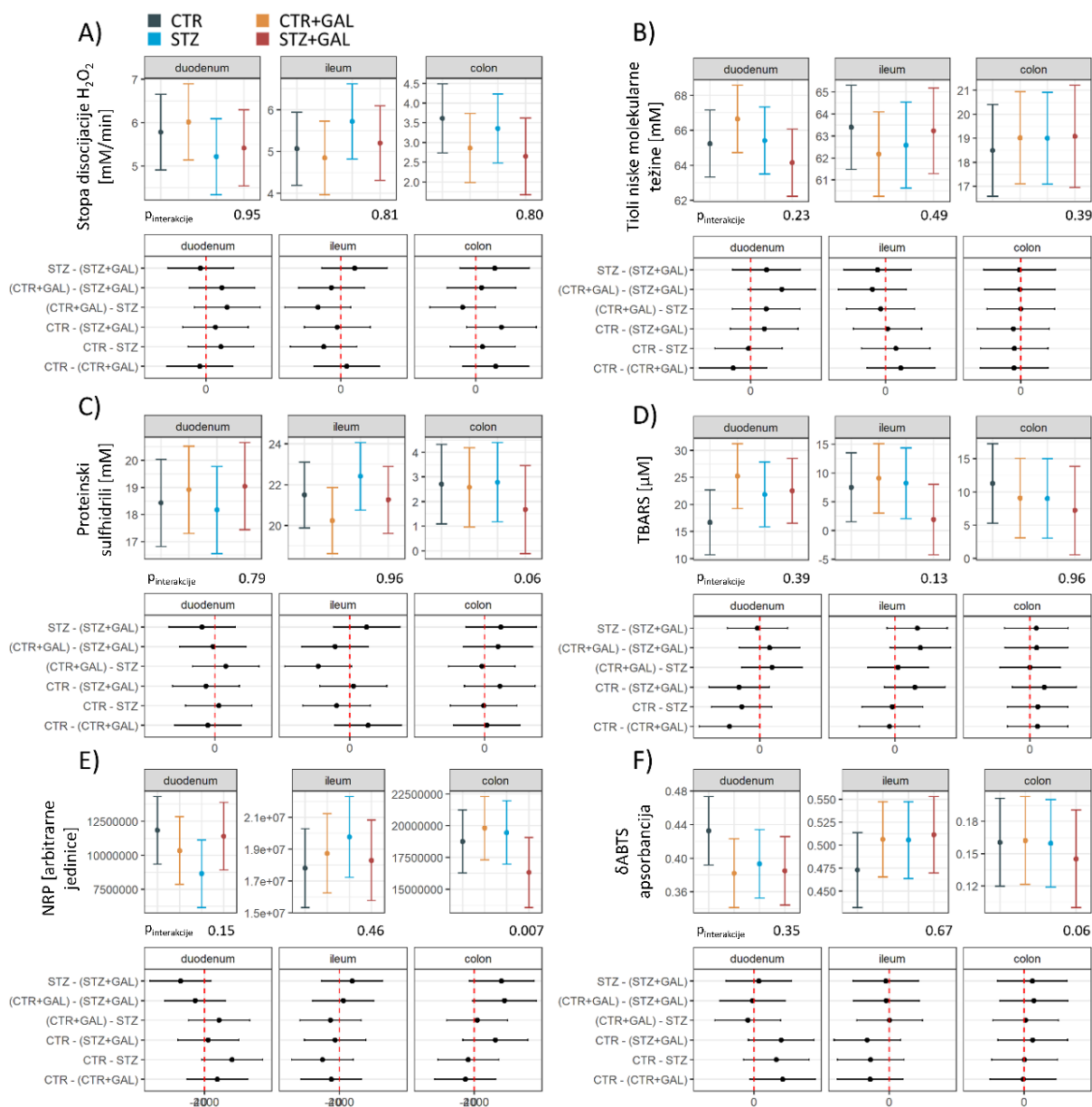
da svaka životinja dobije punu dozu D-galaktoze te da se izbjegne utjecaj heterokoprofagije na crijevnu mikrobiotu. Kontrolne životinje pokazale su oslabljeno objektno pamćenje nakon 4 tjedna društvene izolacije, a tretman D-galaktozom uzrokovao je nešto manji pad objektnog pamćenja u kontrolnoj skupini te oporavak u životinja tretiranih STZ-icv (Slika 48B). Opaženi trend nastavio se do kraja pokusa kad su životinje obje skupine (CTR i STZ-icv) imale bolje objektno pamćenje ukoliko su kroz period društvene izolacije dobivale D-galaktozu (Slika 48B). Kako je očekivano da će izolacija izazvati poremećaj pamćenja u više je vremenskih točaka proveden i test naklonjenosti društvenom kontaktu u kojem je pokazano da izolacija uzrokuje usamljenost i povećava naklonjenost društvenom kontaktu (Slika 48C). Zanimljivo, provedenim je testom opažena i povećana društvenost u STZ-icv skupini u usporedbi s kontrolnim životinjama što bi moglo ukazivati na bihevioralni fenotip koji nalikuje poremećaju s nedostatkom pažnje i hiperaktivnosti (530).



**Slika 48. Učinci intracerebroventrikularnog streptozotocina (STZ) i kroničnog oralnog tretmana D-galaktozom na objektno pamćenje i društvenu interakciju.** A) Eksperimentalni dizajn; B) Procjene i 95% intervali pouzdanosti izvedeni iz linearnog mješovitog modela koji odražava naklonjenost novom objektu (omjer vremena provedenog u istraživanju novog objekta i ukupnog vremena provedenog u istraživanju oba objekta)(gore) te procjene i 95% intervali pouzdanosti kontrasta koji prikazuju veličinu učinka za svako mjerenje (dolje); C) Procjene i 95% intervali pouzdanosti izvedeni iz linearnog mješovitog modela koji odražava naklonjenosti društvenoj interakciji (omjer vremena provedenog u interakciji i ukupnog vremena provedenog u obje zone za društvenu interakciju)(gore) te procjene i 95% intervali pouzdanosti kontrasta koji prikazuju veličinu učinka za svako mjerenje (dolje).

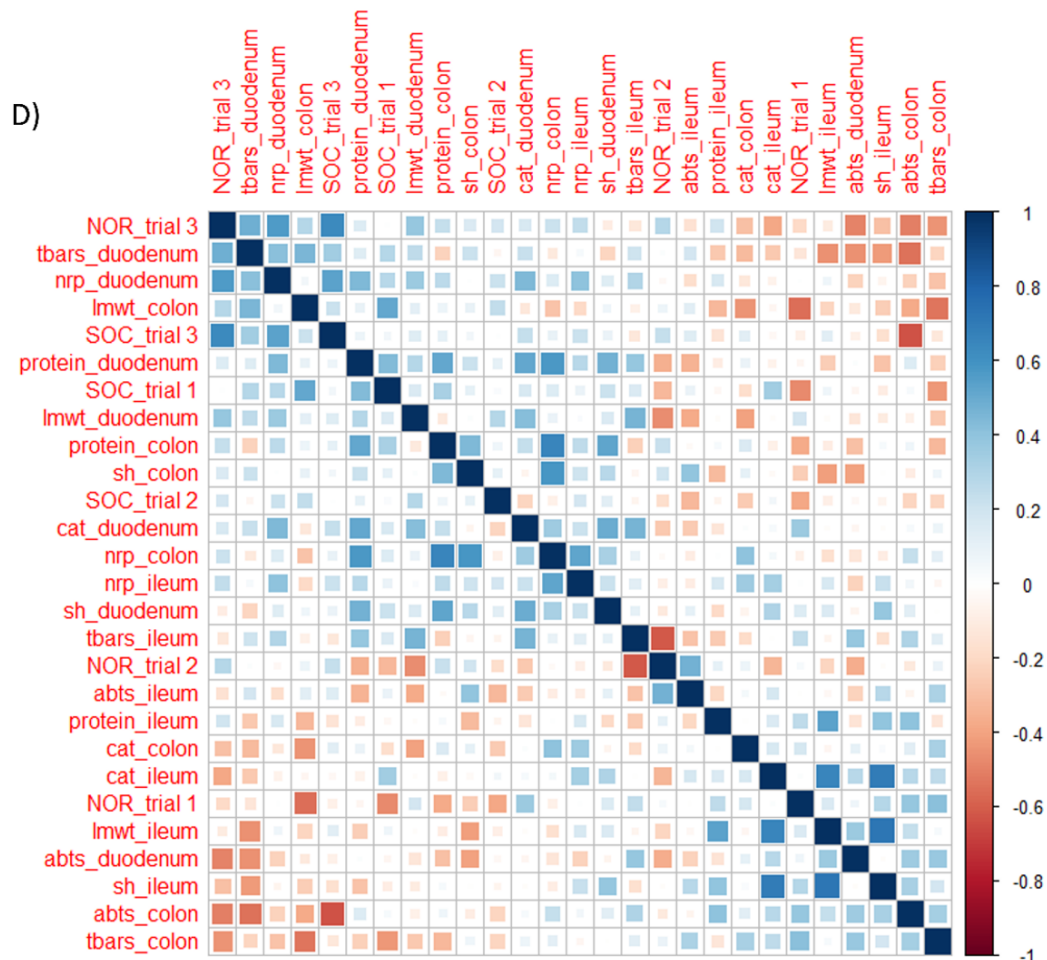
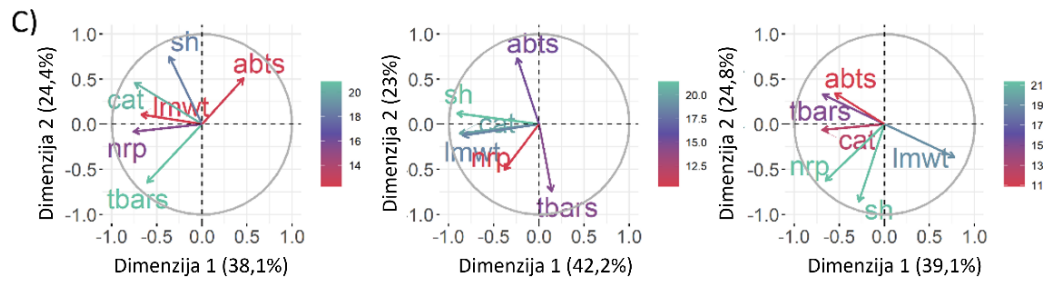
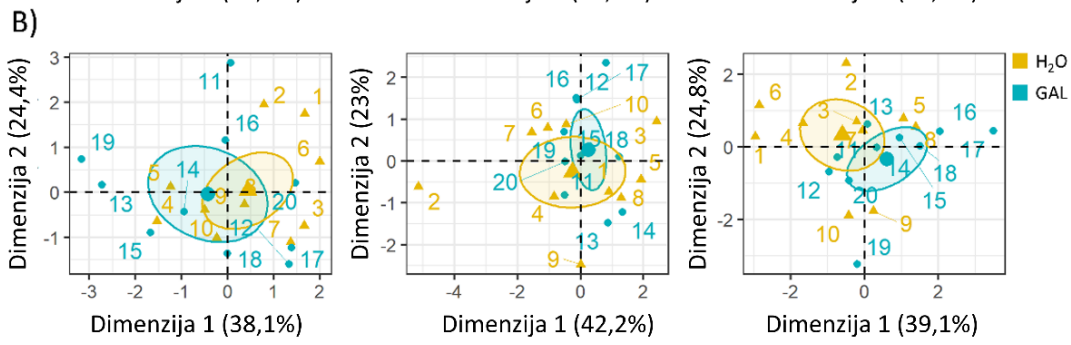
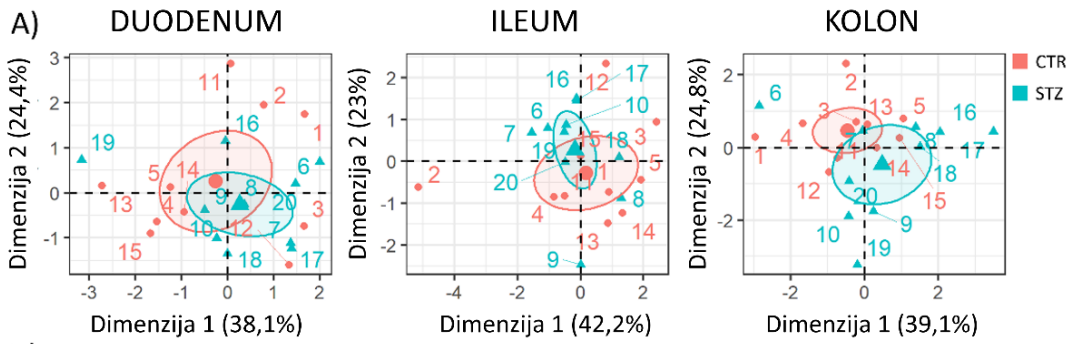
Po završetku *in vivo* pokusa provedeni su biokemijski testovi s ciljem analize biljega redoks homeostaze kako bi se istražila povezanost neuroprotektivnih učinaka D-galaktoze s lokalnim učincima na crijevnu redoks homeostazu (u duodenumu, ileumu, i kolonu). U probavnom sustavu štakorskog modela sAB-a, 8 tjedana nakon STZ-icv tretmana, uočene su skromne promjene redoks homeostaze, a kronični oralni tretman D-galaktozom (200 mg/kg) nije uspio normalizirati navedene promjene što govori u korist odbacivanja hipoteze da bi galaktoza mogla ostvarivati svoj blagotvorni učinak na pamćenje moduliranjem redoks homeostaze u probavnom sustavu (Slika 49). U duodenumu su uočene najizraženije promjene (Slika 49). Iako SH i LMWT nisu bili promijenjeni u STZ-icv u usporedbi s kontrolnom skupinom, oba biljega ukupnog reduktivnog kapaciteta ukazivala su na pad reduktivnog kapaciteta (NRP: -27%;  $\delta$ ABTS: -9%)(Slika 49E,F). U skladu s tim, disocijacija  $H_2O_2$  bila je smanjena za 10% (Slika 49A), a koncentracija TBARS-a povećana za +31% (Slika 49D). Promjene u ileumu nisu pratile promjene u duodenumu: u STZ-icv životinja bili su povećani stupanj disocijacije  $H_2O_2$  (+13%; Slika 49A), NRP (+11%; Slika 49E), te  $\delta$ ABTS (+7%; Slika 49F). U kolonu štakorskog modela sAB-a uočene su minimalne promjene. Kronični oralni tretman D-galaktozom nije normalizirao uočene promjene osim NRP-a u tankom crijevu (duodenum: STZ vs CTR: -27%; STZ+GAL vs CTR: -4%; ileum: STZ vs CTR: +11%; STZ+GAL vs CTR: +3%; Slika 49E). Interakcija STZ-icv i tretmana oralnom D-galaktozom bila je ovisna o biljegu redoks homeostaze te o anatomskom segmentu probavne cijevi. Kod disocijacije  $H_2O_2$  nije bilo naglašene interakcije (Slika 49A). Kvalitativna interakcija LMWT-a bila je manje izražena u kolonu nego u tankom crijevu (Slika 49B). Kod SH-a, interakcija u kolonu je bila kvantitativna, dok je u tankom crijevu izostala (Slika 49C). Lipidna peroksidacija (TBARS) bila je povezana s kvantitativnom (duodenum), kvalitativnom (ileum), ili izostankom interakcije (kolon)(Slika 49D). Ukupni reduktivni kapacitet, izmjeren NRP-om, pokazao je najizraženiju interakciju STZ-icv i D-galaktoze koja je u svim segmentima bila kvalitativna (a najizraženija je bila u tkivu kolona)(Slika 49E). Zanimljivo, biljezi redoks homeostaze koji su pokazali najizraženiju interakciju između STZ-icv i tretmana D-galaktozom (SH, NRP i  $\delta$ ABTS u kolonu) bili su izmijenjeni na način koji je bio sugestivna za potencijalno štetne, a ne zaštitne lokalne učinke D-galaktoze u crijevu što govori protiv hipoteze da bi D-galaktoza mogla ostvarivati blagotvorne učinke djelovanjem u probavnoj cijevi (Slika 49C,E,F).





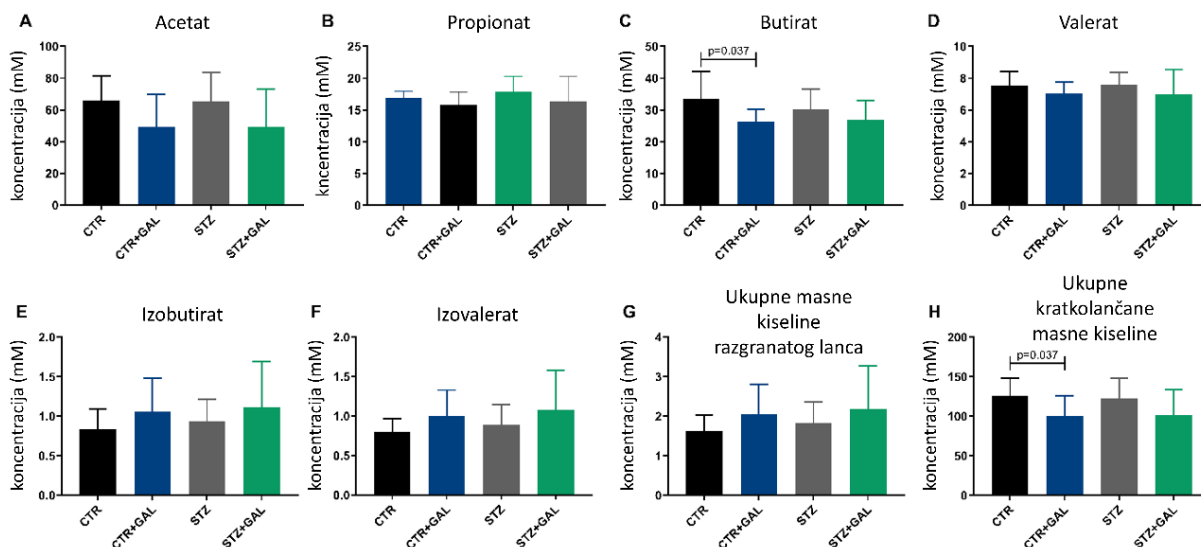
**Slika 49. Biljezi redoks homeostaze u tkivu probavnog sustava u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti (STZ) tretiranog oralnom D-galaktozom.** Prikazane su procjene i 95% intervali pouzdanosti izvedeni iz linearnog mješovitog modela s koncentracijom proteina, skupinom, anatomskim segmentom, te interakcijom segmenta i skupine kao kovarijatama (gore) te procjene i 95% intervali pouzdanosti kontrasta koji prikazuju veličinu učinka za svako mjerenje (dolje). Modeli prikazuju stopu disocijacije  $H_2O_2$  (A), tiole niske molekularne mase (B), slobodne sulfhidrilne skupine proteina (C), spojeve reaktivne s tiobarbiturnom kiselinom (D), ukupni reduktivni kapacitet izmjeren redoks permanganometrijom na nitrocelulozi (E) i metastabilnim 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS) radikal-kationom (F).

Multivarijatna eksploracija pomoću analize glavnih komponenti nije pružila čvrste dokaze o izraženim i dosljednim učincima STZ-icv (Slika 50A,C), niti kroničnog oralnog tretmana D-galaktozom (Slika 50B,D), na biljege redoks homeostaze u probavnom sustavu. Analiza povezanosti između pojedinih biljega i rezultata bihevioralnih testova (test prepoznavanja novog objekta; NOR; engl. *novel object recognition test*) pružila je nedosljedne dokaze o povezanosti crijevne redoks homeostaze i kognitivnih sposobnosti (NOR) – npr. objektno pamćenje testirano u zadnjoj vremenskoj točki bilo je u pozitivnoj korelaciji s antioksidativnim kapacitetom u duodenumu (NRP-om), ali i s koncentracijom TBARS-a (Slika 50D).



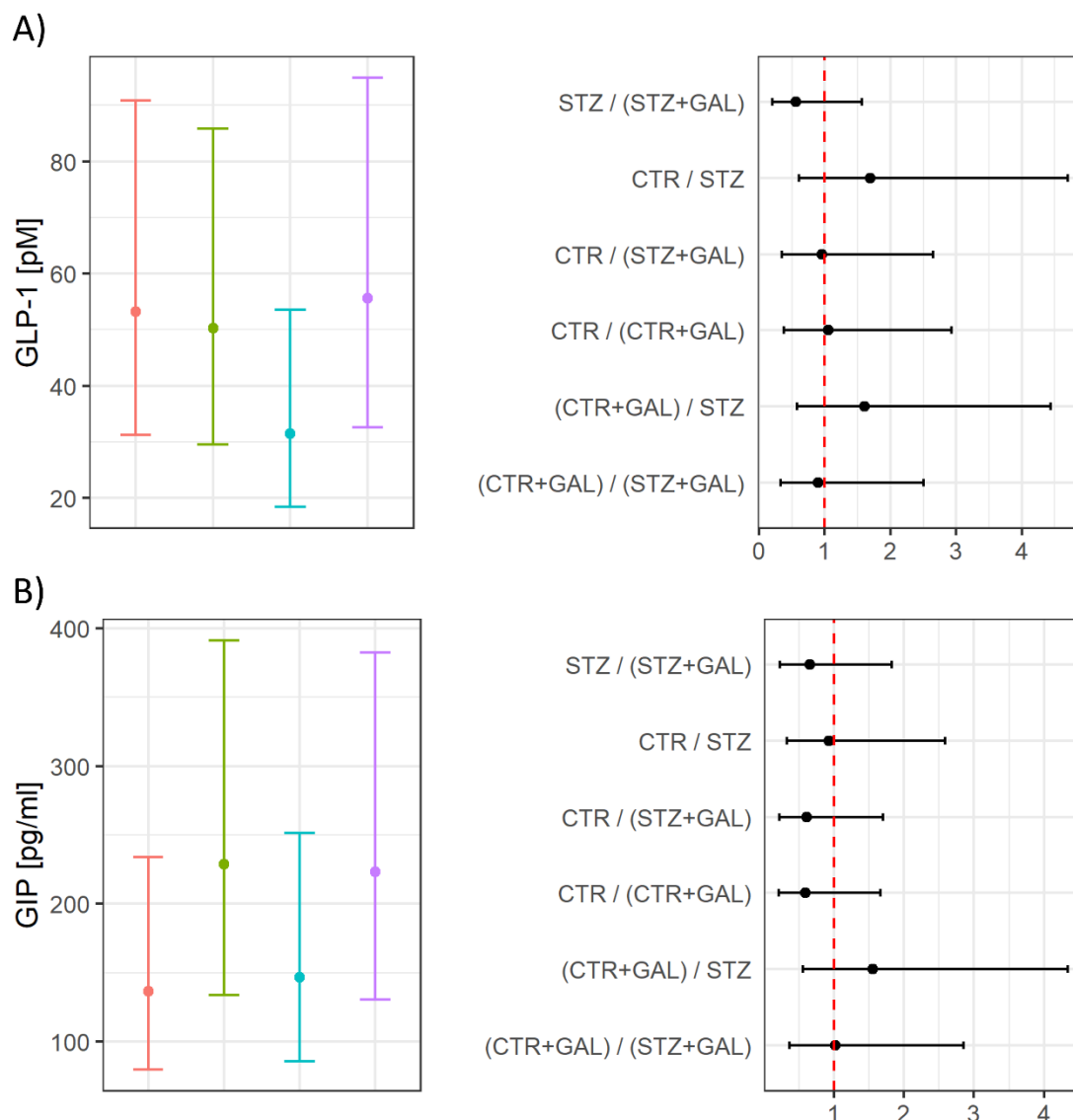
**Slika 50. Multivarijatna analiza biljega redoks homeostaze u tkivu probavnog sustava u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti (STZ) nakon kroničnog tretmana oralnom D-galaktozom.** A) Položaj pojedinih životinja u biplotu prve dvije komponente izdvojene pomoću analize glavnih komponenti za duodenum (lijevo), ileum (sredina), i kolon (desno). Bojom je naznačena pripadnost skupini (tretman streptozotocinom); B) Položaj pojedinih životinja u biplotu prve dvije komponente izdvojene pomoću analize glavnih komponenti za duodenum (lijevo), ileum (sredina), i kolon (desno). Bojom je naznačena pripadnost skupini (tretman D-galaktozom); C) Vektorski prikaz doprinosa pojedinih varijabli u analizi glavnih komponenti prikazan u biplotu prve dvije komponente (doprinos varijable proporcionalan je projekciji na pojedinu komponentu). Prikazan je biplot za duodenum (lijevo), ileum (sredina), i kolon (desno); D) Korelacijska analiza pojedinih biljega redoks homeostaze te izvedbe na testovima objektnog pamćenja i društvene interakcije. NOR – objektno pamćenje izmjereno testom prepoznavanja novog objekta; SOC – test društvene naklonjenosti; ABTS – analiza reduktivnog kapaciteta izmjerena promjenom apsorbancije metastabilnog 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS) radikal-kationa; CAT – kapacitet disocijacije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; LMWT – koncentracija tiola niske molekularne mase; NRP – reduktivni kapacitet izmjerena pomoću redoks permanganometrije na nitrocelulozi; SH – koncentracija slobodnih sulfhidrilnih skupina proteina; TBARS – lipidna peroksidacija izmjerena posredno kvantifikacijom spojeva reaktivnih s tiobarbiturnom kiselinom.

Ispitivanje kratkolančanih masnih kiselina i masnih kiselina razgranatog lanca u cekumu pružilo je dokaze o mogućem djelovanju D-galaktoze putem modulacije komunikacije između crijevne mikrobiote i životinje domaćina čime bi neuroprotektivni učinci mogli biti ostvareni putem osovine crijevo-mozak. Kronični tretman oralnom D-galaktozom smanjio je koncentraciju cekalnih kratkolančanih masnih kiselina acetata, propionata, butirata, i valerata u kontrolnim životinjama te u štakorskom modelu sAB-a (Slika 51A-D). Obrnuto, koncentracija masnih kiselina razgranatog lanca, izobutirata i izovalerata, bila je povećana u uzorcima iz cekuma životinja tretiranih D-galaktozom iz obje skupine (Slika 51E,F). Nisu uočene naglašene interakcije između tretmana STZ-icv i oralnog tretmana D-galaktozom.



**Slika 51. Koncentracija kratkolančanih masnih kiselina i masnih kiselina razgranatog lanca u intraluminalnom sadržaju cekuma u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti (STZ) nakon kroničnog oralnog tretmana D-galaktozom.** A) Koncentracija acetata; B) Koncentracija propionata; C) Koncentracija butirata; D) Koncentracija valerata; E) Koncentracija izobutirata; F) Koncentracija izovalerata; G) Ukupna koncentracija masnih kiselina razgranatog lanca; H) Ukupna koncentracija kratkolančanih masnih kiselina. Podaci su prikazani stupičastim grafikonima sa srednjim vrijednostima uz naznačenu standardnu devijaciju.

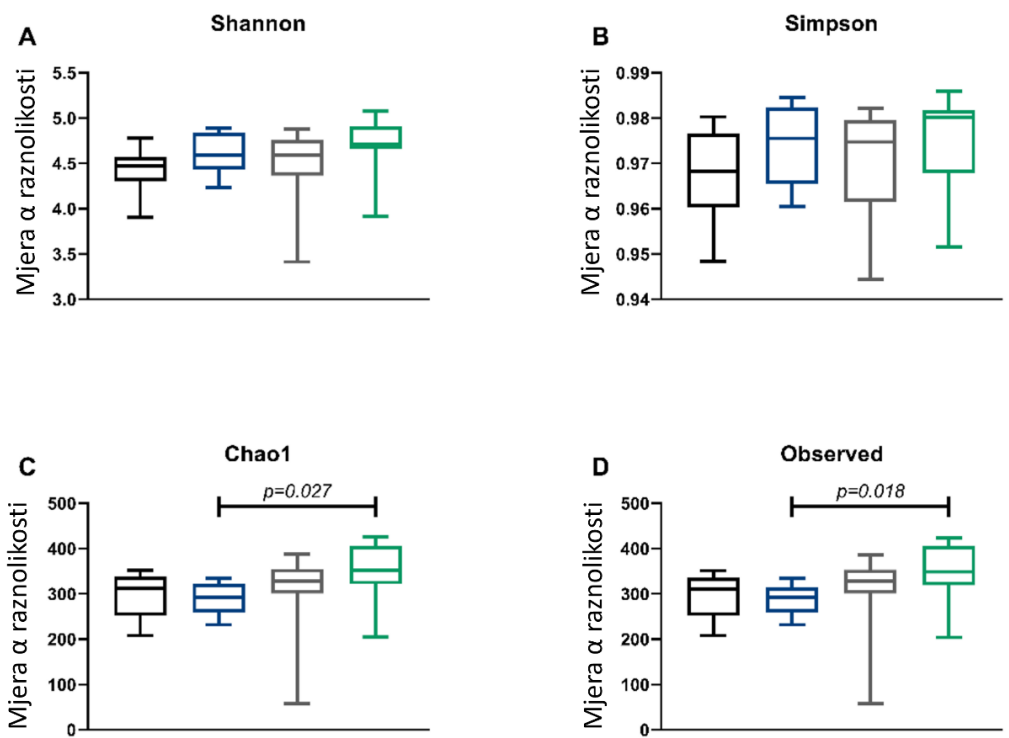
Poticanje lučenja neuroprotektivnih inkretina smatra se jednim od mogućih mehanizama djelovanja oralne D-galaktoze (497,537,612) radi čega je u plazmi izmjerena koncentracija GLP-a 1 i GIP-a. Koncentracija GLP-a 1 bila je snižena u plazmi STZ-icv životinja (-40% u usporedbi s kontrolnom skupinom), a tretman oralnom D-galaktozom doveo je do normalizacije vrijednosti (Slika 52A). Koncentracija GIP-a nije bila snižena u STZ-icv životinja, a tretman D-galaktozom doveo je do znatnog povećanja (~70%) u obje skupine životinja (Slika 52B).



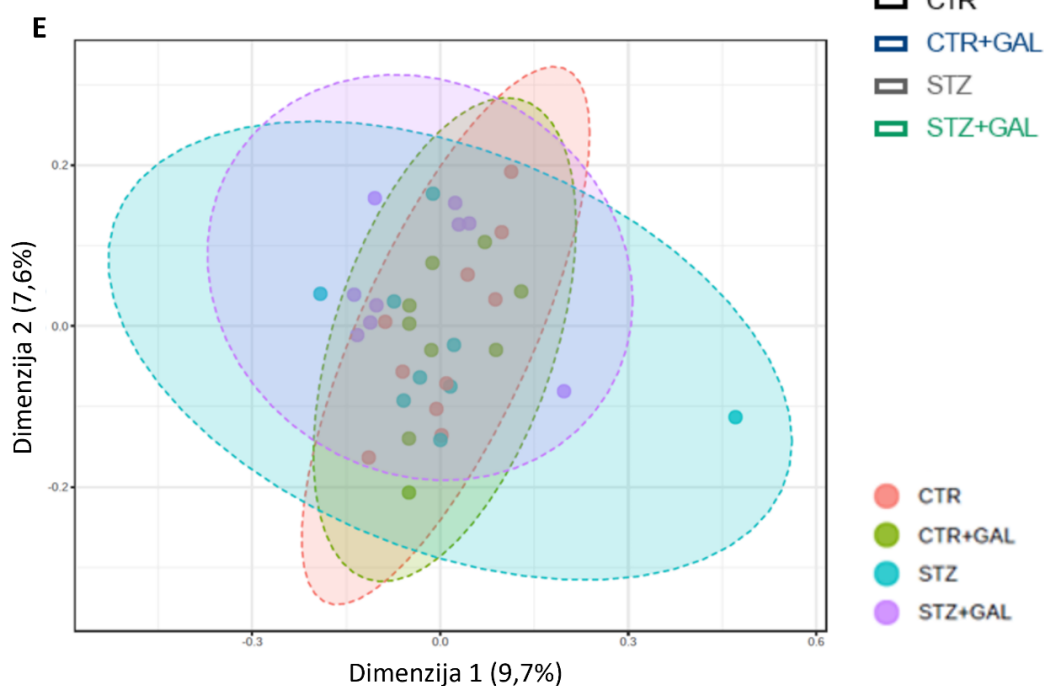
**Slika 52. Analiza koncentracije peptida-1 sličnog glukagonu (GLP-1) i inzulotropnog polipeptida ovisnog o glukozu (GIP) u plazmi u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti (STZ) nakon kroničnog oralnog tretmana D-galaktozom. Procjene i 95% intervali pouzdanosti izvedeni iz linearnog modela koji odražava koncentraciju GLP-1 (A) i GIP (B) u plazmi (lijevo) te procjene i 95% intervali pouzdanosti kontrasta koji prikazuju veličinu učinka (desno).**

### **5.3.2.1. Učinci oralnog tretmana D-galaktozom na crijevnu mikrobiotu u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti**

Blagotvorni učinci kroničnog oralnog tretmana D-galaktozom mogli bi biti posredovani učinkom galaktoze na crijevnu mikrobiotu (620). Analiza crijevne mikrobiote, u uzorcima iz cekuma, pokazala je trend D-galaktoze da poveća  $\alpha$  raznolikost što je potvrđeno s nekoliko različitih indeksa različitosti mikrobiote (Slika 53A-E). S obzirom na male učinke i naglašenu varijabilnost unutar skupina, multivarijatna analiza pomoću analize glavnih koordinata s Brady-Curtis indeksom i permutacijske multivarijatne analize varijance nije ukazala na značajnu različitost između skupina (Slika 53).



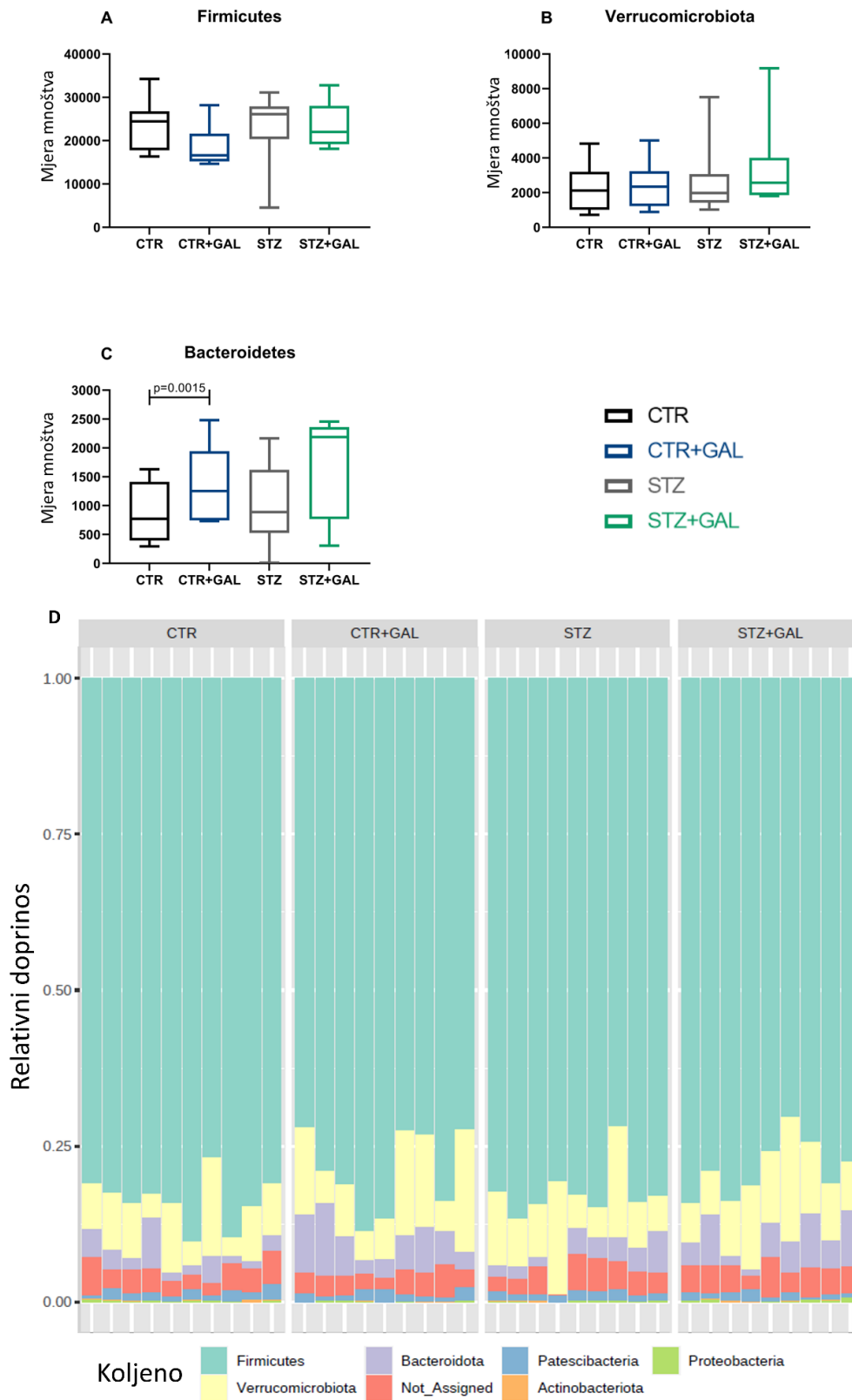
[PERMANOVA] F-vrijednost: 0.91285; R<sup>2</sup>: 0.076628; p-vrijednost=0.715



**Slika 53. Analiza raznolikosti crijevnog mikrobioma u intraluminalnom sadržaju cekuma u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti (STZ) nakon kroničnog oralnog tretmana D-galaktozom.** A) Shannon indeks  $\alpha$  raznolikosti; B) Simpson indeks  $\alpha$  raznolikosti; C) Chao1 indeks  $\alpha$  raznolikosti; D) Observed indeks  $\alpha$  raznolikosti; E) Rezultati permutacijske multivarijatne analize varijance (PERMANOVA) prikazani s obzirom na položaj jedinki u biplotu prve dvije glavne komponente.

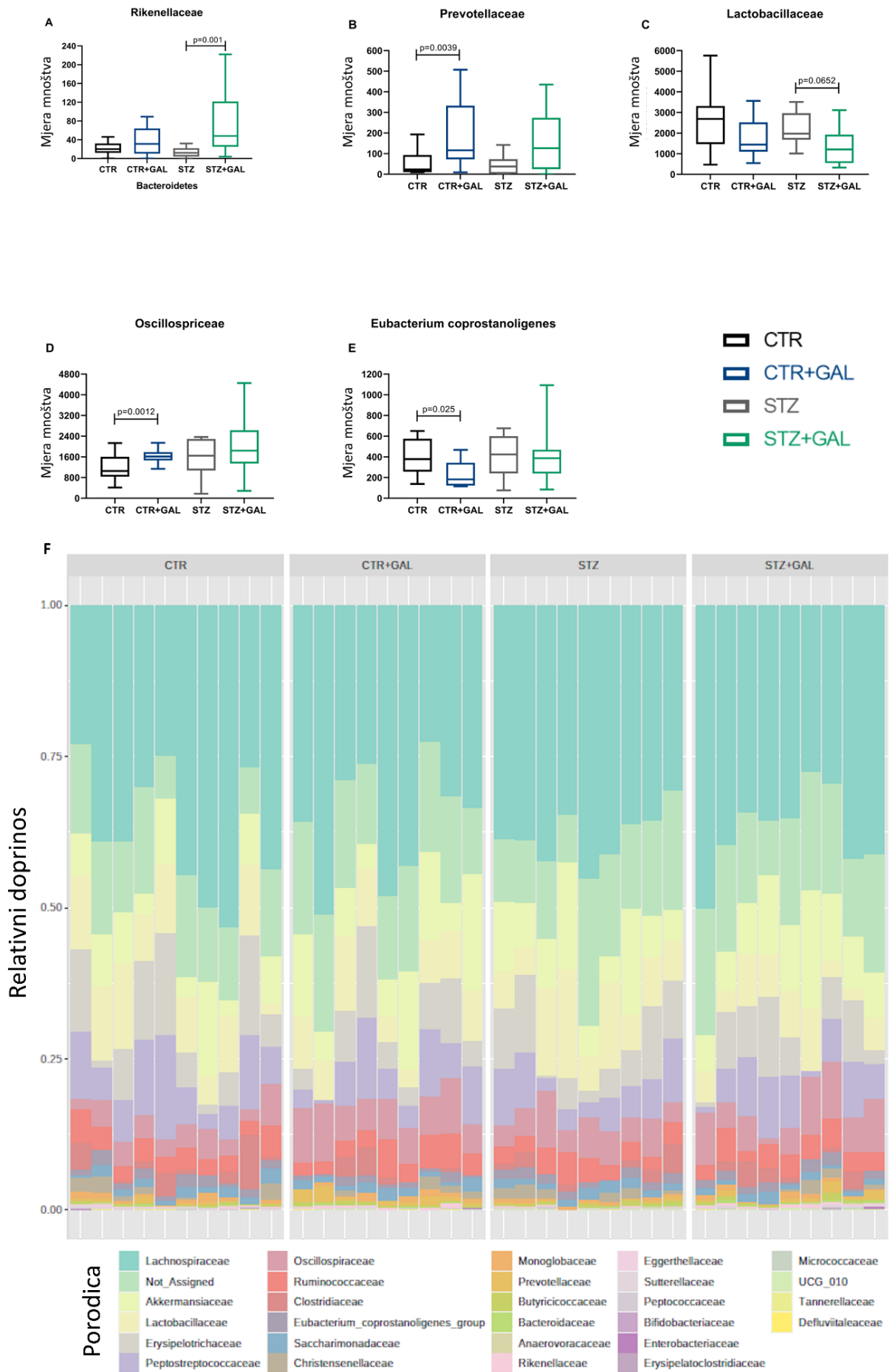


Analiza crijevne mikrobiote pomoću 16S rRNA na razini koljena pokazala je trend smanjenja zastupljenosti koljena *Firmicutes* (Slika 54A) u korist povećanja zastupljenosti koljena *Bacteroidetes* (Slika 54C). U STZ-icv životinja uočen je porast zastupljenosti bakterija iz koljena *Verrucomicrobiota*, ali samo kod pojedinih životinja (Slika 54B). Za ostala koljena relativni je doprinos ostao približno istovjetan (Slika 54D).



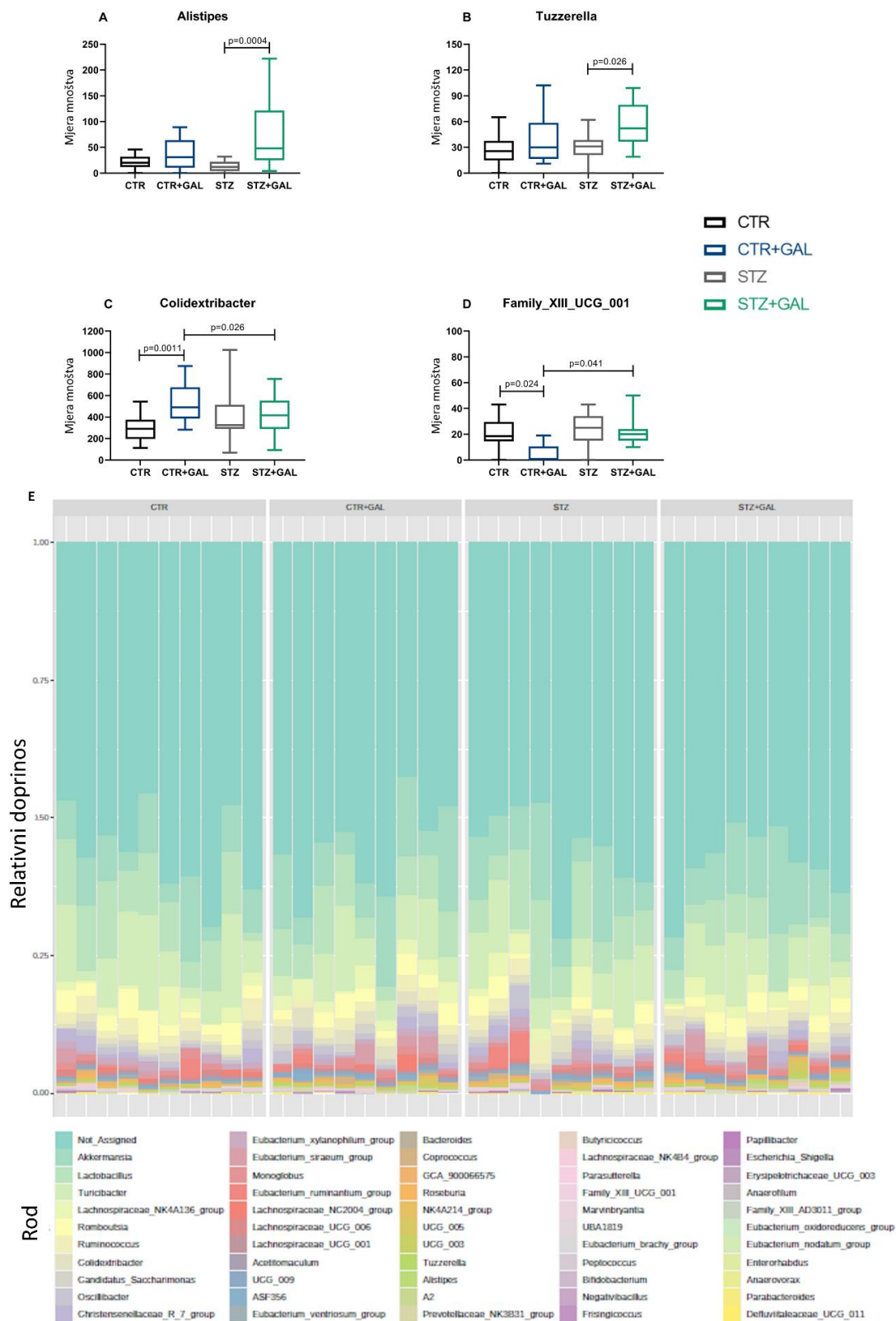
**Slika 54. Analiza crijevnog mikrobioma na razini koljena u intraluminalnom sadržaju cekuma u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti (STZ) nakon kroničnog oralnog tretmana D-galaktozom. A) Mjera mnoštva koljena Firmicutes; B) Mjera mnoštva koljena Verrucomicrobiota; C) Mjera mnoštva koljena Bacteroidetes; D) Relativni doprinos pojedinih koljena crijevne mikrobiote po skupinama.**

Analizom crijevne mikrobiote pomoću 16S rRNA na razini porodice uočeno je povećanje *Rikenellaceae* kod životinja tretiranih D-galaktozom koje je bilo dodatno izraženo u STZ-icv skupini (Slika 55A). U porodici *Prevotellaceae*, uočen je sličan porast kao odgovor na kronični oralni tretman D-galaktozom (Slika 55B). Suprotan obrazac opažen je kod porodice *Lactobacillaceae* čija je prisutnost snižena u skupinama tretiranim D-galaktozom (Slika 55C). Porodica *Oscillospira* obogaćena je tretmanom D-galaktozom, a u štakorskom modelu sAB uočeno je i malo bazalno povećanje prisutnosti bakterija iz ove porodice (Slika 55D). Kronični oralni tretman D-galaktozom smanjio je prisutnost porodice *Eubacterium coprostanoligenes* (Slika 55E). Relativni doprinos svih ostalih ispitanih porodica prikazan je stupičastim grafom relativne zastupljenosti (Slika 55F).



**Slika 55. Analiza crijevnog mikrobioma na razini porodice u intraluminalnom sadržaju cekuma u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti (STZ) nakon kroničnog oralnog tretmana D-galaktozom.** A) Mjera mnoštva porodice Rikenellaceae; B) Mjera mnoštva porodice Prevotellaceae; C) Mjera mnoštva porodice Lactobacillaceae; D) Mjera mnoštva porodice Oscillospiraceae; E) Mjera mnoštva porodice Eubacterium coprostanoligenes; F) Relativni doprinos pojedinih porodica crijevne mikrobiote po skupinama.

Naposljetku, učinak STZ-icv-a te kroničnog oralnog tretmana D-galaktozom ispitan je pomoću 16S rRNA analize crijevne mikrobiote na razini rodova (Slika 56). Tretman D-galaktozom povećao je prisutnost roda *Alistipes* i to posebno u STZ-icv skupini (Slika 56A), a sličan je obrazac uočen i tijekom analize zastupljenosti roda *Tuzarella*, s tim da povećanje prisutnosti u STZ-icv nakon tretmana D-galaktozom nije bilo toliko izraženo (Slika 56B). Tretman D-galaktozom također je povećao prisutnost roda *Colidextribacter*, no tu je razlika bila izraženija u kontrolnoj skupini zbog relativnog rasapa te blago povećane bazalne zastupljenosti u STZ-icv štakorskom modelu sAB-a (Slika 56C). Obrnuto, tretman D-galaktozom smanjio je prisutnost roda „*Family XIII UCG-001*“ i to posebno izraženo u kontrolnih životinja (Slika 56D). Relativni doprinos svih ostalih ispitanih rodova prikazan je stupičastim grafom relativne zastupljenosti (Slika 56E).



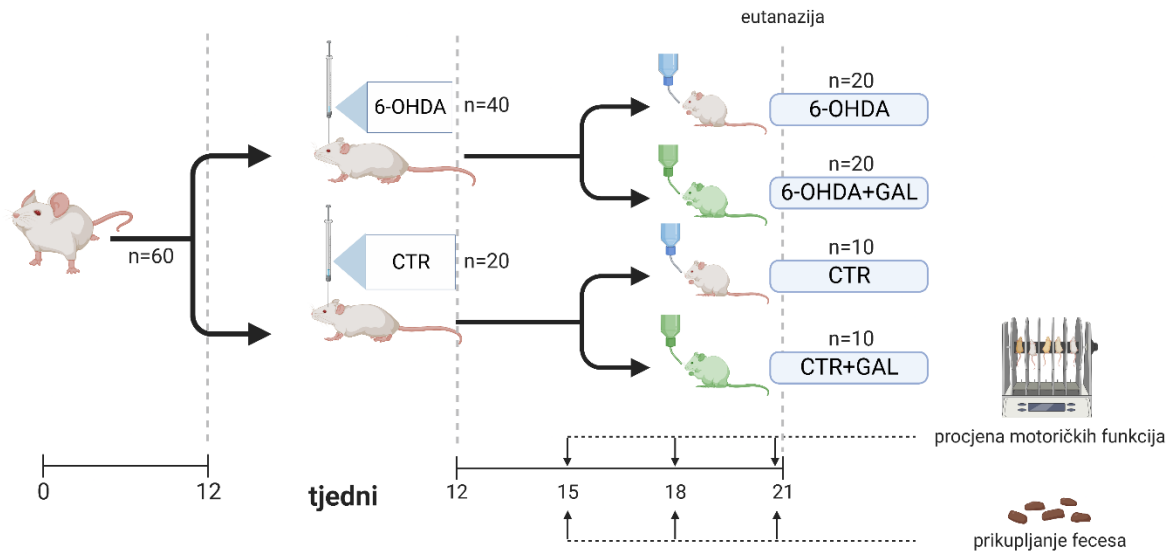
**Slika 56.** Analiza crijevnog mikrobioma na razini roda u intraluminalnom sadržaju cekuma u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti (STZ) nakon kroničnog oralnog tretmana D-galaktozom. A) Mjera mnoštva roda Alistipes; B) Mjera mnoštva roda Tuzzerella; C) Mjera mnoštva roda Colidextribacter; D) Mjera mnoštva roda Family\_XIII\_UCG\_001; E) Relativni doprinos pojedinih rodova crijevne mikrobiote po skupinama.

### **5.3.3. Učinci oralnog tretmana D-galaktozom na probavni sustav štakorskog modela Parkinsonove bolesti**

Iako su prethodna istraživanja pokazala neuroprotektivni potencijal oralnog tretmana D-galaktozom u štakorskom modelu sAB-a (330,497,537,612), učinci D-galaktoze do sad nisu ispitani u životinjskim modelima PB-a. Obzirom da postoji mogućnost da D-galaktoza ostvaruje neuroprotektivne učinke neovisno o modelu neurodegenerativne bolesti, osim učinaka kroničnog oralnog tretmana D-galaktozom na inkretinski sustav i redoks homeostazu (cilj 3) provedena su dodatna ispitivanja učinaka na motoričke deficite.

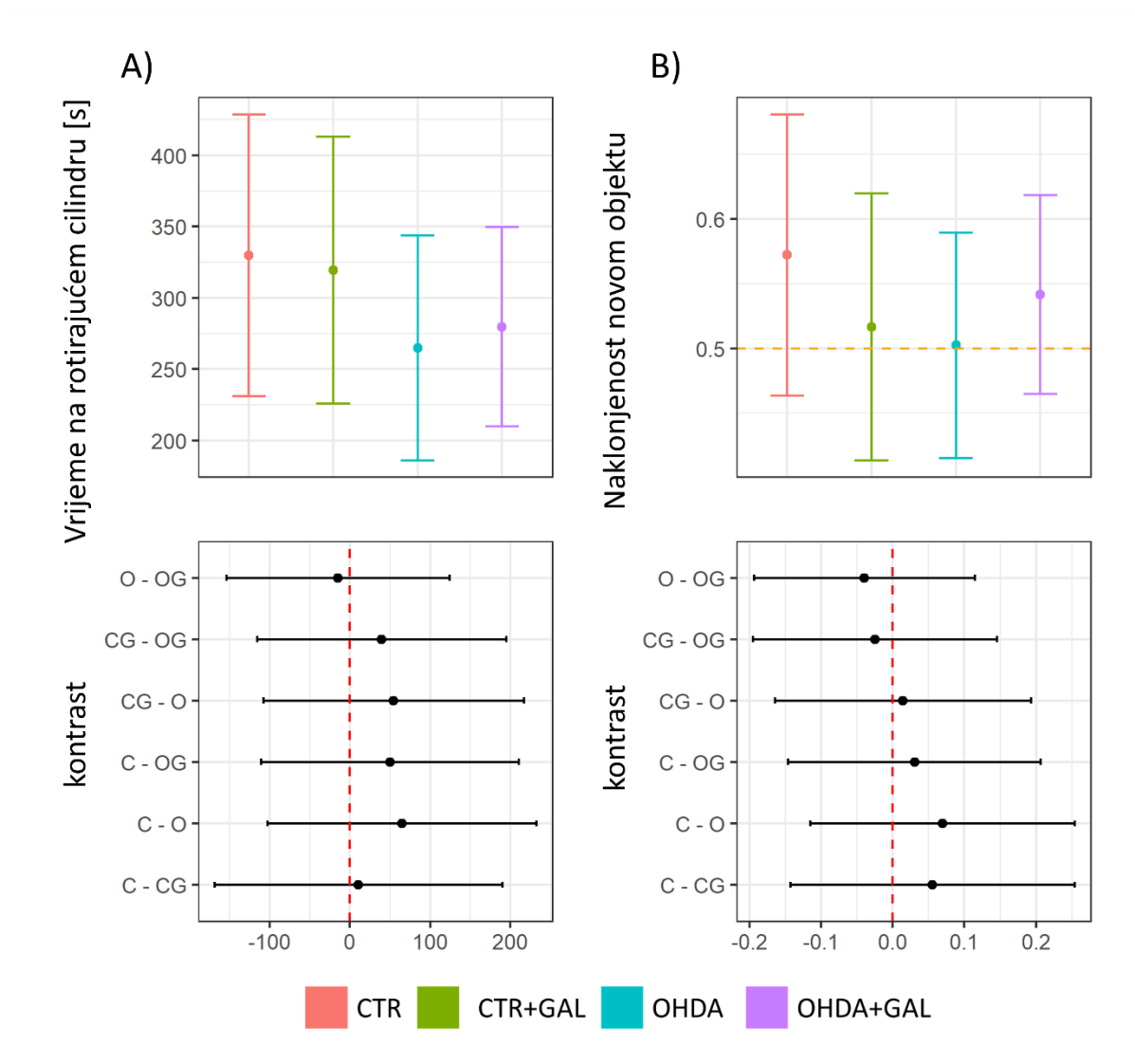
#### **5.3.3.1. Kronična oralna primjena D-galaktoze ne dovodi do poboljšanja motoričkih funkcija u 6-hidroksidopaminskom modelu Parkinsonove bolesti**

S obzirom da je u STZ-iev štakorskom modelu sAB-a tijekom kroničnog oralnog tretmana D-galaktozom došlo je do poboljšanja kognitivnih funkcija, učinak kroničnog oralnog tretmana D-galaktozom ispitan je u 6-OHDA štakorskom modelu PB-a unatoč rezultatima koji su pokazali da u trenutku razvijenih motoričkih deficita vjerojatno ne postoji izražena redoks dishomeostaza u probavnom sustavu te da kronična primjena D-galaktoze ne ostvaruje izražen učinak na redoks homeostazu probavnog sustava (Slika 57). Ispitivanjem motoričke funkcije, pomoću testa rotirajućeg cilindra, ustanovljeno je da 9 tjedana nakon oralnog tretmana D-galaktozom (200 mg/kg) u vodi za piće nije došlo do znatnog oporavka motoričke funkcije iako je prosječno vrijeme provedeno na cilindru bilo nešto više u tretiranoj skupini (Slika 58A). Test objektnog pamćenja ukazao je da bi tretman D-galaktozom mogao biti povezan s narušavanjem kognitivne funkcije u kontrolnoj skupini, ali i s malim kognitivnim poboljšanjem u 6-OHDA štakorskom modelu PB-a (Slika 58B). Međutim, zbog neuobičajeno niske procjene u kontrolnih životinja, te malih opaženih učinaka, bez ponavljanja pokusa nije moguće zaključiti radi li se o slučajnom nalazu ili o stvarnom učinku D-galaktoze (Slika 58B).



**Slika 57. Dizajn pokusa u kojem je ispitan učinak kroničnog oralnog tretmana D-galaktozom u štakorskom modelu Parkinsonove bolesti izazvanom bilateralnom intrastrijatalnom primjenom 6-hidoksidopamina (6-OHDA).**

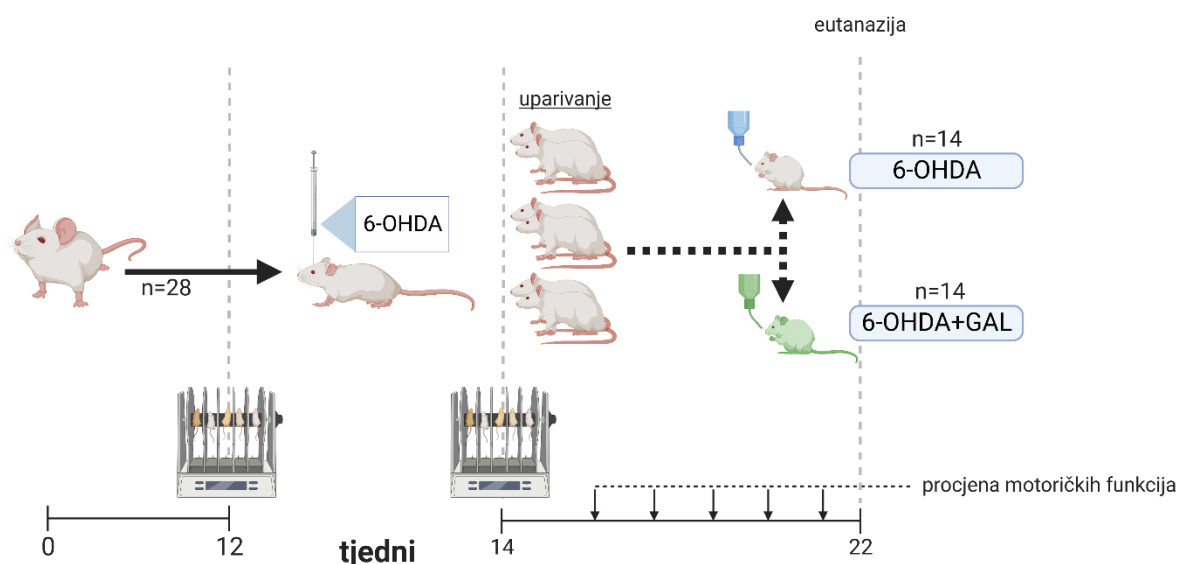




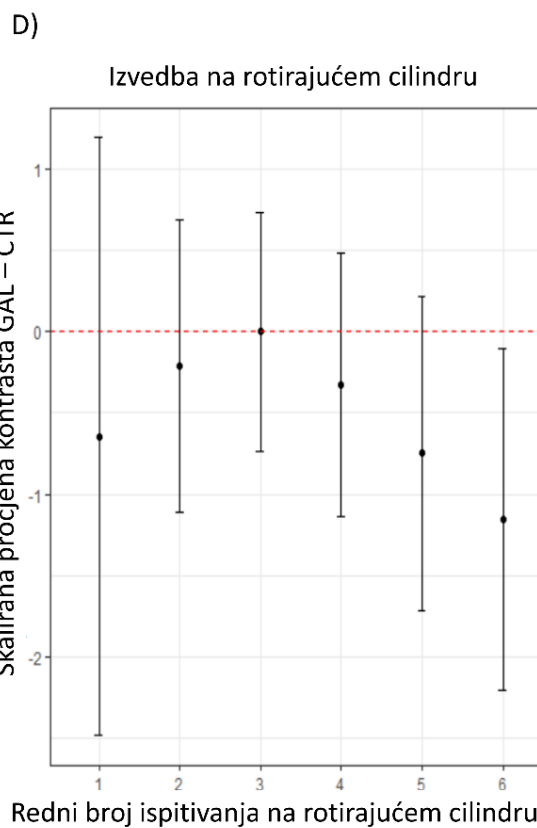
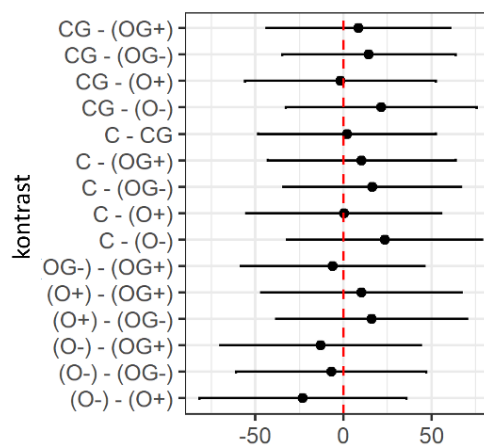
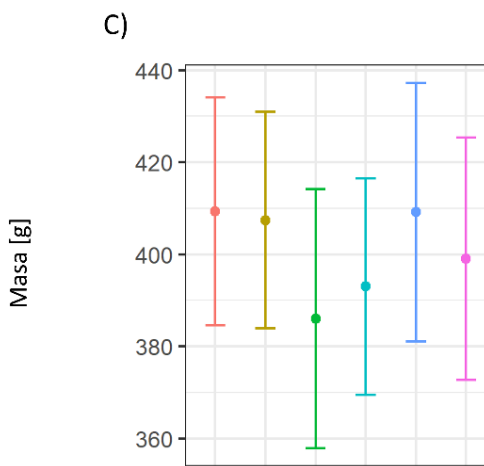
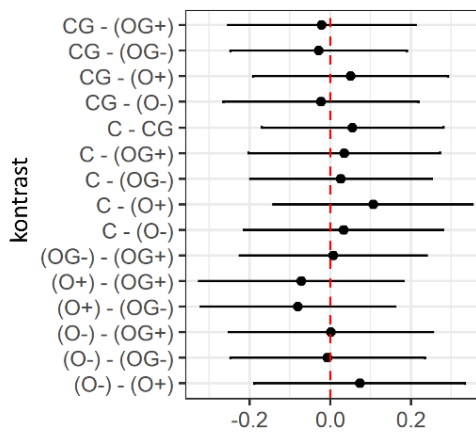
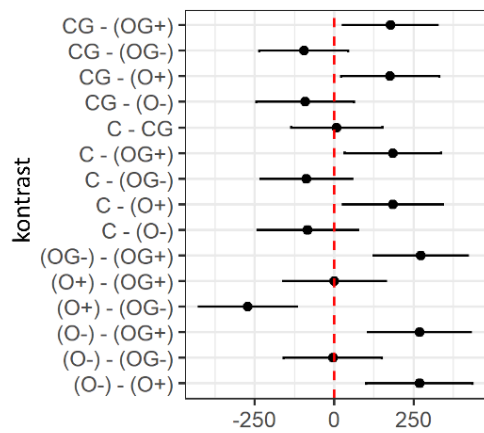
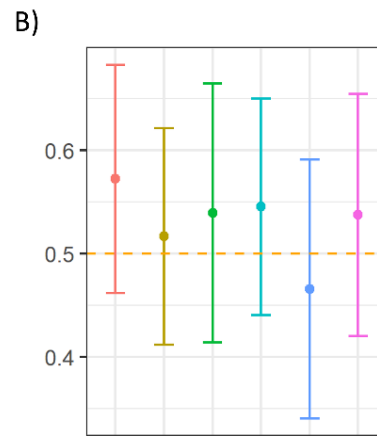
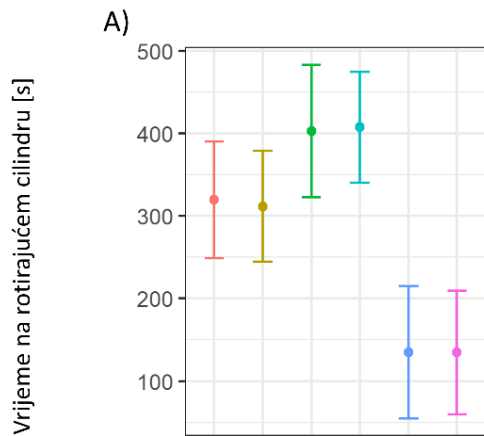
**Slika 58. Utjecaj kroničnog oralnog tretmana D-galaktozom na motoričku izvedbu i objektno pamćenje u štakorskom modelu Parkinsonove bolesti (OHDA).** A) Procjene i 95% intervali pouzdanosti izvedeni iz linearnog modela koji odražava vrijeme provedeno na rotirajućem cilindru (gore) te procjene i 95% intervali pouzdanosti kontrasta koji prikazuju veličinu učinka (dolje); B) Procjene i 95% intervali pouzdanosti izvedeni iz linearnog modela koji odražava naklonjenost novom objektu (omjer vremena provedenog u istraživanju novog objekta i vremena provedenog u istraživanju oba objekta)(gore) te procjene i 95% intervali pouzdanosti kontrasta koji prikazuju veličinu učinka (dolje).

Po završetku pokusa, životinje su, zbog velike varijabilnosti u razvoju simptoma, na temelju izvedbe na rotirajućem cilindru na kraju eksperimenta raspodijeljene u skupine simulirajući ugniježdenu studiju slučajeva i kontrola. Iako s obzirom na arbitrarni limit raspodjele direktne usporedbe između skupine koja je razvila simptome i one koja nije mogu biti nepouzdana, na ovaj je način pomoću podataka prikupljenih tijekom trajanja istraživanja moguće pronaći čimbenike koji su bili združeni s povećanim rizikom za razvoj motornih simptoma. Ponovljena

analiza motoričkih simptoma, na temelju rezultata na testu rotirajućeg cilindra, pokazala je naglašene razlike između skupina koje su razvile simptome i onih koje nisu, pružajući dodatne dokaze o znatnoj varijabilnosti odgovora na 6-OHDA (Slika 60A). Ponovljena analiza testa objektivnog pamćenja pokazala je da životinje koje su razvile simptome, a koje nisu tretirane galaktozom imaju nešto nižu procjenu objektivnog pamćenja iako su zbog ranije navedenih razloga podaci testa objektivnog pamćenja pružili procjene sa širokim intervalima pouzdanosti (Slika 60B). Uočeni je mali mogući blagotvorni učinak D-galaktoze tijekom analize motoričkih simptoma (Slika 58A). Dodatne analize ukazale su da bi opaženi učinak mogao biti posljedica neočekivanog čimbenika pristranosti povezanog s metabolizmom (u skupini životinja koje nisu razvile motoričke simptome nakon intrastrijatalne primjene 6-OHDA-a bile su pojačano zastupljene životinje koje su prilikom ulaska u pokus imale tjelesnu masu malo nižu od očekivane s obzirom na leglo i dob)(Slika 60C). Stoga je provedena dodatna studija u kojoj su životinje prvo uparene po masi i motoričkoj izvedbi na testu rotirajućeg cilindra, potom tretirane intrastrijatalno sa 6-OHDA-om, te nakon 14 dana uparene po izvedbi na rotirajućem cilindru i masi nakon čega je motorička izvedba ponavljano procjenjivana u periodu od 8 tjedana (Slika 59). U dodatnom je pokusu jasno pokazano da D-galaktoza ne ostvaruje blagotvorne učinke na motoričke simptome u štakorskom modelu PB nego dugotrajna oralna primjena D-galaktoze blago povećava rizik za razvoj izraženije motoričke disfunkcije (Slika 60D).



**Slika 59. Dizajn pokusa za procjenu učinaka kroničnog oralnog tretmana D-galaktozom u 6-hidroksidopaminom (6-OHDA) izazvanom modelu Parkinsonove bolesti uz balansiranje kovarijata tjelesne mase i motoričke funkcije.**

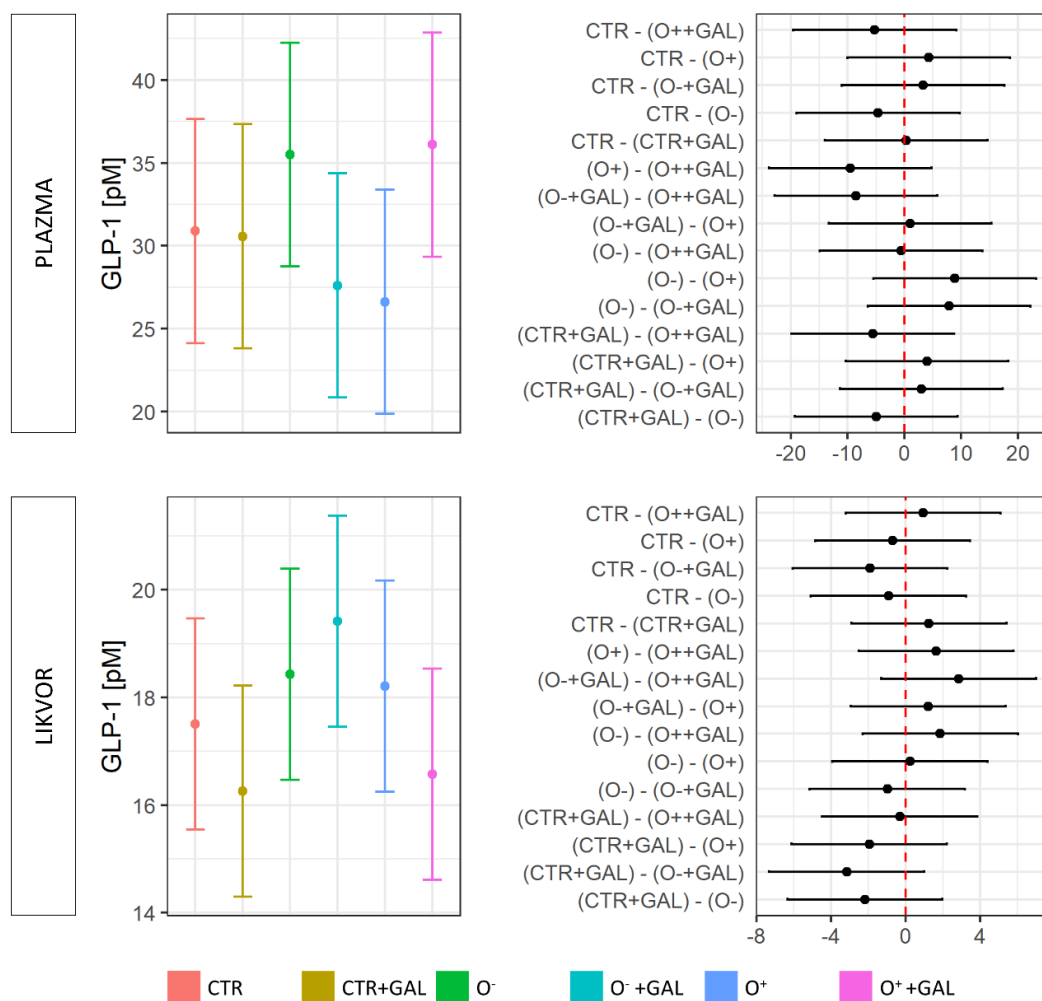


■ CTR 
 ■ CTR+GAL 
 ■ O- 
 ■ O+ +GAL 
 ■ O+ 
 ■ O+ +GAL

**Slika 60. Motorička izvedba i objektno pamćenje u štakorskom modelu Parkinsonove bolesti nakon kroničnog oralnog tretmana D-galaktozom.** Motorička izvedba procijenjena je na kraju in vivo pokusa testom rotirajućeg cilindra tako da je eksperiment dizajniran kao ugniježdjena studija slučajeva i kontrola s ciljem razjašnjavanja rizičnih čimbenika za razvoj motoričkih deficita nakon intrastrijatalnog tretmana 6-hidroksidopaminom (6-OHDA). Prikazane su procjene i 95% intervali pouzdanosti izvedeni iz linearnog modela koji odražava vrijeme provedeno na rotirajućem cilindru (A), naklonjenost novom objektu (B) i tjelesnu masu (C)(gore) te procjene i 95% intervali pouzdanosti kontrasta koji prikazuju veličinu učinka (dolje); D) Zasebna kohorta štakora u kojoj je utjecaj tretmana oralnom otopinom D-galaktoze (200 mg/kg) ispitan na način da su životinje balansirane s obzirom na tjelesnu masu i izvedbu na testu rotirajućeg cilindra prije tretmana 6-OHDA. Prikazane su procjene dobivene linearnim mješovitim modelom na način da je izvedba definirana kao zavisna varijabla dok su nezavisne varijable bile tretman, vremenska točka, masa životinje, te interakcija tretmana, vremenske točke, i mase, uz identifikacijski broj životinje uveden u model kao varijabla nasumičnosti kako bi se uzelo u obzir ponavljano testiranje i međusobna zavisnost mjerenja. Na grafikonu je pokazana skalirana procjena kontrasta kontrolnog tretmana (voda) i tretmana oralnom otopinom D-galaktoze.

### **5.3.3.2. Niže vrijednosti inkretina povezane su s lošijom motoričkom funkcijom u 6-hidroksidopaminskom štakorskom modelu Parkinsonove bolesti**

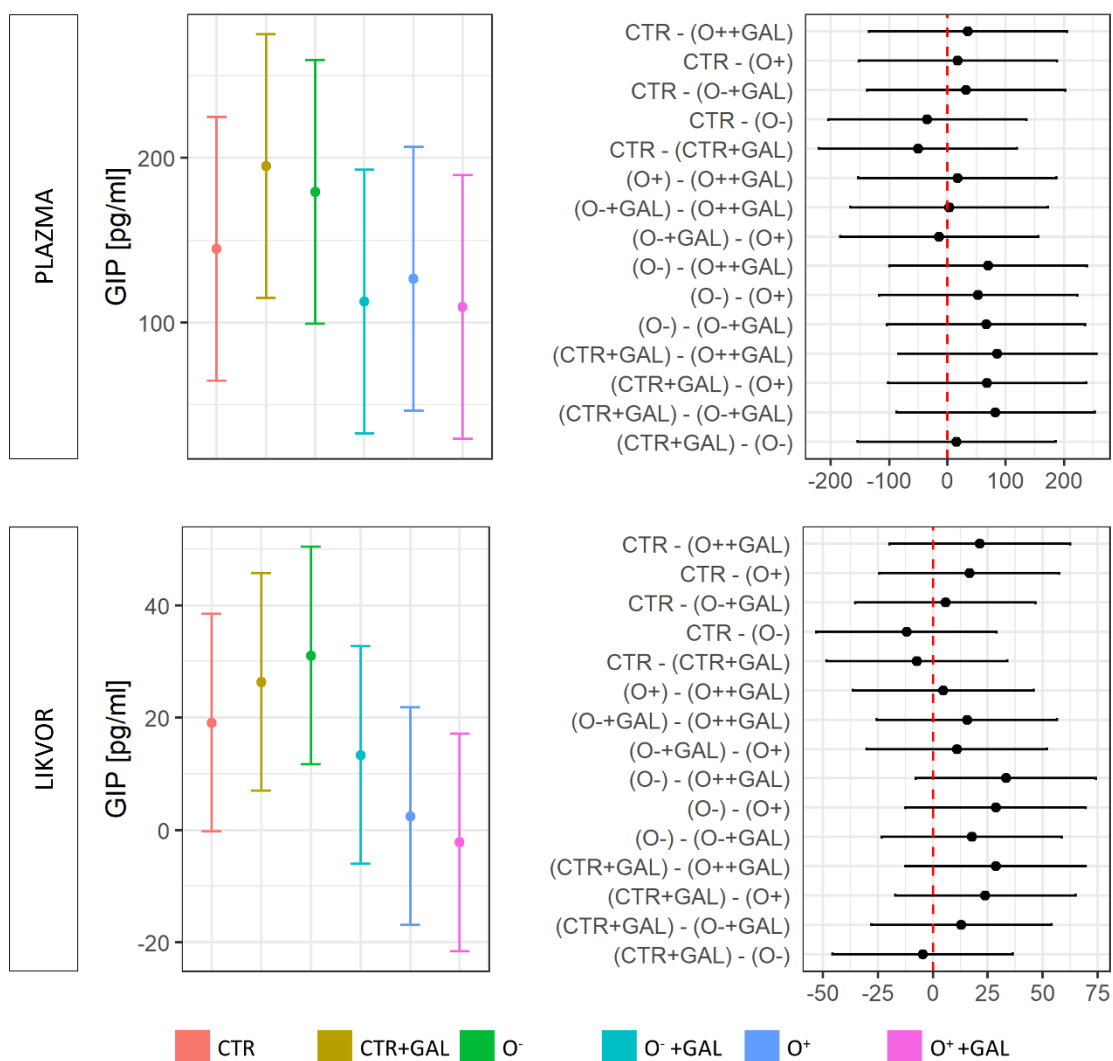
Bez obzira na izostanak protektivnih učinaka D-galaktoze, inkretini bi mogli biti povezani s razvojem motoričkih simptoma u štakorskom modelu PB-a, pogotovo uzevši u obzir opaženi protektivni učinak niže od očekivane tjelesne mase s obzirom na leglo i dob (Slika 60C). U skladu s postavljenom hipotezom, životinje koje nisu razvile motoričke simptome imale su povišenu koncentraciju GLP-a 1 u plazmi, dok je u onih koje su razvile najizraženije simptome, koncentracija GLP-a 1 bila snižena (Slika 61). Zanimljivo, kronični oralni tretman D-galaktozom nije doveo do promjena koncentracije GLP-a 1 u plazmi u kontrolnoj skupini. Međutim, u 6-OHDA štakorskom modelu PB-a, u životinja koje nisu razvile simptome D-galaktoza je smanjila koncentraciju dok je u životinja koje su razvile simptome tretman povećao koncentraciju GLP-a 1 u plazmi (Slika 61). Koncentracija GLP-a 1 u likvoru u kontrolnoj skupini i u 6-OHDA koji su razvili simptome nakon tretmana D-galaktozom bila je snižena, dok je u 6-OHDA koji nisu razvili simptome tretman D-galaktozom ostvario obrnuti učinak (Slika 61).



**Slika 61. Koncentracija peptida-1 sličnog glukagonu (GLP-1) u plazmi i likvoru štakorskom modelu Parkinsonove bolesti nakon kroničnog oralnog tretmana D-galaktozom.** Procjene i 95% intervali pouzdanosti izvedeni iz linearnog modela koji odražava koncentraciju GLP-1 u plazmi (gore) i cerebrospinalnom likvoru (dolje) te procjene i 95% intervali pouzdanosti kontrasta koji prikazuju veličinu učinka.

Koncentracija drugog važnog inkretina, GIP-a, također je bila povećana u plazmi u skupini životinja koje su imale smanjeni rizik od razvoja motoričkih simptoma nakon intrastrijatalnog 6-OHDA-a (Slika 62). U kontrolnoj skupini, kronični oralni tretman D-galaktozom uzrokovao je povećanje GIP-a u plazmi, u 6-OHDA životinja koje na kraju pokusa nisu pokazivale motoričke simptome koncentracija GIP-a nakon tretmana D-galaktozom bila je snižena, a kod životinja koje su razvile motoričke simptome nije uočena razlika u koncentraciji bez obzira na tretman D-galaktozom (Slika 62). Za razliku od GLP-a 1, koncentracija GIP-a u likvoru pokazala je sličan obrazac kao i u plazmi – tretman D-galaktozom povećao je GIP u kontrolnoj

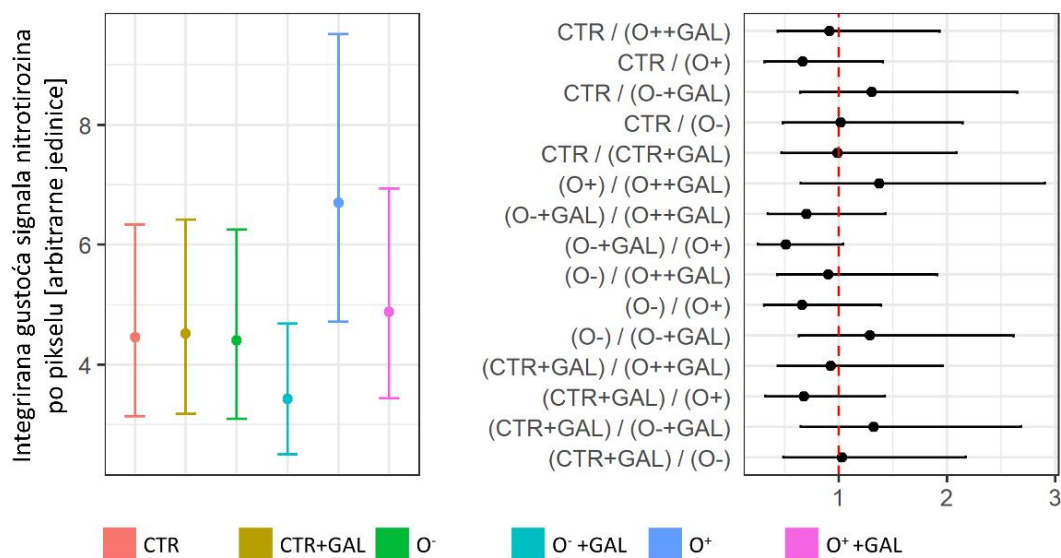
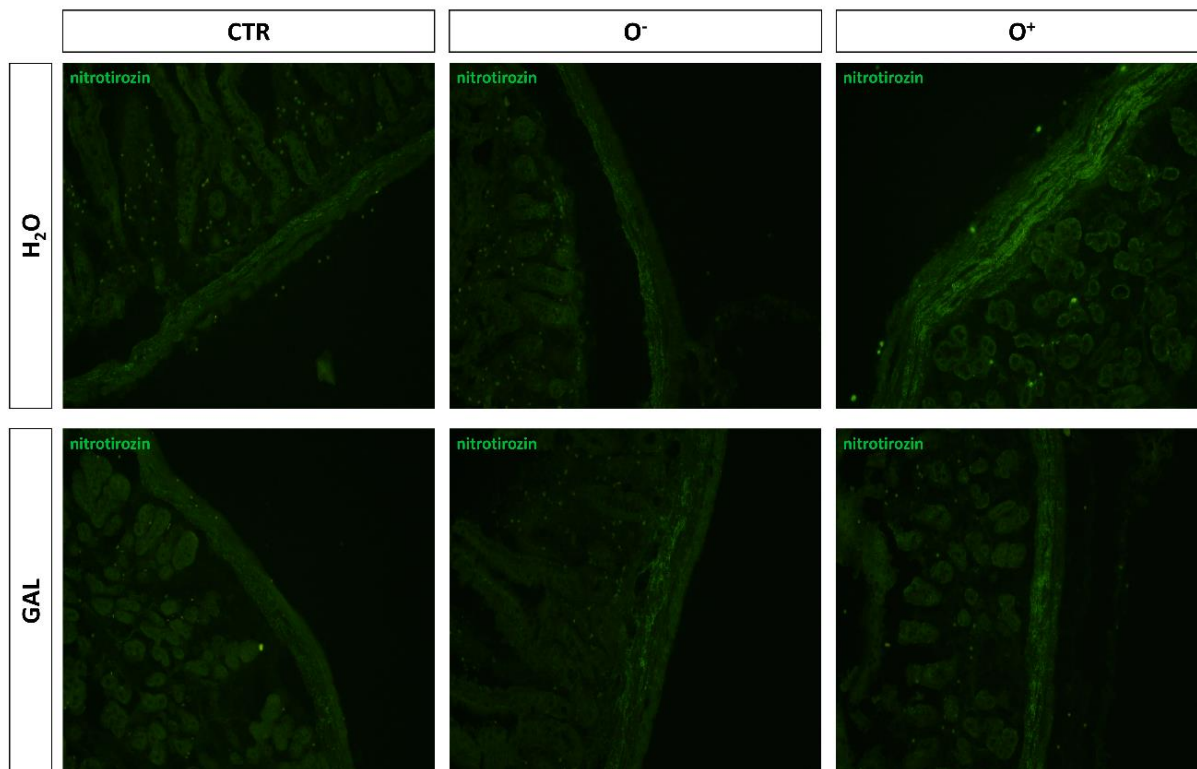
skupini, ali je rezultirao smanjenom koncentracijom u 6-OHDA štakorskom modelu PB-a (Slika 62).



**Slika 62. Koncentracija inzulotropnog polipeptida ovisnog o glukozi (GIP) u plazmi i likvoru u štakorskom modelu Parkinsonove bolesti nakon kroničnog oralnog tretmana D-galaktozom. Procjene i 95% intervali pouzdanosti izvedeni iz linearnog modela koji odražava koncentraciju GIP u plazmi (gore) i cerebrospinalnom likvoru (dolje) te procjene i 95% intervali pouzdanosti kontrasta koji prikazuju veličinu učinka.**

### **5.3.3.3. Kronični oralni tretman D-galaktozom djeluje blagotvorno na homeostazu i funkciju probavnog sustava u štakorskom modelu Parkinsonove bolesti**

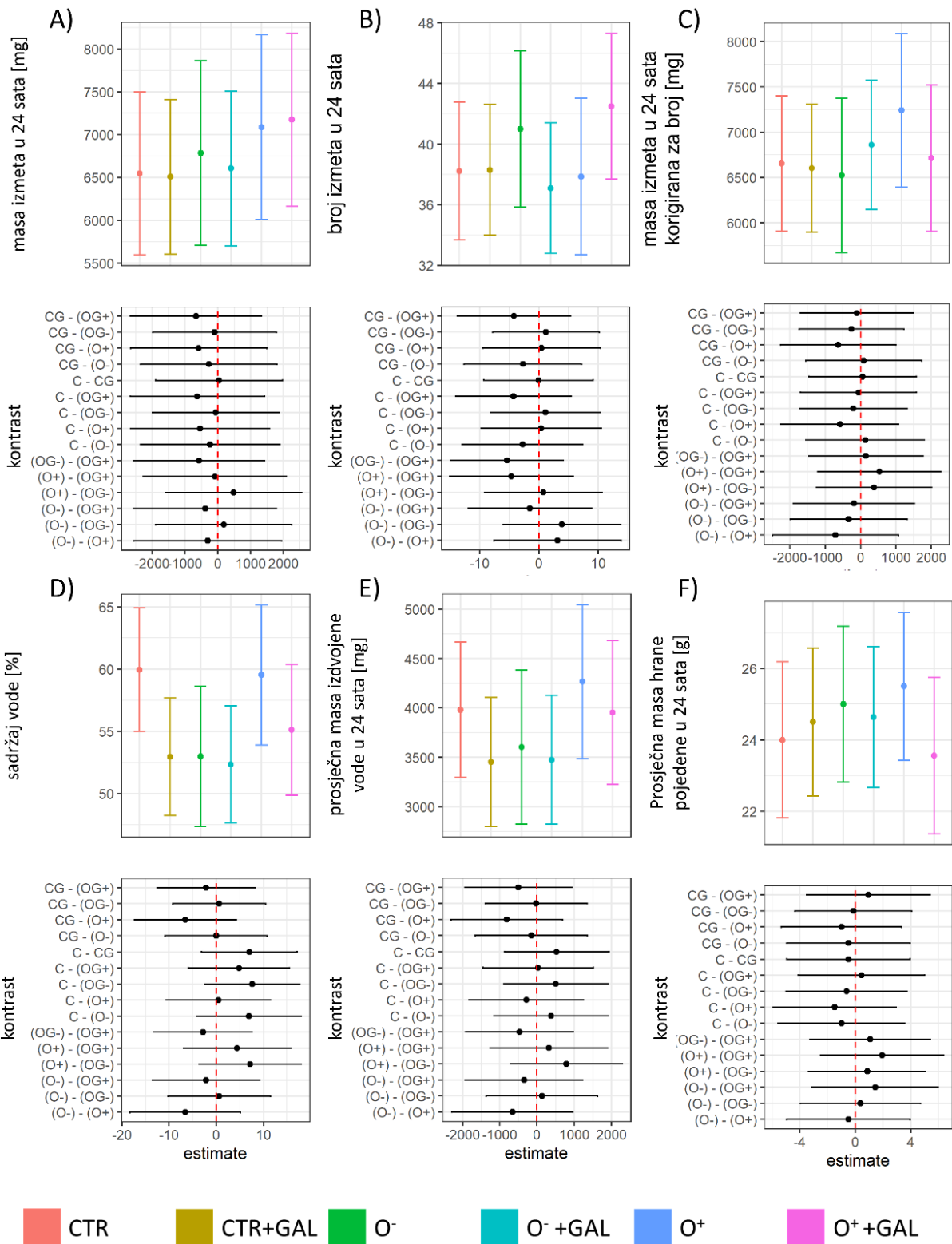
Iako tretman D-galaktozom nije bio povezan sa smanjenim rizikom od nastanka motoričkih simptoma nakon intrastrijatalne dostave 6-OHDA-a u štakorskom modelu PB-a, postavili smo hipotezu da bi D-galaktoza ipak mogla ostvariti blagotvorne učinke u probavnom sustavu. U prijašnjem je pokusu, temeljem analize biljega redoks homeostaze i oksidativnog stresa u duodenumu, ileumu, i kolonu, zaključeno da ne postoje dokazi o redoks dishomeostazi u probavnom sustavu u štakorskom modelu PB-a izazvanom pomoću 6-OHDA-a, čak i u trenutku kad postoje izraženi motorički simptomi. Međutim, u prethodnom istraživanju nije provedena zasebna analiza pojedinih strukturalnih i funkcionalnih jedinica probavne stijenke. Naime, moguće je da se nakon razvoja središnjih simptoma redoks dishomeostaza pretežito razvija u mišićnom sloju probavne cijevi, s obzirom da se temeljem etiopatogeneze modela 6-OHDA očekuje da patologija napreduje od središnjeg živčanog sustava prema periferiji, a ne iz lumena probavne cijevi. U skladu s postavljenom hipotezom, analiza nitrotirozina, kao proizvoda nitracije tirozina posredovane reaktivnim dušikovim spojevima, ukazala je na postojanje izolirane redoks dishomeostaze mišićnog sloja probavne cijevi i to gotovo isključivo u životinja koje su razvile motoričke simptome nakon intrastrijatalne primjene 6-OHDA-a (Slika 63). Zanimljivo, iako kronični oralni tretman D-galaktozom nije bio povezan s promjenom signala nitrotirozina u kontrolnoj skupini, u 6-OHDA-om tretiranih životinja tretman D-galaktozom bio je povezan sa sniženjem signala bez obzira jesu li životinje imale razvijene motoričke simptome (Slika 63).



**Slika 63. Analiza imunofluorescentnog signala nitrotirozina u duodenumu u štakorskom modelu Parkinsonove bolesti nakon kroničnog oralnog tretmana D-galaktozom.** Reprezentativne epifluorescencijske snimke obilježenog nitrotirozina u mišićnom sloju probavne stijenke (gore) te procjene i 95% intervali pouzdanosti izvedeni iz linearnog modela koji odražava integriranu gustoću signala nitrotirozina u mišićnom sloju probavne stijenke (dolje lijevo) uz procjene i 95% intervale pouzdanosti kontrasta koji prikazuju veličinu učinka (dolje desno).

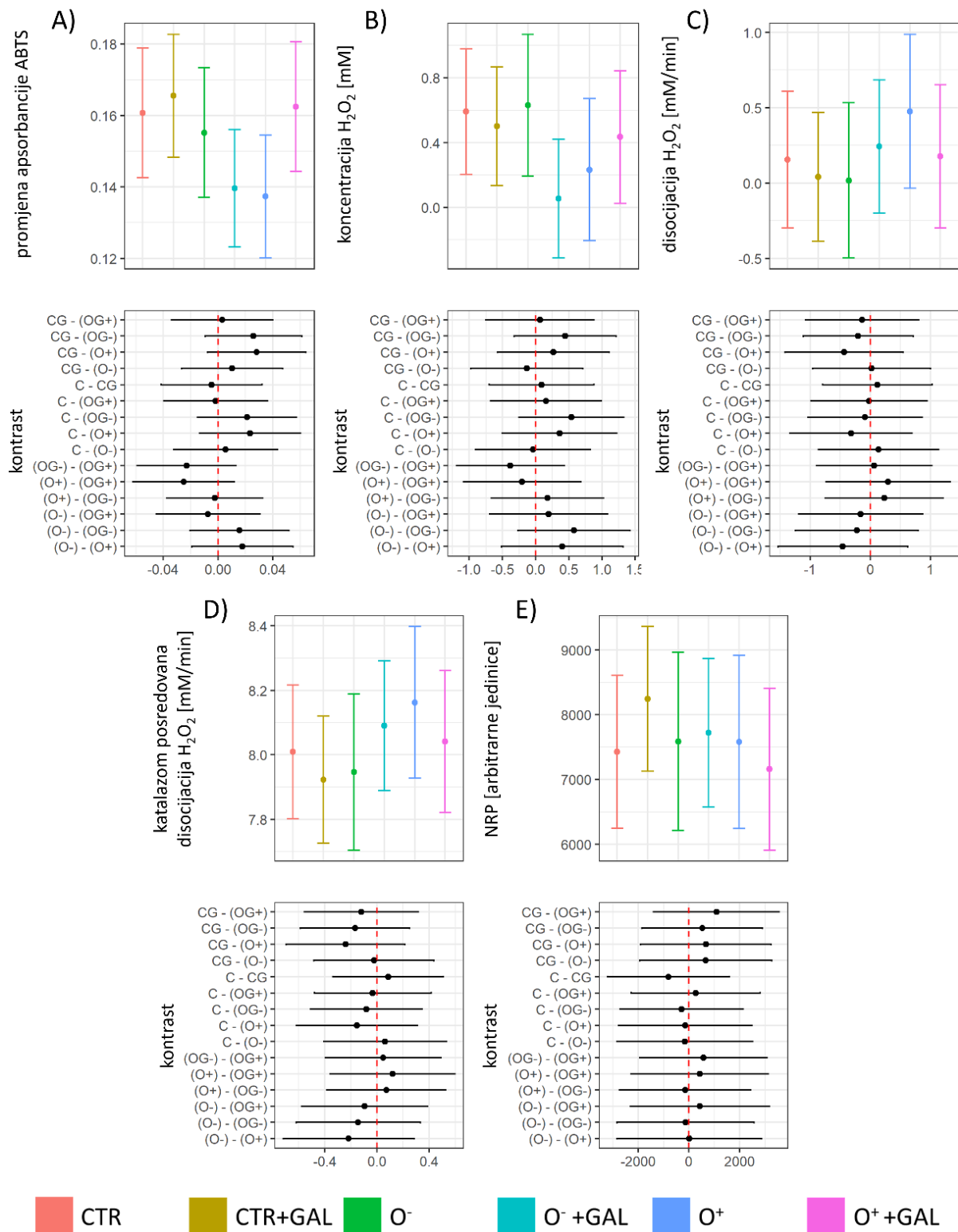


Oksidativno oštećenje mišićnog sloja probavne cijevi moglo bi biti povezano s motoričkom i nemotoričkom disfunkcijom probavnog sustava što je ispitano posredno, pomoću analize defekacije i fecesa prikupljenog 14 dana nakon 6-OHDA tretmana. Prosječna masa fecesa proizvedenog u 24 sata bila je povećana kod životinja tretiranih sa 6-OHDA-om u usporedbi s kontrolnim životinjama koje su istim postupkom primile samo vehikul (Slika 64A). Osim toga, 6-OHDA životinje koje su kasnije razvile motoričke simptome prosječno su proizvodile više fecesa nego one koje kasnije nisu razvile simptome, a tretman D-galaktozom nije utjecao na ukupnu masu fecesa u niti jednoj skupini (Slika 64A). Tretman D-galaktozom nije utjecao na broj proizvedenih fecesa u kontrolnih životinja, ali smanjio je broj fecesa u 6-OHDA skupini koja nije razvila simptome dok je broj bio povećan tretmanom u životinja koje su kasnije razvile simptome (Slika 64B). Povećani broj proizvedenih fecesa tijekom 24 sata bio je povezan s manjim rizikom od razvoja motoričkih simptoma (Slika 64B). Kad je ukupna masa fecesa proizvedenog u 24 sata u modelu podešena za broj fecesa, skupina životinja koje su primile 6-OHDA, a kasnije nisu razvile simptome, imala je podjednaku procijenjenu prosječnu vrijednost kao i kontrolna skupina (bez obzira na tretman D-galaktozom), dok je skupina koja je kasnije razvila simptome imala više vrijednosti (Slika 64C). Tretman D-galaktozom pokazao je mali normalizirajući učinak (smanjenje povećane produkcije fecesa) u 6-OHDA životinja koje su kasnije razvile motoričke simptome (Slika 64C). Zanimljivo, tretman 6-OHDA smanjio je prosječni udio vode u fecesu samo u skupini koja kasnije nije razvila motoričke simptome (Slika 64D), a tretman D-galaktozom ostvario je sličan učinak, ali samo u kontrolnoj skupini te u skupini tretiranoj sa 6-OHDA-om koja je kasnije razvila motoričke simptome (u skupini koja kasnije nije razvila simptome D-galaktoza nije smanjila udio vode) (Slika 64D). S obzirom da je ranije uočeno da životinje koje su kasnije razvile motoričke simptome stvaraju veću ukupnu masu fecesa u 24 sata, postavljena je hipoteza da navedena skupina životinja izlučuje više vode tijekom 24 sata u usporedbi s ostalim skupinama. Na temelju modela izmjereno je da životinje tretirane sa 6-OHDA-om koje su pod povećanim rizikom od nastanka motoričkih simptoma izlučuju ~20% više vode putem probavnog sustava od životinja koje su primile 6-OHDA, ali kasnije nisu razvile simptome (Slika 64E). Navedene razlike mogle bi biti uzrokovane različitim obrascem hranjenja te mogućom razlikom u masi unesene hrane koja je životinjama bila dostupna *ad libitum* te je postavljen model kojim se ispituju razlike u ukupnoj masi hrane pojedene u 24 sata po skupinama. Masa hrane unesene u 24 sata nije se razlikovala između skupina (prosječna razlika između grupa bila je u pravilu unutar moguće pogreške mjerenja) (Slika 64F).



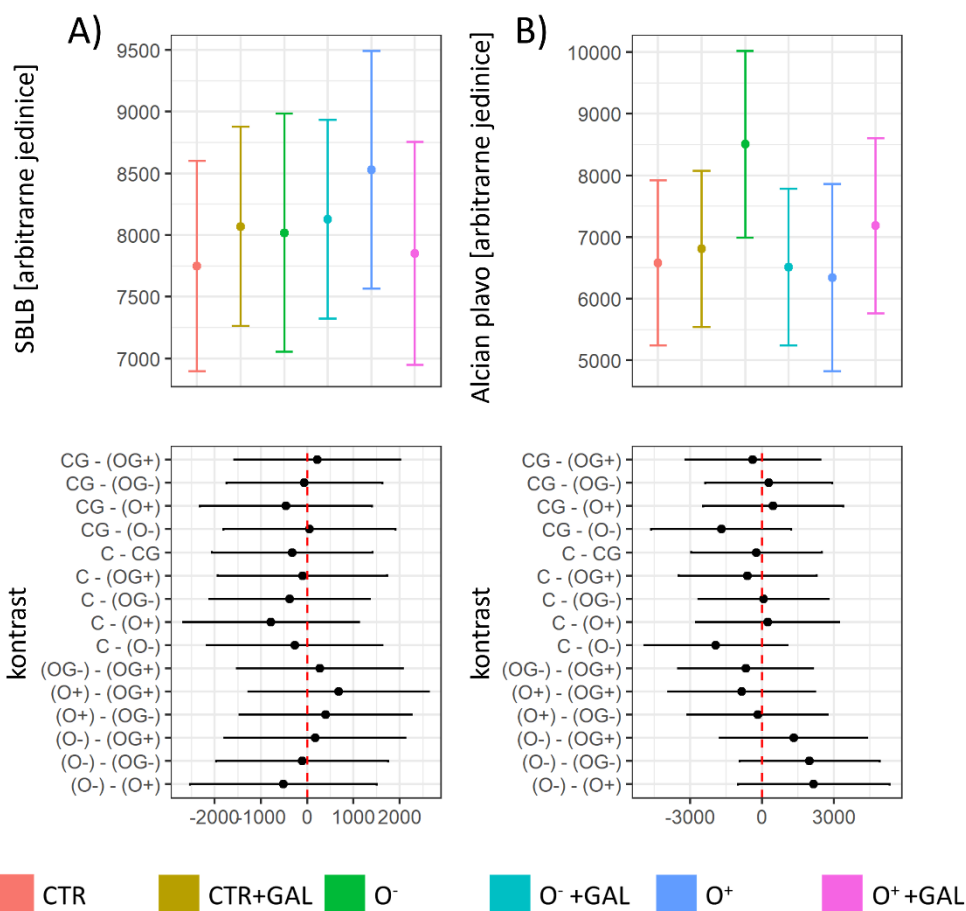
**Slika 64. Analiza fecesa u štakorskom modelu Parkinsonove bolesti nakon kroničnog oralnog tretmana D-galaktozom.** Prikazane su procjene i 95% intervali pouzdanosti izvedeni iz linearnog modela koji odražavaju masu fecesa (A), broj fecesa u 24 sata (B), mase fecesa uz korekciju za broj fecesa (C), fekalni sadržaj vode (D), ukupnu masu izdvojene fekalne vode (E) i prosječnu masu konzumirane hrane u 24 sata (F)(gore) te procjene i 95% intervali pouzdanosti kontrasta koji prikazuju veličinu učinka (dolje).

Različiti obrasci nastanka i propulzije fecesa (koji bi mogli biti posljedica redoks dishomeostaze mišićnih slojeva probavnog sustava) mogli bi narušiti intraluminalnu redoks ravnotežu koja bi pak mogla biti odražena redoks svojstvima fecesa. Postavljena hipoteza testirana je na uzorcima fecesa koji su prikupljeni 14 dana nakon 6-OHDA tretmana. Analiza promjene apsorbancije ABTS radikal-kationa (proporcionalna antioksidativnom kapacitetu) pokazala je da je reduktivni kapacitet fecesa u životinja koje su kasnije razvile motoričke simptome smanjen u usporedbi s fecesom životinja koje kasnije nisu razvile motoričke simptome (Slika 65A). Tretman D-galaktozom nije značajno utjecao na kapacitet u kontrolnih životinja (Slika 65A). Međutim, D-galaktoza je snizila antioksidativni kapacitet u 6-OHDA životinja koje kasnije nisu razvile motoričke simptome, a učinak u 6-OHDA životinja koje su kasnije razvile motoričke simptome bio je obrnut (Slika 65A). Procijenjena bazalna koncentracija  $H_2O_2$  bila je podjednaka u kontrolnih životinja i 6-OHDA-om tretiranih životinja koje nisu razvile simptome, a u životinja sa simptomima koncentracija je bila snižena (Slika 65B). Tretman D-galaktozom u životinja bez simptoma snizio je koncentraciju  $H_2O_2$  na razinu izmjerenu u životinja sa simptomima (Slika 65B). Kapacitet disocijacije  $H_2O_2$  bio je u skladu s izmjerenom bazalnom koncentracijom  $H_2O_2$ : u 6-OHDA životinja s povećanim rizikom za razvoj simptoma disocijacijski je kapacitet bio viši nego u kontrolnih životinja i životinja s niskim rizikom (Slika 65C). Zanimljivo, analogni je obrazac opažen kad je egzogena katalaza inkubirana s razrijeđenim uzorcima (bez kapaciteta za disocijaciju  $H_2O_2$ ) *in vitro* sugerirajući da su opaženi učinci odraz biokemijskog matriksa (koji bi mogao sadržavati inhibitore ili modulatore katalaze/peroksidaze), a ne nužno izražaja enzima (Slika 65D). Rezultati analize reduktivnog kapaciteta NRP metodom ukazali su na povećanje kapaciteta fekalnih antioksidansa nakon tretmana D-galaktozom u kontrolnoj skupini, ali izostanak učinka u životinja tretiranih sa 6-OHDA-om (Slika 65E).



**Slika 65. Biljezi redoks homeostaze u fecesu u štakorskom modelu Parkinsonove bolesti nakon kroničnog oralnog tretmana D-galaktozom.** Prikazane su procjene i 95% intervali pouzdanosti izvedeni iz linearnih modela koji odražavaju reduktivni kapacitet fecesa izmjeren pomoću metastabilnog 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline)(ABTS) radikal-kationa (A), fekalni H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B), disocijacijski kapacitet H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (C), učinak uzoraka fecesa bez ostatnog kapaciteta za disocijaciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na egzogenu katalazu (D), ukupni reduktivni kapacitet izmjeren redoks permanganometrijom na nitrocelulozi (NRP)(E)(gore) te procjene i 95% intervali pouzdanosti kontrasta koji prikazuju veličinu učinka (dolje).

Promjena fekalnih biokemijskih biljega redoks homeostaze mogla bi odražavati kvantitativne promjene važnih sastavnica fecesa pa je provedena preliminarna analiza sastava nepolarnih lipida metodom SBLB te kvantitativna analiza alcijanofilne sluzi. Analiza SBLB-om pokazala je da je u životinja tretiranih sa 6-OHDA-om povećan sadržaj nepolarnih lipida u fecesu i to posebno u skupini s povećanim rizikom za razvoj motoričkih simptoma (Slika 66A). Tretman D-galaktozom povećao je koncentraciju nepolarnih lipida u kontrolnoj skupini, nije ju promijenio u životinja s niskim rizikom za razvoj motoričkih simptoma, a u životinja s visokim rizikom ju je smanjio (Slika 66A). Analiza sluzi pokazala je da se životinje s niskim rizikom za razvoj motoričkih simptoma razlikuju od onih s visokim rizikom te je kod njih bilo otprilike 30% više sluzi u uzorcima fecesa (Slika 66B). Zanimljivo, u skupini s niskim rizikom za razvoj motoričkih simptoma, tretman D-galaktozom bio je povezan sa smanjenim sadržajem sluzi, dok je kod životinja s visokim rizikom količina sluzi u fecesu bila povećana (Slika 66B).



**Slika 66. Koncentracija nepolarnih lipida i sadržaj alcijanofilne sluzi u fecesu u štakorskom modelu Parkinsonove bolesti nakon kroničnog oralnog tretmana D-galaktozom.** Prikazane su procjene i 95% intervali pouzdanosti izvedeni iz linearnih modela koji odražavaju koncentraciju nepolarnih lipida procijenjenih pomoću mjerenja mrlja lipida pomoću Sudan crnog (SBLB, engl. Sudan Black lipid blot)(A) i koncentraciju alcijanofilne tvari (posredna mjera probavne sluzi)(B)(gore) te procjene i 95% intervali pouzdanosti kontrasta koji prikazuju veličinu učinka (dolje).



## 6. RASPRAVA

Probavni sustav uključen je u etiopatogenezu neurodegenerativnih poremećaja, međutim, njegova kompleksna uloga, dvosmjerna povezanost sa središnjim živčanim sustavom, dinamična ravnoteža s crijevnim mikrobiomom te uloga u brojnim fiziološkim procesima dramatično otežavaju razumijevanje patofiziološke uloge probavnog sustava i mogućnost njegove farmakološke modulacije u kontekstu smanjenja rizika za razvoj neurodegenerativnih bolesti, usporavanja njihovog napredovanja i liječenja. Istraživanja provedena u sklopu ove disertacije pružila su uvid u patofiziološke procese koji bi mogli biti važni za razumijevanje uloge probavnog sustava u neurodegenerativnim poremećajima (poglavito u AB-u i PB-u), primarno u kontekstu eferentnih učinaka osovine mozak-crijevo u dva životinjska modela kemijski potaknute središnje neurodegeneracije. U daljnjem će tekstu biti raspravljena ključna opažanja iz provedenih istraživanja.

### 6.1. Patofiziološke promjene probavnog sustava u modelima Alzheimerove bolesti

#### 6.1.1. Patofiziološke promjene probavnog sustava u transgeničnim modelima Alzheimerove bolesti

Dosadašnja istraživanja potvrdila su zahvaćenost probavnog sustava u brojnim modelima AB-a. Poremećaj crijevne homeostaze pokazan je u različitim transgeničnim mišjim modelima AB-a (npr. Tg2576, TgCRND8, 5×FAD, mThy1-hAβPP751, AβPP23, APP/PS1, 3xTg, App<sup>NL-G-F</sup>)(318–327). U Tg2576 mišjem modelu poremećaj crijevne homeostaze opažen je prije središnjeg nakupljanja Aβ-a i pojave kognitivnog deficita (318). U presimptomatskih Tg2576 miševa pronađena je smanjena fukozilacija spojeva probavne sluzi te snižen izražaj E-kadherina, važnog proteina tijesnih spojeva ključnog za održavanje funkcionalne crijevne barijere (318). Opažene promjene crijevne barijere bile su povezane s prodorom bakterija kroz epitelnu barijeru (318) što bi moglo biti važno u kontekstu etiopatogeneze neurodegenerativnih promjena obzirom da je crijevna propusnost prepoznata kao važan patofiziološki proces koji poticanjem i podržavanjem sustavne upale te upale u enteričkom i središnjem živčanom sustavu može dovesti do neurodegeneracije (621). Uz poremećaj crijevne barijere,



Honarparisheh i suradnici, u presimptomatskih su Tg2576 miševa uočili i poremećaj apsorpcije vitamina B12 što bi moglo ukazivati na dodatne mehanizme kojima rana disfunkcija probavnog sustava može povećati rizik za nastanak neurodegenerativnih promjena (318). Semar i suradnici analizirali su probavni sustav u tri transgenična modela AB-a (mThy1-hA $\beta$ PP751 (622), A $\beta$ PP23 (623) i TgCRND8 (624)) kako bi ustanovili dolazi li u transgeničnim modelima do neuropatoloških promjena u crijevima što bi moglo biti od dijagnostičke važnosti obzirom da je, za razliku od središnjeg živčanog sustava, enterički živčani sustav lako dostupan za uzorkovanje (319). Semar i suradnici pokazali su da: i) postoji regionalno specifično pojačanje izražaja A $\beta$ PP-a u probavnom sustavu transgeničnih mišjih modela AB-a na razini gena i proteina; ii) pojačanjem izražaja A $\beta$ -a u probavnom sustavu dolazi do gubitka živčanog tkiva (pleksusa i ganglija); iii) povećani izražaj A $\beta$ PP-a povezan je s poremećajem motoričke funkcije tankog crijeva; iv) izražaj A $\beta$ -a, ali i drugih biljega povezanih s neuropalom u AB-u, poput kiselog vlaknastog proteina glije (GFAP; engl. *glial fibrillary acidic protein*) i receptora sličnog Toll receptoru 4 (TLR4; engl. *Toll-like receptor 4*), pojačan je u probavnom sustavu AB modela i to već u dobi od 3 mjeseca (319). U 5xFAD mišjem modelu također je uočeno naglašeno povećanje izražaja A $\beta$ PP-a već u ranoj dobi u duodenumu, jejunumu i cekumu (zanimljivo, kao i u studiji Semar i suradnika (319), izražaj A $\beta$ PP-a bio je najviši u proksimalnom dijelu probavne cijevi dok su u kolonu uočene tek suptilne razlike), a povećanje opterećenja A $\beta$ -om bilo je povezano sa smanjenjem izražaja i aktivnosti tripsina (za koju je pokazano da izravno može biti posljedica vezanja A $\beta$ -a za enzim) te s promjenom crijevnog mikrobioma (320). Patofiziološke promjene probavnog sustava pronađene su i u APP/PS1 transgeničnom mišjem modelu AB-a u kojem su  $\alpha$  raznolikost mikrobioma i relativna zastupljenost pojedinih bakterijskih rodova (npr. *Helicobacter*, *Rikenella*, *Intestinimonas*, *Odoribacter* te nepoznati rod iz porodice *Ruminococcaceae*) bili znatno izmijenjeni u dobi od 3 mjeseca (321). Izražaj proteina tijesnih spojeva (klaudina, okludina, i zonulina) bio je smanjen u transgeničnom modelu AB-a (321). Osim toga, ukupni reduktivni kapacitet i proteini uključeni u održavanje zaliha GSH-a i redoks homeostaze (npr. GSH sintetaza, GSH reduktaza, GSH S-transferaza) bili su smanjeni dok je izražaj proteina povezanih s upalom bio povećan (npr. NADPH oksidaza 2 i 4)(321). U istom transgeničnom modelu AB-a, ali u životinja starih 8 mjeseci (što približno odgovara zreloj odrasloj dobi u ljudi), Wang i suradnici izmjerili su izmijenjen sastav crijevne mikrobiote, snižene koncentracije fekalnih kratkolančanih masnih kiselina (posebno acetata i propionata), snižen izražaj proteina tijesnih spojeva (zonulina i klaudina) te povećan izražaj citokina i upalnih biljega (interleukina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) i čimbenika nekroze tumora  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )) u crijevu (ileumu i kolonu) i plazmi (322). Važnost navedenih

promjena najjasnija je u kontekstu vremenskih obrazaca. Primjerice, istraživanje vremenskog obrasca promjene crijevnog mikrobioma u APP/PS1 transgeničnih miševa pokazalo je da promjene mikrobioma nastaju prije ključnih neuropatoloških zbivanja poput nakupljanja A $\beta$ -a i neuroupale što upućuje da bi poremećaj homeostaze crijeva mogao biti važan čimbenik u ranoj fazi patogeneze bolesti (625). U 7 mjeseca starih 3xTg miševa opažene su strukturalne promjene stijenke jejunuma (produljenje resica, produbljenje kripte, i stanjenje probavnog zida na račun hipotrofije uzdužnih i kružnih glatkih mišića) koje su bile povezane s izražajem biljega povezanih s AB-om (ciklin-ovisne kinaze 5 (CDK5; *engl. cyclin-dependent kinase 5*), Tau5, i CAS-3)(323). Osim strukturalnih promjena i povećanja izražaja upalnih biljega i biljega povezanih s AB-om u probavnom sustavu, istraživanja provedena u više transgeničnih modela pokazala su da su u ovom sustavu strukturalni poremećaji blisko združeni s poremećajem funkcije (319,324–327).

### **6.1.2. Patofiziološke promjene probavnog sustava u netransgeničnim modelima Alzheimerove bolesti**

Za razliku od probavnog sustava u transgeničnim modelima, patofiziološke promjene probavnog sustava u netransgeničnim modelima AB-a razmjerno su slabo ispitane. Štoviše, prije publikacije prvih rezultata ove disertacije, nije bilo podataka o probavnom sustavu u netransgeničnim modelima AB-a. Istraživanje patofiziologije probavnog sustava u netransgeničnim modelima AB-a posebno je važno jer omogućava razumijevanje promjena probavnog sustava koje su posredovane eferentnim mehanizmima putem osovine crijevo-mozak. U transgeničnim modelima AB-a, umjetno pojačan izražaj proteina koji sudjeluju u patogenezi bolesti izazvan je genetskom manipulacijom koja najčešće nije tkivno specifična. Posljedično, u transgeničnim modelima bolesti nije narušena samo homeostaza središnjeg živčanog sustava već i perifernog tkiva što može biti korisno za razumijevanje obiteljskog AB-a, ali često onemogućava razumijevanje patofiziološkog slijeda u sporadičnom obliku bolesti. Iako netransgenični modeli, pogotovo oni koji se zasnivaju na dostavi neurotoksičnih tvari invazivnim protokolima, također ne omogućavaju vjerno oponašanje sporadičnog AB-a (zbog nerazjašnjene etiologije bolesti), jasan početak patoloških zbivanja u prostoru i vremenu (primjerice izazvan dostavom toksične tvari (npr. STZ-a) u jasno definiranu anatomsku regiju unutar središnjeg živčanog sustava (npr. lateralna moždana komora)), omogućava bolje razumijevanje vremenske i prostorne međuovisnosti patoloških zbivanja – pogotovo ako ona

uključuju udaljeno periferno tkivo poput probavnog sustava. Treba imati na umu da ovaj pristup proučavanja isključivo eferentnih učinaka središnjih neuropatoloških zbivanja na probavni sustav pruža ograničeni (jednostrani) uvid u dvosmjernu komunikaciju crijeva i mozga putem osovine mozak-crijevo koji vjerojatno ne odražava vjerno zbivanja tijekom nastanka bolesti u ljudi s obzirom da bar u dijelu bolesnika, pogotovo onih s rizičnim čimbenicima za razvoj AB-a, istodobno s patofiziološkim zbivanjima u središnjem živčanom sustavu, postoji i znatno alostatsko opterećenje probavnog (i drugih perifernih) sustava. S druge strane, eksperimentalni pristup u kojem je usmjerenje napredovanja patoloških zbivanja putem dvosmjernog komunikacijskog kanala (osovine crijevo-mozak) osigurano uspostavljanjem vremenski i prostorno definirane nokse, jedini je pristup koji omogućava razdvajanje patofiziološkog uzroka i posljedice koje je potom moguće ispitati u vjerodostojnijem biološkom kontekstu drugim (komplementarnim) eksperimentalnim pristupom.

U jednom od nedavnih istraživanja, u kojem su ispitani učinci uspostavljanja središnjih neuropatoloških zbivanja na probavni sustav, Qian i suradnici pokazali su da intracerebroventrikularna primjena oligomera  $A\beta_{1-42}$  koja se koristi kao netransgenični model AB-a (626,627) dovodi do disbioze, povećane propusnosti crijevne barijere, te smanjenog izražaja proteina tijesnih spojeva i neuronalnih biljega u kolonu, 4 tjedna nakon tretmana (628). Istraživači su postavili hipotezu da bi poremećaj crijevne homeostaze mogao biti posljedica ispada vagalnog kolinergičkog protuupalnog puta koji predstavlja jedan od važnih mehanizama kojim središnji živčani sustav kontrolira homeostazu probavnog sustava (629). Kako bi ispitali postavljenu hipotezu, istraživači su analizirali izražaj biljega upale i kolinergičke signalizacije u kolonu. Izražaj biljega proupalne naklonjenosti makrofaga (CD86) i glasničke ribonukleinske kiseline za proupalne citokine TNF- $\alpha$  i IL- $1\beta$ , i NF $\kappa$ B bili su povećani, a izražaj glasničke ribonukleinske kiseline za protuupalni citokin interleukin-10 (IL-10) te izražaj proteina ChAT bili su smanjeni (628). Zanimljivo, središnja primjena oligomera  $A\beta_{1-42}$  promijenila je aktivaciju amiloidogenih puteva u mozgu, ali i u kolonu gdje je povećanje izražaja fosforiliranog APP-a i PS-a 1 bilo još izraženije nego u središnjem živčanom sustavu (628). U svim drugim studijama u kojima su opisane promjene crijeva u netransgeničnim modelima izazvanim središnjom toksičnom noksom (intracerebroventrikularnom ili intrahipokampalnom infuzijom  $A\beta$ -a), istražen je isključivo učinak izazivanja središnjih neuropatoloških zbivanja na crijevni mikrobiom (630–632) uz izuzetak studije Xu i suradnika u kojoj su uz promjene crijevnog mikrobioma ispitane i promjene kratkolančanih masnih kiselina (633).

### **6.1.2.1. Patofiziološke promjene probavnog sustava u STZ-icv netransgeničnom štakorskom modelu Alzheimerove bolesti**

#### **6.1.2.1.1. Promjene redoks homeostaze u probavnom sustavu STZ-icv netransgeničnog štakorskog modela Alzheimerove bolesti**

U eksperimentima koji su provedeni u sklopu ove disertacije prvi su put istražene promjene probavnog sustava u STZ-icv netransgeničnom štakorskom modelu AB-a. U probavnom sustavu STZ-icv štakorskog modela AB-a opažene su promjene biljega redoks homeostaze koje upućuju na povećano oksidativno opterećenje tkiva (pojačana lipidna peroksidacija, smanjenje koncentracije niskomolekularnih tiola i proteinskih sulfhidrila, porast aktivnosti katalaze, te pad aktivnosti SOD-a)(Slika 3)(535), što je u skladu s promjenama u transgeničnim modelima AB-a (321). Zanimljivo, opažene promjene bile su regionalno specifične te su zahvaćale duodenum, ali ne i ileum (Slika 3), što je također u skladu s promjenama probavnog sustava u transgeničnim modelima gdje su promjene najjasnije izražene u proksimalnom dijelu probavne cijevi dok su distalno promjene vrlo suptilne (319,320). Promjene redoks sustava u crijevu STZ-icv mogle bi biti i vremenski specifične obzirom da su u pokusu s kroničnim oralnim tretmanom otopinom D-galaktoze promjene u duodenumu 6 mjeseci starih štakora (3 mjeseca nakon STZ-icv) bile suptilnije (povećana lipidna peroksidacija, ali bez promjene koncentracije tiola niske molekularne težine i proteinskih sulfhidrila)(Slika 49). Priroda redoks dishomeostaze opisane *in vivo* istražena je detaljnije pomoću *ex vivo* sustava gdje je opaženo da tkivo duodenuma STZ-icv životinja (odabrano zbog najizraženijih redoks promjena) uz niži bazalni reduktivni kapacitet nema niti mogućnost aktivacije kompenzacijskih mehanizama nukleofilnog kraka redoks homeostaze (kao što je to slučaj kod kontrolnih tkiva koja na oksidativni okoliš (AAPH i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) odgovaraju povećanjem reduktivnog kapaciteta)(Slika 5). Sličan obrazac opažen je i prilikom proučavanja odgovora SOD-a na oksidativni okoliš: tkivo STZ-icv imalo je povišene bazalne vrijednosti aktivnosti SOD-a u usporedbi s kontrolom (podjednako na račun citoplazmatske i mitohondrijske frakcije), a u oksidativnom okolišu tkivo STZ-icv reagiralo je padom kapaciteta SOD-a što je obrnuto od kontrolnih uzoraka u kojima je kapacitet kompenzatorno povišen (Slika 6). Isto je pokazano i prilikom analize kapaciteta peroksidacije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: u kontrolnim uzorcima u oksidativnom okolišu kapacitet disocijacije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bio je adaptivno povećan, a u uzorcima STZ-icv adaptivno povećanje bilo je tek neznatno. Opaženi učinak vjerojatno je primarno bio posredovan gubitkom adaptivne sposobnosti aktivnosti katalaza s obzirom da se aktivnost peroksidaza nije znatno razlikovala između

kontrolnih i STZ-icv uzoraka (osim pri inkubaciji s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Kao i kod drugih promjena gubitak adaptivnog odgovora bio je spregnut s povećanim bazalnim vrijednostima u STZ-icv uzorcima (Slika 7). Navedene promjene *ex vivo* ukazale su da bi narušena redoks homeostaza u duodenumu STZ-icv modela AB-a *in vivo* mogla biti vezana uz povećano bazalno opterećenje nukleofilnog kraka redoks homeostaze uz nedostatak mogućnosti daljnjeg povećanja tonusa u slučaju dodatnog elektrofilnog opterećenja (primjerice izazvanog upalom, intraluminalnim mikroorganizmima, ili toksinima). Analiza broja i površine odumrlih stanica tijekom oksidativnog opterećenja govorila je u prilog umjerenog funkcionalnog patofiziološkog opterećenja obzirom da unatoč manjku adaptivne sposobnosti redoks sustava nije došlo do odumiranja znatnog broja stanica tijekom 30 minuta umjerenog oksidativnog opterećenja (Slika 8). U kontekstu *in vivo* promjena potonje bi moglo značiti da podvrgavanje STZ-icv životinja noksi (pogotovo ukoliko se radi o oralnom tretmanu štetnim agensom pa je tkivo gornjeg probavnog sustava neposredno izloženo) neće dovesti do gubitka funkcije ili odumiranja crijeva, ali bi moglo uz relativno blagi izazov rezultirati sustavnom redoks dishomeostazom uz znakove oksidativnog stresa. Navedeno je u skladu s nekim opažanjima vezanim uz redoks homeostazu probavnog sustava u transgeničnim modelima AB-a. Primjerice, u APP/PS1 transgeničnom modelu AB-a nema izražene razlike izražaja GSH peroksidaze u crijevu u usporedbi s kontrolnim životinjama, međutim, prilikom izlaganja životinja izvoru stresa (u ovom slučaju to je bila buka) transgenični su miševi odgovaraju većim padom izražaja enzima (321).

#### **6.1.2.1.2. Strukturalne promjene crijevne barijere u probavnom sustavu STZ-icv netransgeničnog štakorskog modela Alzheimerove bolesti**

Osim poremećaja redoks homeostaze, u probavnom sustavu STZ-icv štakorskog modela AB-a opažene su i strukturalne promjene crijevne barijere koje bi mogle biti povezane s povećanom propusnosti (534). U STZ-icv modelu opaženo je skraćivanje crijevnih resica te produbljivanje kriпти u duodenumu (Slika 10) što je istovjetno strukturalnim promjenama povezanim sa starenjem koje su povezane s narušenom apsorpcijom hranjivih stvari u proksimalnom dijelu probavne cijevi (593). Osim toga, skraćivanje resica združeno s produbljivanjem kriпти često je povezano s patofiziološkim procesima poput disbioze i oksidativnog stresa u različitim životinjskim modelima crijevne dishomeostaze (npr. oštećenje crijeva uzrokovano toplinskim stresom u pilića (634), prehranom bogatom solju (635) ili herbicidom širokog spektra

glifosatom (636) u štakora). Skraćivanje resica opisano u STZ-icv modelu moglo bi odražavati nedostatnost regenerativnog kapaciteta kriпти da obnovi epitelni sloj koji se pojačano oštećuje s obzirom da je kontrakcija resica opisana kao važan mehanizam zaštite ogoljene bazalne membrane od izlaganja intraluminalnom sadržaju tijekom procesa re-epitelizacije (637,638). Strukturalne promjene u STZ-icv štakora odgovaraju onima opisanima u 3xTg transgeničnom mišjem modelu AB-a uz iznimku duljine resica koje su u STZ-icv bile skraćene dok su Al-Nakkash i suradnici u transgeničnom modelu opisali produljenje (323). S obzirom na literaturne navode i druge strukturalne karakteristike probavne stijenke u 3xTg, produljenje resica moglo bi odražavati slučajni nalaz, biološki fenomen specifičan za 3xTg transgenični model, ili pak procjenu neopažene sustavne pogreške (npr. ukoliko su 3xTg miševi konzumirali više hrane što može rezultirati poticanjem povećanja apsorptivne površine (639)). U slučaju da produljenje resica u 3xTg predstavlja stvarni biološki fenomen, isto bi moglo biti povezano s regulacijom apoptoze budući da je narušena struktura crijevne barijere u STZ-icv modelu bila povezana s utišavanjem CAS-a 3, dok je u 3xTg postojao suprotan obrazac povećanja izražaja CAS-a 3 (323). Makromorfološke promjene resica i kriпти u duodenumu STZ-icv štakora bile su povezane s promjenom morfologije epitelnih stanica vrška resica koje su u STZ-icv životinja bile niže i šire nego u kontrolnih. Opisane promjene u skladu su s postavljenom hipotezom oštećenja crijevne barijere u STZ-icv životinja budući da je proces skraćivanja resica koji se događa uslijed re-epitelizacije nakon ozljede združen sa širenjem preostalih epitelnih stanica kako bi se povećala učinkovitost pokrivanja ogoljele bazalne membrane tijekom gubitka epitela (638).

Strukturalne promjene u STZ-icv modelu bile su združene sa smanjenim izražajem i aktivacijom CAS-a 3 u epitelnim stanicama duodenuma (Slika 10). CAS-3 jedna je od ključnih cistein-aspartatnih proteaza uključenih u regulaciju programirane smrti stanice – apoptoze, a smanjen izražaj neaktivnog zimogena CAS-a 3 od 30 kDa te njegovog cijepanja na 17 kDa aktivni fragment, upućuje na supresiju apoptoze u duodenumu STZ-icv modela AB-a (Slika 10, Slika 20). U regulaciju obrtaja epitelnih stanica u probavnom sustavu uključeno je nekoliko dominantnih signalizacijskih puteva povezanih s usmjeravanjem protokola staničnog odumiranja (640). Apoptoza i anoikis dva su najvažnija tipa programirane stanične smrti u crijevu koji su uključeni u regulaciju uklanjanja odumirućih stanica bez poticanja upalnog odgovora. Suprotno, odumiranje stanica postupkom piroptoze i nekroptoze združeno je sa snažnom aktivacijom upalnog odgovora (640). Piroptoza je često potaknuta tijekom aktivacije inflammosoma koju izazivaju neki patogeni, a nekroptoza nastupa uslijed aktivacije

programirane smrti stanica u slučaju kad kaspazna kaskada zakaže zbog izostanka aktivacije efektorskih cistein-aspartatnih proteaza (640). Navedeno je posebno važno u epitelnim stanicama probavnog sustava gdje apoptoza i anoikis omogućavaju očuvanje integriteta crijevne barijere tijekom odumiranja stanica (koje je u probavnom sustavu posebno naglašeno zbog izrazitog obrtaja stanica epitela), dok piroptoza i nekroptoza omogućavaju sadržaju enterocita, patogenima i molekulama koje potiču upalu da stimuliraju aktivaciju upalnog odgovora u susjednom tkivu (640).

Iako apoptoza te izražaj i aktivacija CAS-a 3 dosad nisu istraženi u probavnom sustavu STZ-icv štakorskog modela AB-a, Noda i suradnici opisali su supresiju apoptoze združenu sa smanjenom aktivacijom CAS-a 3 u štakorskom modelu šećerne bolesti izazvane intravenskom primjenom STZ-a (641). Zanimljivo, u modelu šećerne bolesti, utišanje signala CAS-a 3 u crijevu uzrokovalo je hiperplaziju sluznice što je suprotno od strukturalnih promjena opaženih u STZ-icv modelu AB-a (Slika 20). Jedno od mogućih objašnjenja izostanka hiperplazije sluznice uz smanjenu aktivaciju apoptoze je aktivacija alternativnih puteva stanične smrti u STZ-icv štakorskom modelu AB-a. Ukoliko iz nekog razloga u epitelnim stanicama STZ-icv nije moglo doći do aktivacije efektorskih kaspaza, ili je došlo do aktivacije inflamosoma, skraćivanje resica moglo bi odražavati aktivaciju piroptoze ili nekroptoze. Navedena hipoteza u skladu je s opaženim poremećajem redoks homeostaze, pojačanim bazalnim elektrofilnim opterećenjem, te smanjenim kapacitetom nukleofilne zalihe, obzirom da je samoodrživi proces upale povezan s oksidativnim stresom (642–644).

Jedno od pitanja koje se nameće je postoji li jednaki poremećaj regulacije smrti stanica u svim podtipovima crijevnih epitelih stanica. Primjerice, poremećaj stanične smrti vrčastih stanica mogao bi imati štetne posljedice za crijevnu barijeru radi utjecaja na stvaranje probavne sluzi (645). Ukoliko poremećaj regulacije stanične smrti zahvaća populaciju neuroendokrinih stanica, to bi moglo objasniti smanjenje koncentracije GLP-a 1 u plazmi u STZ-icv modelu AB-a 3 mjeseca nakon tretmana (376). Alternativno, STZ bi mogao utjecati na populaciju neuroendokrinih stanica i drugim mehanizmom obzirom da su u životinjskim modelima u kojima se STZ primjenjuje periferno opisani toksični učinci usmjereni na ovu populaciju stanica crijevnog epitela (646).

### **6.1.2.1.3. Poremećaj homeostaze vrčastih stanica i probavne sluzi u STZ-icv netransgeničnom štakorskom modelu Alzheimerove bolesti**

Detaljnijom analizom strukture i brojnosti podtipova stanica probavnog epitela u STZ-icv štakorskom modelu AB-a ustanovljeno je da je broj vrčastih stanica (određen posredno na temelju broja alcijanofilnih mjehurića) po jedinici epitelne površine uvećan u usporedbi s kontrolnim životinjama (Slika 11). Veći broj alcijanofilnih mjehurića u epitelnim stanicama sluznice probavnog sustava STZ-icv modela AB-a mogao bi odražavati povećani broj vrčastih stanica, njihovo smanjeno odumiranje, ili poremećaj u procesu izbacivanja sluzi. Nakupljanje zbog povećanog nastajanja vrčastih stanica moglo bi biti posljedica: i) povećanog broja nastanka svih epitelnih stanica u kriptama kao odgovor na uvećanu potrebu za svim tipovima stanica zbog potrebe zaštite ogoljene bazalne membrane (odraženo u morfometrijskim promjenama epitela vrška resica) ili ii) povećanog podražaja za stvaranje specifično vrčastih stanica kako bi se osiguravanjem dostatne sluzne barijere zaštitila ranjiva ogoljena bazalna membrana. Alternativno, povećani broj vrčastih stanica mogao bi biti posljedica njihovog smanjenog odumiranja što bi pak moglo biti posljedica utišane smrti stanica apoptozom (odraženo smanjenjem izražaja i aktivacije CAS-a 3 (Slika 20)), pod uvjetom da stanice ne odumiru drugim mehanizmom (što nije izgledno obzirom da je zbog skraćivanja resica razvidno ukupno smanjenje, a ne povećanje broja stanica sluznice). Treća mogućnost je da povećani broj alcijanofilnih mjehurića uopće ne predstavlja veći broj vrčastih stanica već njihovu nemogućnost da ispuste mjehuriće probavne sluzi u lumen i tako osiguraju stvaranje zaštitne sluzne barijere. Detaljnijom morfometrijskom analizom položaja alcijanofilnih mjehurića unutar stanica probavnog epitela utvrđeno je da je treća hipoteza najizglednija s obzirom da su u epitelnim stanicama STZ-icv životinja mjehurići bili položeni dublje (tj. dalje od luminalne površine stanica) te da je manji broj mjehurića u trenutku fiksacije aktivno izbacivao sluz u lumen (mješoviti logistički model izbacivanja sluzi pokazao je da je vjerojatnost ekspulzije alcijanofilnih mjehurića kontrolnih životinja bila 82% dok je u STZ-icv iznosila 63% (Slika 11)). U vrčastim stanicama crijeva, egzocitoza sluzi regulirana je signalnim mehanizmima koji kontroliraju unutarstaničnu koncentraciju  $Ca^{2+}$ , a jedan od najpoznatijih i najbolje istraženih sekretagoga probavne sluzi je ACh koji se u fiziološkim uvjetima otpušta iz živčanih završetaka submukoznog plexusa nakon čega brzo i snažno potiče otpuštanje probavne sluzi u lumen (645,647). Kako bi se testiralo postoji li poremećaj mehanizma lučenja sluzi iz vrčastih stanica crijeva STZ-icv životinja, izolirani duodenalni prstenovi inkubirani su *ex vivo* s 20  $\mu$ M ACh-a (ili 20  $\mu$ M CCh-a) s ciljem poticanja oslobađanja sluzi. Rezultati *ex*



*vivo* pokusa potvrdili su hipotezu narušenog oslobađanja sluzi obzirom da vrčaste stanice duodenuma izolirane iz STZ-icv životinja nisu na stimulaciju pomoću sekretagoga ACh-a niti CCh-a odgovorile izlučivanjem kao što je to bio slučaj u kontrolnim prstenovima (Slika 12). Specifičnost opaženog mehanizma u kontrolnih životinja potvrđena je ko-inkubacijom s ATR-om čime je dokazano da je izlučivanje posredovano muskarinskim receptorima što je u skladu sa standardnim modelom izlučivanja sluzi iz vrčastih stanica u kojem je učinak sekretagoga primarno združen s vezanjem za M3 muskarinske receptore (645). Zanimljivo, ko-inkubacija s kolinergičkim agonistom i ATR-om u STZ-icv prstenovima dovela je do paradoksalnog blagog povećanja izlučivanja sluzi što bi moglo poslužiti za daljnje razumijevanje mehanizma disfunkcije vrčastih stanica u STZ-icv štakorskom modelu AB-a. Osim paradoksalnog povećanja lučenja uz ko-inkubaciju s muskarinskim antagonistom, vrčaste stanice STZ-icv bile su malo osjetljivije na učinak CCh-a nego ACh-a (sa i bez ATR-a) što bi moglo upućivati na povećanu razgradnju ACh-a u crijevu STZ-icv životinja obzirom da je CCh otporan na hidrolizu posredovanu acetilkolinesterazom.

Obzirom da su vrčaste stanice zadužene za održavanje strukture i funkcije zaštitnog sloja sluzi, poremećaj mehanizma lučenja i neosjetljivost na kolinergičku stimulaciju mogli bi nepovoljno utjecati na kvalitativni i kvantitativni sastav sluzi i narušiti njenu zaštitnu ulogu (645,647,648). Analiza spektra probavne sluzi ukazala je na izmijenjeni sastav te razrijeđenje u STZ-icv životinja (Slika 14). Detaljnom spektralnom analizom uočeni su obrasci koji bi mogli uputiti na razlike u sastavu sluzi te pomoći razjasniti narušenu funkcije crijevne barijere u STZ-icv štakorskom modelu AB-a. Primjerice, regija UV spektra u STZ-icv sluzi bila je obrnuto proporcionalna vršku pri 400 nm (koji bi mogao upućivati na prisutnost tetrapirrolne molekule poput bilirubina) što bi moglo značiti da se radi o promjenama u biokemijskim putevima uključenim u stvaranje žuči, a novi dokazi upućuju da bi promjene u putevima sinteze žuči mogle biti povezane s AB-om (649–652). Sluz izolirana iz probavnog sustava STZ-icv životinja imala je smanjen kapacitet vezanja alcijanskog modrila (što upućuje na smanjenu koncentraciju glikoproteina), a na testovima lubrikacije pokazala je slabija lubrikacijska svojstva (važno svojstvo probavne sluzi koje štiti sluznicu od mehaničkog stresa (653)) (Slika 14). Obzirom na promijenjena svojstva sluzi te ranije opažene promjene redoks homeostaze probavnog sustava, izmjereni su biljezi oksidativnog stresa i reduktivnog kapaciteta. Zanimljivo, analiza tri biljega reduktivnog kapaciteta pružila je tri različita uvida u redoks ravnotežu: ORP je pokazao reduktivniji okoliš u STZ-icv sluzi, NRP je pokazao obrnuto, a analiza pomoću metastabilnog ABTS radikal-kationa nije pokazala razlike u ukupnom

kapacitetu između skupina. Opaženi rezultati vjerojatno odražavaju ranije navedenu razliku u osjetljivosti na pojedine medijatore redoks homeostaze. Kako bi se potvrdilo da u sluzi doista nema značajno narušene redoks homeostaze izmjerena je koncentracija proizvoda peroksidacije lipida (koji načelno nastaju u trenutku kad kompenzacijski mehanizmi redoks sustava zakažu te kad nastupi stanje oksidativnog stresa) koja je ukazala na izostanak važnih promjena redoks sustava u probavnoj sluzi (Slika 14). S obzirom da je potvrđeno postojanje redoks promjena u tkivu probavnog sustava, ovi bi rezultati mogli upućivati na endogeni čimbenik pogreške koji bi mogao interferirati s biokemijskim mjerenjima (primjerice pH)(vjerojatnije) ili pak činjenicu da probavna sluz ne odražava vjerno stanje redoks sustava tkiva (manje vjerojatno, ali neistraženo). Postoje neke naznake biokemijske interferencije i na razini gustoće sluzi. Primjerice, NRP je pokazao smanjenje reduktivnog kapaciteta sluzi u STZ-icv životinja (-30% u odnosu na kontrolu;  $p=0,014$ ), međutim, promjena je smanjena za gotovo trećinu kad je apsorbancija čitavog spektra (mjera razrjeđenja) uvedena u model kao kovarijata (-22% u odnosu na kontrolu;  $p=0,089$ ).

Narušen kvalitativni i kvantitativni sastav probavne sluzi mogao bi narušiti sposobnost probavne sluzi da stvori funkcionalnu barijeru i zaštiti sluznicu od izravne izloženosti intraluminalnim mikroorganizmima i toksinima (611). U *in vitro* testovima, sluz izdvojena iz probavnog sustava STZ-icv štakorskog modela AB pokazala je smanjeno spontano stvaranje proteinskih agregata (vjerojatno kao posljedica razrjeđenja, smanjenog sadržaja alcijanofilnih glikoproteina te povećanog pH) što je bilo povezano s narušenim kapacitetom za vezanje akridinofilnih čestica (Slika 15). Iako *in vitro* rekonstitucija sluzi vjerojatno samo djelomično odražava njena svojstva *in vivo*, rezultati pokusa upućuju na moguće narušeno stvaranje funkcionalne zaštitne sluzne barijere u probavnom sustavu STZ-icv štakora.

Dinamičke promjene intraluminalnog okoliša utječu na funkciju probavne sluzi mijenjanjem njenih strukturalnih svojstava. Intraluminalna koncentracija iona i pH reguliraju propusnost sloja probavne sluzi te tako utječu na propuštanje hranjivih tvari i mikroorganizama (611). Niske vrijednosti pH potiču stvaranje agregata te stimuliraju stvaranje funkcionalne zaštitne barijere koja sprječava transmigraciju bakterija. Primjerice, Sharma i suradnici pokazali su da je formiranje agregata u ekstraktu svinjske probavne sluzi spriječeno ukoliko se pH povisi s 4 na 7 (611). Osim toga, transmigracija *Escherichije coli* i *Salmonelle enterice* u rekonstituiranoj sluzi bila je značajno umanjena kad je pH bio snižen sa 7 na 4 ili niže (611). Sluz izdvojena iz probavnog sustava životinja tretiranih STZ-icv imala je znatno viši pH u usporedbi s kontrolnom sluzi što bi moglo objasniti smanjeni kapacitet agregacije alcijanofilne tvari i

smanjeni kapacitet vezanja akridinofilnih čestica (npr. mikroorganizama)(Slika 15). Povećani pH probavne sluzi STZ-icv životinja mogao bi biti i endogeni čimbenik pogreške koji je utjecao na mjerenja lubrikacijskih i spektralnih svojstava te biokemijske testove redoks homeostaze.

Naposljetku, poremećaj izlučivanja, kvalitativne i kvantitativne promjene komponenti probavne sluzi i čimbenika koji utječu na kapacitet formiranja funkcionalne barijere za mikroorganizme (npr. pH) mogli bi utjecati i na poroznost i molekularnu propusnost sluzne barijere. Posljedično, probavna sluznica STZ-icv štakorskog modela AB-a mogla bi biti izložena većoj koncentraciji intraluminalnih toksina, mikroorganizama i lijekova (654–656). Rezultati *in vitro* pokusa, dizajniranog s ciljem procjene sposobnosti rekonstituirane sluzi da spriječi difuziju tvari, sugeriraju da STZ-icv sluz doista ima smanjeni kapacitet da veže i/ili spriječi difuziju malih molekula (Slika 16). Iako dobivene rezultate treba tumačiti kritički i s dozom opreza u kontekstu translacije opažanja na ostale male molekule (obzirom da je testiran jedino kofein kao standardni primjer male molekule zbog ograničene količine dostupne probavne sluzi), promijenjeni pH STZ-icv sluzi mogao bi rezultirati većom poroznošću zaštitne sluzne barijere. Potonje bi moglo imati važne posljedice ne samo u kontekstu patofiziologije oštećenja redoks homeostaze i funkcije sluznice, već i u kontekstu razumijevanja apsorpcije lijekova u STZ-icv štakorskom modelu AB-a. Primjerice, de Moraes i suradnici nedavno su opisali fenomen povećane apsorpcije tiamina u probavnom sustavu STZ-icv štakora za koji nisu uspjeli ponuditi objašnjenje (657), a koji bi mogao biti posljedica povećane molekularne propusnosti probavne sluzi.

#### **6.1.2.1.4. Poremećaj inkretinskog sustava osovine crijevo-mozak u STZ-icv netransgeničnom štakorskom modelu Alzheimerove bolesti**

Inkretini su prepoznati kao važni glasnici i posrednici dvosmjerne komunikacije putem osovine crijevo-mozak (619,658–660). Neuroprotektivni učinci inkretina istraženi su u transgeničnim (455,661–663) i netransgeničnim modelima AB-a (664–667), međutim, patofiziološka podloga poremećene regulacije GLP-a 1 u bolesnika i u životinjskih modela AB-a slabo je istražena. Na temelju prethodnih istraživanja čini se da promjene koncentracije GLP-a 1 u plazmi u STZ-icv štakorskom modelu AB-a imaju nelinearan tijek sa povećanjem aktivnog GLP-a 1 1 mjesec nakon STZ-icv tretmana (536)(iako u istom istraživanju nije došlo promjene u drugoj kohorti životinja, te rezultate treba tumačiti s oprezom), sniženjem aktivnog GLP-a 1 3 mjeseca nakon

STZ-icv tretmana (376) te izostankom promjene 6 mjeseci nakon STZ-icv (330). Izražaj GLP-1R-a u hipokampusu bio je nepromijenjen nakon 1 i 3 mjeseca (376), a nakon 6 mjeseci uočen je trend porasta (330). Osim bazalnih promjena, u dosadašnjim istraživanjima opisane su i promjene GLP-1 sustava koje upućuju na njegovu narušenu homeostazu u STZ-icv modelu AB-a na razini interakcije tretmana. Primjerice, 3 mjeseca nakon STZ-icv opažena je naglašena kvalitativna interakcija tretmana STZ-om i kroničnog oralnog tretmana otopinom D-galaktoze (200 mg/kg) na razini koncentracije aktivnog GLP-a 1 u plazmi (u kontrolnih životinja tretman D-galaktozom smanjio je koncentraciju aktivnog GLP-1 za 80%, a u STZ-icv modelu isti je tretman uzrokovao porast od 75%). Istovremeno, D-galaktoza nije dovela do povećanja izražaja GLP-1R-a u hipokampusu kontrolnih životinja, međutim, u STZ-icv skupini isti je tretman uzrokovao povećanje od 66% (376). Obrnuto, 6 mjeseci nakon uspostave STZ-icv modela, kronični oralni tretman D-galaktozom tijekom 2 mjeseca smanjio je izražaj GLP-1R-a u hipokampusu STZ-icv životinja, dok u kontrolnoj skupini nije bilo promjena (330).

U istraživanjima provedenim u sklopu ove disertacije prikupljeni su dodatni dokazi koji potvrđuju narušenu funkcije GLP-1 sustava u štakorskom modelu STZ-icv. S obzirom da je primarno mjesto izražaja GLP-a 1 probavni sustav, novi su podaci važni jer omogućavaju jasniji uvid u disregulaciju inkretinskog sustava ne samo na razini središnjeg živčanog sustava, već i na razini probavnog sustava te komunikacije između mozga i crijeva putem osovine crijevo-mozak. Istraživanjem posljedica akutnog utišavanja središnjih GLP-1R-a utvrđeno je da GLP-1 signalizacija u središnjem živčanom sustavu može ostvariti akutni učinak na redoks homeostazu u probavnom sustavu štakora, što dosad nije opisano u literaturi. U kontrolnih je štakora opaženo je da akutna inhibicija GLP-1R-a ostvarena intracerebroventrikularnom primjenom inhibitora povećava lipidnu peroksidaciju, snižava koncentraciju tiola niske molekularne mase i slobodnih sulfhidrilnih skupina proteina, povećava aktivnost katalaze te umanjuje aktivnost SOD-a (Slika 17). Od svih analiziranih biljega redoks homeostaze u duodenumu, jedini nepromijenjeni biljeg bio je ukupni reduktivni kapacitet izmjeren pomoću NRP metode (što u potpunosti odgovara učincima STZ-icv, budući da je to također jedini biljeg koji je bio nepromijenjen u duodenumu STZ-icv životinja). Zanimljivo, učinci akutne središnje inhibicije GLP-1R-a na redoks homeostazu u duodenumu bili su po smjeru promjena (i u većoj mjeri po veličini učinaka) istovjetni promjenama opaženim u STZ-icv životinja što bi moglo upućivati na: i) zajednički mehanizam kojim su putem osovine crijevo-mozak ostvareni učinci središnje inhibicije GLP-1 signalizacije i neurodegeneracije na homeostazu duodenuma; ili ii) poremećaj središnje signalizacije GLP-a 1 kao jedan od patofizioloških događaja tijekom

razvoja neurodegenerativnih promjena izazvanih STZ-icv tretmanom. Uz navedeno, opaženo je da istovjetni tretman središnjom primjenom inhibitora dovodi do suprotnih učinaka (lipidna peroksidacija, aktivnost katalaze) ili izostanka učinaka (tioli niske molekularne mase, slobodne sulfhidrilne skupine proteina, aktivnost SOD-a) u STZ-icv modelu AB-a, što govori u prilog narušenoj homeostazi GLP-1 sustava te poremećene komunikacije putem osovine crijevo mozak (Slika 17). U ileumu, gdje nisu opažene promjene u STZ-icv modelu, također je izostao i fenomen interakcije učinka STZ-a i GLP-1R inhibitora (npr. interakcija pri učinku na katalazu, čija je promjena aktivnosti bila jedini opaženi učinak na redoks homeostazu uz poticanje lipidne peroksidacije u kontrolnih životinja). Skupna analiza biljega redoks homeostaze pomoću kompozitnih vrijednosti dobivenih analizom glavnih komponenti također je ukazala na postojanje interakcije između STZ-icv tretmana i akutne inhibicije središnje GLP-1R signalizacije (Slika 18).

Iako se čini da učinci akutne središnje inhibicije GIP receptora na redoks homeostazu u probavnom sustavu nisu istovjetni učincima ostvarenim inhibicijom GLP-1R-a, postoji izražena interakcija tretmana STZ-icv i središnje farmakološke inhibicije GIP signalizacije na nekoliko drugih patofizioloških promjena u probavnom sustavu, što govori u prilog hipotezi da poremećaj osovine crijevo-mozak u STZ-icv ne uključuje samo GLP-1. Primjerice, akutna središnja primjena GIP inhibitora uzrokovala je naglašene makroskopske morfometrijske promjene strukture crijevnih resica i kripti u STZ-icv životinja dok je u kontrolnih životinja reakcija izostala (Slika 19). Obrnuto, na razini strukture pojedinih epitelnih stanica vrška duodenalnih resica, akutna je inhibicija ostvarila snažan učinak u kontrolnih životinja, dok je učinak u STZ-icv bio znatno manje izražen (Slika 19). Tijekom analize izražaja CAS-a 3 opažen je izostanak interakcije pri učinku središnje inhibicije na izražaj inaktivnog zimogena (30 kDa), te kvantitativna interakcija kod učinka na aktivaciju CAS-a 3 (17 kDa fragment) što upućuje da bi akutni učinci na strukturu crijevne barijere i apoptozu mogli biti posredovani drugim mehanizmima od kojih su oni koji posreduju učinak na strukturu više izmijenjeni u STZ-icv modelu AB (Slika 20). Obzirom da učinci središnjih inkretinskih receptora dosad nisu istraženi u kontekstu regulacije programirane smrti stanica probavnog sustava niti strukture crijevne barijere, uz otkrivanje poremećene regulacije u STZ-icv modelu, navedeni pokusi ponudili su prve dokaze o postojanju fiziološke uloge inkretina u središnjem živčanom sustavu u regulaciji crijevne barijere koji do sad nisu opisani u literaturi.

Učinci izmijenjene inkretinske osovine crijevo-mozak istraženi su i na razini lokalnih posrednika inkretinske signalizacije. Primjerice, u duodenumu nisu pronađeni dokazi o

postojanju učinka središnje inhibicije na izražaj GLP-1R, međutim, opažena je interakcija tretmana STZ-icv te središnje primjene GLP-1 antagonista na izražaj receptora u periduodenalnom masnom tkivu (Slika 22). Zanimljivo, učinci središnje inhibicije GLP-1R-a bili su otkriveni u uvjetima prisutnosti nutrijenata (D-galaktoze) u probavnom sustavu, ali interakcija tretmana STZ-icv i središnje inhibicije GLP-1 signalizacije ponovno je izostala (Slika 24), što sugerira da opažena promjena inkretinskog sustava osovine crijevo-mozak u STZ-icv modelu nije strogo vezana uz inkretinsku signalizaciju već uključuje posredne mehanizme. U periduodenalnom masnom tkivu interakcija je uočena i u uvjetima prisutnosti intraluminalnih hranjivih tvari (D-galaktoze) što je potvrdilo postojanje promijenjenog inkretinskog sustava na razini adipocita u STZ-icv modelu AB-a. Važnost i značaj promjene izražaja GLP-1R-a u masnom tkivu STZ-icv modela AB-a tek trebaju biti istraženi, međutim, čini se kako GLP-1 signalizacija igra važnu ulogu u regulaciji sustavne inzulinske osjetljivosti i metabolizma (668) što bi mogao biti slučaj i u kontekstu patogeneze promjena izazvanih primjenom STZ-a. Osim na razini crijevnih resica, GLP-1R ispitan je i na razini kripti gdje imunofluorescencijska kvantifikacija upućuje na sniženi izražaj u STZ-icv modelu AB-a (Slika 25). U ovom trenutku nije jasno postoji li povezanost izražaja GLP-1R-a s morfološkim promjenama resica i kripti opisanim u STZ-icv modelu.

Osim na razini izražaja receptora, GLP-1 signalizacija ispitana je i na razini drugog glasnika GLP-1R-a – cAMP-a (669,670). U duodenumu, koncentracija cAMP-a bila je neznatno snižena u STZ-icv životinja, a središnja inhibicija GLP-1R-a prosječno je dodatno smanjila koncentraciju drugog glasnika za 15% (Slika 26). Iako se opisano zapažanje treba tumačiti s oprezom budući da je cAMP vrlo nespecifičan drugi glasnik uključen u protok informacija ne samo brojnih drugih signalizacijskih kaskada osim one potaknute GLP-1R-om (671–678), već i signalizacije u prokariotima (679), obrazac promjena cAMP-a nalik je promjenama GLP-1R-a otkrivenima u uvjetima prisutnosti intraluminalnih nutrijenata što bi moglo upućivati na to da je, unatoč nepromijenjenom izražaju GLP-1R-a, u STZ-icv duodenumu poremećena nizvodna inkretinska signalizacija. U ileumu je opažen obrnuti obrazac koji potvrđuje regionalnu specifičnost opisanih promjena.

Naposljetku, izmjerene su koncentracije GLP-a 1 u plazmi i cerebrospinalnom likvoru 1 mjesec nakon STZ-icv sa i bez intraluminalne prisutnosti nutrijenata (D-galaktoze) (Slika 27). Kod bazalnih vrijednosti ukupnog GLP-a 1 uočena je tendencija pada kod središnje inhibicije GLP-1R-a u kontroli, a porasta kod istog tretmana u STZ-icv skupini, ali zbog velikog biološkog rasapa nisu uočene naglašene promjene. S druge strane, koncentracija aktivnog GLP-a 1 bila

je povećana u STZ-icv skupini. Središnja primjena inhibitora nije ostvarila učinak u kontrolnih životinja, ali snizila je koncentraciju u STZ-icv skupini. Za razliku od plazme, GLP-1 u cerebrospinalnom likvoru nije pokazao obrazac interakcije tretmana. Vrijednosti aktivnog GLP-a 1 u plazmi u kontekstu ranije opisanih promjena pružaju dodatne dokaze poremećene signalizacije GLP-a 1 u tkivu STZ-icv modela AB-a obzirom da nema naznaka da je povećana koncentracija aktivnog GLP-a 1 bila povezana s učinkom na razini izražaja inkretinskih receptora niti s koncentracijom cAMP-a. U slučaju intraluminalne prisutnosti nutrijenata, središnja inhibicija GLP-1R-a rezultirala je povećanim odgovorom lučenja GLP-a 1 što bi moglo govoriti u prilog postojanja negativne povratne sprege GLP-a 1 putem osovine crijevo-mozak. U STZ-icv životinja, središnja inhibicija nije utjecala na lučenje GLP-a 1 što govori u prilog ispada dvosmjerne komunikacije osovinom crijevo-mozak inkretinima u STZ-icv modelu AB-a (Slika 27).

## **6.2. Patofiziološke promjene probavnog sustava u modelima Parkinsonove bolesti**

### **6.2.1. Patofiziološke promjene probavnog sustava u transgeničnim modelima Parkinsonove bolesti**

Za razliku od poremećaja probavnog sustava u AB-u, koji se tek posljednjih godina počeo istraživati u životinjskim modelima, patofiziološke promjene probavnog sustava u životinjskim modelima PB-a detaljno su opisane (680,681). Štoviše, obzirom da je poremećaj funkcije probavnog sustava prepoznat kao rani, učestao, i ozbiljan problem u bolesnika, različiti životinjski modeli PB-a koriste se ciljano za ispitivanje pojedinih patofizioloških procesa probavnog sustava (680–682). U transgeničnih miševa, u kojih je humani  $\alpha$ -sinuklein izražen pod kontrolom Thy1 promotora, javljaju se poremećaji motiliteta kolona poput: povećanog zadržavanja fecesa (i kuglica za mjerenje potiskivanja) u kolonu, smanjene produkcije fecesa u poznatom okolišu te povećanog stvaranja fecesa u nepoznatom okolišu (683). Prilikom izražaja mutiranog humanog  $\alpha$ -sinukleina, opaženi su naglašeni poremećaji funkcije probavnog sustava. Primjerice, prilikom izražaja humanog  $\alpha$ -sinukleina uz mutacije A53T ili A30P, a bez izražaja mišjeg sinukleina, dolazi do snažnog izražaja mutiranog sinukleina u kolonu koji je združen sa znatnim produljenjem vremena prolaska fecesa kroz sve segmente probavnog sustava (684). Zanimljivo, u navedenom modelu, opisane funkcionalne promjene

te nakupljanje sinukleina u ganglijima crijevnog živčanog sustava, prethodili su promjenama u središnjem živčanom sustavu te je predloženo da bi navedeni model mogao biti koristan za proučavanje patofiziologije nastanka ranih znakova bolesti u probavnom sustavu (684). Druga istraživanja komplementarnim su pristupom potvrdila da u transgeničnih modela probavni sustav doista ranije pokazuje znakove toksičnosti i agregacije  $\alpha$ -sinukleina. Primjerice, pomoću osjetljivog cikličkog pokusa za pogrešno smotavanje proteina potvrđeno je da je moguće detektirati prisutnost fenomena zasijavanja i agregacije  $\alpha$ -sinukleina A53T u kolonu transgeničnih miševa u presimptomatskoj fazi bolesti u trenutku kad je istovjetan fenomen jasno odsutan u središnjem živčanom sustavu (685).

Zanimljivo, u transgeničnim modelima PB-a, rani poremećaji probavnog sustava mogli bi biti posljedica neurodegenerativnih promjena vagusa. Primjerice, u transgeničnom modelu PB-a, s izražajem A53T  $\alpha$ -sinukleina, snižavanje koncentracije grelina u krvi povezano s ranim poremećajem funkcije probavnog sustava događa se nakon neuropatoloških promjena i sniženja izražaja kolin-acetiltransferaze u dorzalnoj motoričkoj jezgri vagusa (686). Osim poremećaja motiliteta, u transgeničnim modelima PB-a opisani su i poremećaji crijevne barijere, neurodegenerativne promjene te upala probavnog sustava. U A53T transgeničnom modelu PB-a, snižena je razina proteina tijesnih spojeva (okludina i zonulina) i razina biljega za dopaminergičke neurone (tirozin-hidroksilaza) u kolonu, dok su izražaj inducibilne sintaze dušikovog oksida i biljega upale TNF- $\alpha$  povećani (687). Uz navedene proteine, eksplorativnom analizom mijenteričkog pleksusa tankog i debelog crijeva u presimptomatskih A30P miševa, otkriveni su dodatni biljezi ranih promjena probavnog sustava koji bi mogli pomoći razjasniti patofiziološke procese uključene u nastanak bolesti (688). Masena spektroskopija proteina mijenteričkog pleksusa presimptomatskih A30P pokazala je da su promjene izražaja Nefl-a, Vamp-a 2, i Calb-a 2 te njihovih regulatornih mikro-ribonukleinskih kiselina važni rani patofiziološki događaji u crijevu transgeničnog modela PB-a, što bi moglo upućivati na procese slaganja citoskeleta, oksidativni stres, degradaciju proteina ubikvitin-proteasomskim sustavom, sinaptičku transmisiju te homeostazu kalcija kao ključne elemente ranih poremećaja funkcije crijeva (688).

### **6.2.2. Patofiziološke promjene probavnog sustava u netransgeničnim modelima Parkinsonove bolesti**

Patofiziološke promjene probavnog sustava ispitane su u nizu netransgeničnih modela PB-a. Najčešći životinjski model PB-a zasniva se na sustavnoj dostavi selektivnog dopaminergičkog



toksina MPTP-a na koji središnji dopaminergički neuroni pokazuju posebnu osjetljivost (689–694). Nakon sustavne primjene, MPTP uzrokuje oštećenje crijevnih dopaminergičkih neurona povezano s padom koncentracije crijevnog dopamina te sniženje izražaja dopaminskog transportera i tirozin-hidroksilaze u submukoznom i mijenteričkom pleksusu (680,681,695–697). Za razliku od učinka na inhibitorne dopaminergičke puteve u probavnom sustavu, primjena MPTP-a ne mijenja izražaj biljega nitrergičke i VIP-ergičke inhibitorne, niti kolinergičke (ekscitatorne) signalizacije (695,697). Oštećenje dopaminergičkih neurona crijevnog živčanog sustava (i smanjenje dopamina u probavnom sustavu) povezano je s prolaznim povećanjem motiliteta kolona (680). Na temelju podataka iz literature, prokinetički obrazac motiliteta logična je posljedica deplecije dopamina u crijevnom živčanom sustavu. Primjerice, dopaminergički antagonisti imaju poznati prokinetički učinak (698,699), a dopaminergički lijekovi smanjuju motilitet probavnog sustava (680). Osim toga, transgenični miševi s manjkom D<sub>2</sub> receptora ili vezikularnog transportera za monoamine (VMAT; *engl. vesicular monoamine transporter*) pokazuju prokinetički obrazac motiliteta probavnog sustava (700,701). Na temelju navedenog, promjene probavnog sustava u MPTP modelu vjerojatno ne odražavaju vjerno patofiziološke promjene u ljudi oboljelih od PB-a u kojih: i) klasični obrazac motoričke disfunkcije probavnog sustava odgovara smanjenju motiliteta i usporenju prolaska intraluminalnog sadržaja; ii) nema jasnih podataka o smanjenom broju dopaminergičkih neurona u enteričkom živčanom sustavu (681).

Netransgenični modeli PB-a koji se zasnivaju na središnjoj primjeni neurotoksina 6-OHDA-a pokazuju drugačije rezultate koji bi mogli vjernije oponašati patofiziološke događaje prisutne u oboljelih u ranoj fazi bolesti (680). U usporedbi s MPTP modelom PB-a (u kojem nije pronađen poremećaj motiliteta tankog crijeva (695)), u 6-OHDA modelu opisano je usporenje prolaza intraluminalnog sadržaja u distalnom tankom crijevu (702) što odgovara obrascu dismotiliteta u bolesnika s PB-om (681). U tankom crijevu u 6-OHDA modelu PB-a, razina biljega dopaminergičkog sustava promijenjena je u suprotnom smjeru nego što je slučaj u MPTP modelu – izražaj tirozin-hidroksilaze i transportera za dopamin povećan je u usporedbi s kontrolnim životinjama (696). U tankom crijevu 6-OHDA modela opisan je poremećaj inhibitornih puteva crijevnog živčanog sustava sa smanjenim izražajem neuronalne sintaze dušikovog oksida uz povećanje broja neurona koji izražavaju vazoaktivni intestinalni polipeptid (VIP; *engl. vasoactive intestinal polypeptide*) u mijenteričkom pleksusu u distalnom ileumu (703) te s povećanjem izražaja neuronalne sintaze dušikovog oksida u duodenumu (704). Uz opisane promjene, u distalnom ileumu nisu opisane promjene broja kolinergičkih

neurona, dok je on u duodenumu bio smanjen (703,705). U kolonu 6-OHDA modela PB-a također je opisan poremećaj motiliteta s odgodom propulzije intraluminalnom sadržaja i smanjenom frekvencijom defekacije (704,706), što bi moglo biti povezano sa smanjenom učinkovitosti propulzivnih valova i peristaltičkih refleksa (703). Uz promjene motiliteta kolona, u 6-OHDA modelu opisane su i promjene inhibitornih i ekscitatornih puteva. U proksimalnom kolonu 6-OHDA modela opisan je porast broja VIP-ergičkih i dopaminergičkih, te smanjenje broja nitrergičkih neurona (703,704,707). Na poremećaj nitrergičkih puteva upućuje i smanjenje izražaja neuronalne sintaze dušikovog (II) oksida u kolonu 6-OHDA štakora (704). Broj D<sub>2</sub> receptora na dopaminergičkim i kolinergičkim neuronima mijenteričkog plexusa bio je smanjen (703), a koncentracija tirozin-hidroksilaze, dopaminskog transportera, i dopamina u kolonu 6-OHDA modela bila je povećana u usporedbi s kontrolom (696,704,708,709). U usporedbi s konzistentnim promjenama inhibitornih puteva u probavnom sustavu 6-OHDA modela PB-a, promjene ekscitatorne signalizacije karakterizira nedosljednost. U nekim studijama nije bilo razlika u broju ChAT pozitivnih neurona, kao ni u izražaju gena i proteina za ChAT između 6-OHDA i kontrolnih životinja (703,704). Suprotno, u istraživanju Fornaia i suradnika, opisano je smanjenje izražaja ChAT-a u distalnom kolonu 6-OHDA životinja i smanjeno otpuštanje ACh-a te povećanje izražaja M<sub>2</sub> i M<sub>3</sub> u neuromuskularnom sloju i izoliranim glatkim mišićnim stanicama (706).

Promjene probavnog sustava opisane su i u netransgeničnom modelu PB-a koji se zasniva na kroničnom otpuštanju izoflavonskog insekticida rotenona pomoću osmotskih pumpi (710). U štakora tretiranih rotenonom opaženo je odgođeno pražnjenje želuca i poremećaj neuromuskularne kontrole s inhibitornim defektom (710). U rotenonskom modelu PB-a nije bilo promjena u broju ili inervacijskim obrascima nitrergičkog, VIP-ergičkog, niti dopaminergičkog inhibitornog sustava (710). Suprotno, rotenon uzrokuje promjene ekscitatornog sustava s obzirom da je opisano znatno smanjenje izražaja ChAT imunoreaktivnosti u mijenteričkom plexusu kolona 1 i 6 tjedana nakon infuzije toksina (711). Uz promjene motiliteta, u rotenonskom su modelu opisane i promjene crijevnog mikrobioma koje su bile povezane narušenim obrascem metaboloma u modelu PB-a (712).

### 6.2.3. Poremećaj redoks homeostaze probavnog sustava u životinjskim modelima Parkinsonove bolesti

Redoks homeostaza mogla bi igrati važnu ulogu u probavnom sustavu u modelima PB-a jer: i) redoks homeostaza i oksidativni stres igraju važnu ulogu u etiopatogenezi PB-a (468,713–717); ii) struktura i funkcija barijere probavnog sustava i održavanje lokalne redoks homeostaze usko su spregnuti i međuzavisni procesi (718,719); iii) proboj crijevne barijere dovodi do sustavnog oksidativnog opterećenja (radi čega je probavni sustav prozvan „tempirana bomba slobodnih radikala“) (720). Međutim, redoks homeostaza i oksidativni stres slabo su istraženi u probavnom sustavu životinjskih modela PB-a. U rotenonskom modelu PB-a, u kolonu je zabilježena povećana razina nitrotirozina, produkta nitracije tirozina reaktivnih dušikovim radikalima (721), a u ileumu je opisano povećanje lipidne peroksidacije i smanjenje koncentracije GSH-a (722). U rotenonskom modelu PB-a, u eksperimentalnom modelu na zebricama (*Danio Rerio*), opisana je povećana koncentracija proizvoda lipidne peroksidacije, te snižena razina aktivnosti katalaza, GSH S-transferaza, i SOD-a (723,724). U modelu PB-a izazvanom MPTP-om, neki dijelovi probavnog sustava, poput želuca, podliježu oksidativnom stresu prije nego središnji živčani sustav, što bi moglo biti posljedica snažnog izražaja monoamin-oksidaze-B te niske aktivnosti SOD-a (725). U 6-OHDA modelu, Garrido-Gil i suradnici opisali su povećanje izražaja p47phox što bi moglo ukazivati na oksidativni stres u proksimalnom kolonu (726), a slično je potvrđeno u studiji Pellegrini i suradnika koji su pokazali povećanje TBARS-a u kolonu 4 i 8 tjedana nakon primjene 6-OHDA-a (727).

S obzirom na važnost redoks homeostaze u PB-u te izostanak istraživanja u kojima je ravnoteža redoks reakcija detaljno istražena u probavnom sustavu modela bolesti, u sklopu ove disertacije analizirani su biljezi redoks homeostaze u različitim dijelovima probavnog sustava štakorskom modelu PB-a izazvanog intrastrijatalnom primjenom 6-OHDA-a (Slika 29). Na temelju dosad provedenih istraživanja koja su opisana u literaturi, očekivani doprinos bio je detaljnije istražiti postoji li razlika u osjetljivost na neravnotežu redoks sustava duž probavne cijevi, te razjasniti koji element redoks homeostaze bi mogao biti ključan u nastanku opisanih promjena. Međutim, iako je intrastrijatalnom primjenom uspostavljen model s naglašenim poremećajem motorike (Slika 29), detaljna analiza 8 biljega redoks homeostaze (lipidna peroksidacija, koncentracija tiola niske molekularne mase, koncentracija slobodnih sulfhidrilnih skupina, aktivnost SOD-a, aktivnost Mn-SOD-a, ukupni kapacitet disocijacije  $H_2O_2$ , kapacitet disocijacije  $H_2O_2$  neosjetljiv na AZD, NRP) u 3 segmenta probavne cijevi (duodenum, ileum, kolon) pokazala je

da, 12 tjedana nakon bilateralne intrastrijatalne primjene 6-OHDA-a, nema znakova redoks dishomeostaze ni oksidativnog stresa u probavnom sustavu (Tablica 2, Slika 30, Slika 31). Postoji nekoliko mogućih objašnjenja za proturječnost rezultata koje su opisali Pellegrini i suradnici (727) i rezultata koji su predstavljeni ovdje (Tablica 2, Slika 30, Slika 31). U istraživanju Pellegrini i suradnika, model PB-a uspostavljen je unilateralnom intrastrijatalnom primjenom u dvije regije MFB-a u ukupnoj dozi od 7,5 µg/3 µl (727). Suprotno, u istraživanju provedenom u sklopu ove disertacije, korištena je bilateralna primjena 6-OHDA-a u dozi od 8 µg/2 µl u svaku hemisferu kako bi se izbjegla mogućnost kompenzacije lezije neoštećenom hemisferom što bi moglo maskirati učinke. Doza i mjesto dostavljanja 6-OHDA-a imaju izražen efekt na fenotip i prostorno-vremenske obrasce razvoja dopaminergičke neurodegeneracije. Primjena 6-OHDA u SN i/ili MFB uzrokuje izraženu leziju nigrostrijatalnog puta koja se brzo širi te zahvaća znatan nigrostrijatalni put u nekoliko sati. Suprotno, intrastrijatalna lezija obično uzrokuje sporo, progresivno i parcijalno oštećenje koje se širi od strijatalnih nastavaka prema crnoj tvari tjednima (728). U pokusu opisanom ovdje, lezija SN-a bila je minimalna čak i nakon 12 tjedana (procijenjeno kontrolnom imunohistokemijskom analizom protutijelom usmjerenim na tirozin-hidroksilazu u SN-u (729)), što upućuje da bi izostanak učinaka u probavnom sustavu mogao biti posljedica relativne očuvanosti nigro-vagalnog puta (glavnog puta povezanog s poremećajem probavne homeostaze u PB-u (730)). Nadalje, Pellegrini i suradnici procijenili su oksidativni stres pomoću jednog biljega redoks homeostaze – MDA, pomoću TBARS metode (727). Međutim, iako je TBARS široko korišten i pouzdan biljeg oksidativnog stresa (615), korištenje TBARS metode i tumačenje rezultata ima svojih ograničenja i specifičnosti radi čega je predloženo da se ovom metodom „u najboljem slučaju može dobiti tek uzak i empirijski uvid u kompleksni proces peroksidacije lipida“ (731). Malondialdehid je samo jedan od mnogih aldehida koji nastaje kao sekundarni produkt lipidne peroksidacije, a njegova koncentracija unutar stanica ovisi o mnogim biološkim procesima (615,732). Povećana koncentracija produkata lipidne peroksidacije ponekad može upućivati na aktivaciju zaštitnog sustava antioksidansa u slučaju da funkcija metaboličkih puteva za produkte peroksidacije te redoks regulatorne mreže nije narušena (732). Obzirom da je MDA jedan od proizvoda koji nastaju u procesu biosinteze prostaglandina, posebno sinteze tromboksana putem tromboksan-sintaze (615), koja je uključena u regulaciju upale u probavnom sustavu (733), moguće je da povećana koncentracija MDA-a u pokusu Pellegrini i suradnika odražava aktivaciju upalne signalizacije (povišena koncentracija TNF- $\alpha$  i IL-a 1 $\beta$  (727)), a ne ispad funkcije redoks homeostaze koji rezultira nekontroliranom peroksidacijom membranskih lipida. S druge strane, obzirom da upalni i

redoks procesi pokazuju visoki stupanj biološke međuzavisnosti (644), poremećena regulacija redoks sustava koja rezultira peroksidacijom lipida u pokusu Pellegrini i suradnika, ne može sa sigurnošću biti isključena. Naposljetku, u navedenom pokusu istraživači su izmjerili TBARS u „neuromuskularnom tkivu kolona“, a u pokusu čiji su rezultati prikazani u sklopu ove disertacije biljezi redoks homeostaze izmjereni su u homogenatima čitavog crijeva kako bi se: i) izbjeglo uvođenje sustavne pogreške prilikom pripreme uzoraka (npr. tijekom postupka disekcije tkiva); ii) uzele u obzir promjene vezane uz sluznicu zbog njene ključne uloge u održavanju redoks homeostaze probavnog sustava (734). Uz sve navedeno, nije moguće isključiti da je oksidativni stres u probavnom sustavu prisutan samo u ranim stadijima patoloških promjena izazvanih primjenom 6-OHDA-a (što su prikazali Pellegrini i suradnici (727)) te da poremećaj redoks ravnoteže nestaje kroz vrijeme (te potpuno iščezava do vremenske točke od 3 mjeseca u kojoj su uzorci prikupljeni u ovom pokusu).

Kao što je već naglašeno, oksidativni stres igra važnu ulogu u PB-u (713,735), a sve veći broj dokaza podržava značaj probavnog sustava („tempirane bombe slobodnih radikala“ (720)) u etiopatogenezi i progresiji bolesti. Činjenica da primarni (svojtven modelima u kojima patološki proces kreće iz probavnog sustava) i sekundarni (svojtven modelima u kojima poremećaj probavnog sustava nastaje kao posljedica lezije izazvane ciljano u središnjem živčanom sustavu) poremećaj funkcije probavnog sustava nikad nije detaljno istražen u kontekstu redoks dishomeostaze probavnog, središnjeg živčanog sustava, i organizma iznenađuje. Rezultati opisanog pokusa pružaju posredne dokaze o izostanku sekundarnog doprinosa redoks dishomeostaze probavnog sustava u modelima s primarnim patološkim zbivanjem s ishodištem u središnjem živčanom sustavu (engl. *brain-first models*), barem u periodu u kojem ne postoji dostatan stupanj degeneracije nigro-vagalnog puta koji bi uzrokovao naglašenu perifernu dishomeostazu. Važnost jasnog razumijevanja doprinosa probavnog sustava i redoks homeostaze etiopatogenezi i progresiji PB jasno je odražena u nedavnim rezultatima studije Liu i suradnika koji pokazali da je pojačavanje izražaja  $\alpha$ -sinukleina specifično i isključivo u crijevu vinske mušice (*Drosophila melanogaster*) dostatno za rekapitulaciju fenotipa PB-a, te da je glavni posrednik odgovoran za opaženi fenotip oksidativni stres u probavnom sustavu (736).

### **6.3. Biološki učinci D-galaktoze**

U pokusima provedenim u sklopu ove disertacije istraženi su biološki učinci oralnog tretmana otopinom D-galaktoze i to primarno u kontekstu: i) učinaka na crijevnu redoks homeostazu nakon akutne primjene kako bi se razjasnio lokalni neposredni učinak D-galaktoze u probavnom traktu; ii) učinaka na sustavnu redoks ravnotežu i redoks homeostazu središnjeg živčanog sustava; iii) učinaka na redoks homeostazu probavnog sustava analiziranu u kontekstu blagotvornih učinaka na pamćenje u STZ-icv štakorskom modelu AB-a nakon kronične primjene; iv) učinaka na redoks homeostazu probavnog sustava analiziranu u kontekstu mogućih blagotvornih učinaka na motoriku i pamćenje u 6-OHDA štakorskom modelu PB-a nakon kronične primjene. Logička podloga za istraživanje učinaka D-galaktoze u probavnom sustavu bazirala se na prethodnim dokazima koji pokazuju da: i) kronična oralna primjena D-galaktoze smanjuje kognitivne deficite u STZ-icv štakorskom modelu AB-a (537) i sprječava nastanak kognitivnog oštećenja ukoliko tretman započne od trenutka intracerebroventrikularne primjene STZ (497); ii) metabolizam D-galaktoze potiče aktivaciju puta pentoza-fosfata koji je ključan za održavanje i obnavljanje staničnog nukleofilnog tonusa, a istraživanja upućuju na poremećaj redoks homeostaze s nedostatnim nukleofilnim tonusom u probavnom i središnjem živčanom sustavu STZ-icv štakorskog modela AB-a (535,567). Povoljni lokalni učinci D-galaktoze mogli bi ublažiti poremećaj redoks homeostaze te strukture i funkcije crijevne barijere, što bi moglo usporiti progresiju upale i neurodegenerativnih promjena.

#### **6.3.1. Učinci akutnog oralnog tretmana D-galaktozom na redoks homeostazu u probavnom sustavu štakora**

Akutna oralna primjena otopine D-galaktoze u štakora blagotvorno utječe na redoks homeostazu u tankom crijevu (Slika 32, Slika 33, Slika 34, Slika 35, Slika 36, Slika 37). Za ispravno tumačenje rezultata pokusa u kojem je analizirana redoks homeostaza duodenuma i ileuma štakora nakon akutnog tretmana D-galaktozom, zapažanja je potrebno razmotriti u valjanom biološkom kontekstu. Prije svega, treba uzeti u obzir da maksimalna lokalna izloženost D-galaktozi u duodenumu i ileumu odgovara različitim vremenskim točkama pokusa (tj. različitim skupinama s obzirom na eksperimentalni dizajn). Uz pretpostavku da je

otopina dostavljena pomoću orogastrične sonde doprijela do tkiva duodenuma prije prve vremenske točke korištene u studiji ( $t=30$  min), a da je zaostatna tekućina dosegla tkivo ileuma prije posljednje vremenske točke ( $t=120$  min)(737), očekivani maksimalni neposredni učinak u duodenumu odgovara prvoj vremenskoj točki (tj. skupini) u pokusu (30 min), a očekivani maksimalni neposredni učinak u ileumu odgovara zadnjoj vremenskoj točki (tj. skupini) eutanaziranoj nakon 120 min. Osim toga, treba naglasiti da je koncentracija D-galaktoze kojoj je tkivo efektivno izloženo vjerojatno različita u duodenumu i ileumu s obzirom da je D-galaktoza apsorbirana tijekom prolaska kroz tanko crijevo. Nadalje, kako je izlaganje tkiva provedeno *in vivo*, tj. u kompleksnom živom organizmu, treba uzeti u obzir da su sustavne promjene (npr. promjene nastale posredno zbog učinka D-galaktoze u duodenumu) utjecale na duodenum i ileum istovremeno. Eksperimentalni dizajn koji se oslanja na *ex vivo* izlaganje D-galaktozi u ovom bi kontekstu omogućio jasniji uvid u učinke galaktoze na redoks homeostazu uklanjajući mogućnost međudjelovanja i fiziološke međuzavisnosti organskih sustava i tkiva. Međutim, *in vivo* eksperiment omogućio je prikupljanje podataka koji su neposredno informativni u kontekstu planirane primjene – dugoročnog tretmana oralnom otopinom D-galaktoze s ciljem sprječavanja i poništavanja neurodegenerativnih promjena i kognitivnih poremećaja. Naposljetku, dostavljena otopina D-galaktoze (1 ml; 0,55 M) vjerojatno je premašila lokalni tkivni kapacitet za aktivni transport i metabolizam D-galaktoze. U literaturi ne postoje podaci o točnom metaboličkom i apsorptivnom kapacitetu za D-galaktozu u pojedinim segmentima tankog crijeva štakora. Međutim, uzevši u obzir visoku dostavljenu intraluminalnu koncentraciju (0,55 M), te činjenicu da je aktivni transport glukoze (posredovan istim staničnim mehanizmom) zasićen pri „visokoj luminalnoj koncentraciji“ glukoze od 30 mM (738), zasićenje kapaciteta za D-galaktozu vrlo je izvjesno u kontekstu provedenog eksperimenta (Slika 32).

Opisani rezultati upućuju da akutna oralna primjena otopine D-galaktoze (200 mg/kg) može suzbiti lipidnu peroksidaciju u probavnom sustavu uz najnižu koncentraciju sekundarnih produkata peroksidacije lipida 60 min nakon intraluminalne dostave galaktoze u duodenumu i ileumu (Slika 32). Obzirom da suzbijanje peroksidacije lipida nije bilo praćeno naglašenom promjenom ukupnog reduktivnog kapaciteta, opaženi učinak vjerojatno nije povezan s naglašenom promjenom redoks ravnoteže. Tijekom procesa peroksidacije lipida, nakon što su proizvedeni primarni produkti peroksidacije, stanice koriste dvoelektronsku redukciju hidroperoksida kataliziranu enzimima iz obitelji GPx kako bi se spriječila jednoelektronska redukcijska dekompozicija koja podržava daljnju propagaciju procesa lipidne peroksidacije sa

štetnim posljedicama (615). Posljedično, kako bi se ispitalo je li opaženo smanjenje peroksidacije povezano s aktivacijom biokemijskog sustava za inhibiciju peroksidativnog oštećenja, izmjerene su koncentracije: i) GSH (najvažnijeg i najzastupljenijeg staničnog tiola niske molekularne mase) koji se koristi u reakciji GPx za redukciju hidroperoksida; ii) proteinskih tiola koji stvaraju intraproteinske disulfide ili bivaju podvrgnuti procesu S-tiolacije u odgovoru na promjene redoks ravnoteže (739); iii) NADPH (koji je supstrat za GSH reduktazu te igra važnu ulogu u procesu obnavljanja staničnih zaliha GSH-a). Tretman D-galaktozom smanjio je koncentracije GSH-a i NADPH-a (ukupnog i podešenog za koncentraciju NADP-a), što govori u prilog aktivacije staničnih sustava za kontrolu peroksidativnog oštećenja. Slična promjena opažena je u ileumu pri mjerenju proteinskih tiola što govori da je redoks ravnoteža proteinskih sulfhidrilnih skupina bila promijenjena tretmanom D-galaktozom. Međutim, u duodenumu je koncentracija slobodnih proteinskih tiolnih skupina bila je snižena tek 120 min nakon izlaganja D-galaktozi, što govori da je tretman ostvario snažniji učinak u distalnom nego u proksimalnom tankom crijevu. Za objašnjenje promjena redoks homeostaze potrebna su daljnja istraživanja, međutim, povezanost između koncentracije tiola niske molekularne mase i NADPH-a u ileumu te izostanak opisanog fenomena u duodenumu, daje naslutiti da bi opažene razlike mogle biti posljedica biokemijskog razdvajanja (*engl. uncoupling*) reakcija koje stvaraju/troše NADPH i reakcija koje stvaraju/troše GSH (Slika 34). Slična pozitivna korelacija opisana je za slobodne sulfhidrilne skupine proteina u ileumu gdje je NADPH pretkazivao koncentraciju proteinskih sulfhidrilnih skupina ( $R^2=0.34$ ), dok to nije bilo slučaj u duodenumu ( $R^2=0.01$ ). Drugo moguće objašnjenje moglo bi biti da je učinak D-galaktoze na redoks homeostazu jednostavno bio više naglašen u ileumu te da su promjene tiolnog redoks stanja bile suviše suptilne da bi bile izmjerene pomoću DTNB-a koji reagira s tiolima neovisno o njihovom ionizacijskom stanju (739). Rezultati koji pokazuju da su sve promjene redoks sustava bile više izražene u ileumu nego u duodenumu govore u prilog potonjem. Na temelju općeg dojma i radne hipoteze da bi D-galaktoza mogla uzrokovati smanjenje koncentracije sekundarnih produkata lipidne peroksidacije aktivacijom redoks sustava koji su uključeni u obranu od peroksidativnog oštećenja (koji pak troše LMWT i NADPH), ispitan je utjecaj tretmana D-galaktozom na kapacitet disocijacije  $H_2O_2$  obzirom da je  $H_2O_2$  važan posredni signalizacijski metabolit uključen u regulaciju redoks sustava pod kontrolom GPx-a (740). Osim toga,  $H_2O_2$  je važna signalizacijska molekula s brojnim metaboličkim regulatornim ulogama – ponaša se kao drugi glasnik inzulinske signalizacije (740), ima važnu ulogu u slavnoj „peroksidnoj dilemi“ (741) te je blisko združen s funkcijom mitohondrija i povezan s nadgledanjem dostupnosti hranjivih tvari (740). Zanimljivo, u



duodenumu je opažena obrnuta korelacija između kapaciteta za disocijaciju  $H_2O_2$  i koncentracije TBARS-a, dok je u ileumu takav obrazac izostao (Slika 35, Slika 36, Slika 37). Kako je jedna od glavnih uloga GPx-a kataliza redukcije  $H_2O_2$  u  $H_2O$ , povećani disocijacijski kapacitet u duodenumu mogao bi pružiti objašnjenje za opažene proturječne povezanosti LMWT/SH-a i NADPH-a u duodenumu i ileumu uz pretpostavku da je dodatna količina LMWT-a iskorištena u procesu regulacije homeostaze  $H_2O_2$  putem GPx-a u ileumu radi kompenzacije zbog izostanka povećanja kapaciteta disocijacije  $H_2O_2$ . Obrnuto, moguće je da je povećano trošenje supstrata potrebno za održavanje nukleofilnog tonusa (LMWT-a i NADPH-a) onemogućilo odgovor u ileumu zbog ograničenih zaliha supstrata za regulaciju  $H_2O_2$  posredovanu GPx-om.

Naposlijetku, s ciljem boljeg razumijevanja opaženog porasta kapaciteta disocijacije  $H_2O_2$ , procijenjena je aktivnost enzima SOD koji su zbog katalize reakcije dismutacije superoksid-radikal aniona na  $O_2$  i  $H_2O_2$  važan izvor staničnog  $H_2O_2$  (740). Zanimljivo, tretman D-galaktozom bio je povezan s trendom povećanja aktivnosti SOD-a u duodenumu i ileumu. Smatra se da su superoksidni radikali izvor većine staničnih kisikovih i dušikovih slobodnih radikala koji igraju središnju ulogu u regulaciji redoks homeostaze i oksidativnom stresu (742), što ukazuje da bi supresija lipidne peroksidacije tretmanom D-galaktozom mogla biti povezana s učinkom D-galaktoze na aktivnost SOD-a. Potenciranje aktivnosti SOD-a dostavom enzima ili katalitičkih mimetika čini se kao obećavajući farmakološki pristup u brojnim bolestima povezanim s oksidativnim stresom (743) pa bi tretman D-galaktozom zbog mogućeg učinka na SOD trebao biti detaljnije ispitan u ovom kontekstu. Iako je D-galaktoza potencirala ukupnu aktivnost SOD-a u duodenumu i ileumu, učinak na Mn-SOD bio je ovisan o anatomskom segmentu probavne cijevi. Tretman D-galaktozom smanjio je aktivnost Mn-SOD-a u duodenumu, a povećao ju u ileumu. Uzrok ove razlike nije jasan.

Alternativno objašnjenje opaženog smanjenja peroksidacije lipida uslijed akutnog oralnog tretmana D-galaktozom je zasićenje glavnih metaboličkih puteva zbog velike lokalne (intraluminalne) koncentracije galaktoze. Alternativni putevi uključuju stvaranje galaktitola u reakciji kataliziranoj aldehid-reduktazom ili stvaranje D-galaktonata galaktozadehidrogenazom. Hipotetski, aktivacija aldehid-reduktaze mogla bi objasniti opažen pad koncentracije NADPH-a, a teoretski je moguće da potenciranje aktivnosti aldehid-reduktaze može rezultirati i smanjenjem koncentracije sekundarnih produkata peroksidacije lipida, budući da je jedan od predloženih metaboličkih puteva za MDA (jedan od glavnih sekundarnih produkata peroksidacije lipida) oksidacija mitohondrijskom aldehid-reduktazom (615).

Natjecanje supstrata (D-galaktoze i MDA-a) za enzim čini ovo objašnjenje malo vjerojatnim, no ne isključuje ga. Ukoliko se u budućim istraživanjima pokaže da je ovo zaista glavni mehanizam učinaka D-galaktoze na TBARS, navedeno bi moglo pružiti važne informacije o mogućim posljedicama aktivacije aldehid-reduktaze. Navedeno je posebno važno u kontekstu toksičnih učinaka galaktitola koji se preispituju jer koncentracija koja se u leći štakora postiže tijekom prehrane s vrlo visokom koncentracijom D-galaktoze nije dostatna da uzrokuje osmotski stres (508).

Bez obzira na mehanizme odgovorne za opažene učinke D-galaktoze na redoks homeostazu duodenuma i ileuma, predstavljeni rezultati pružaju temelje za daljnja istraživanja moguće protektivne uloge D-galaktoze u probavnom sustavu budući da su svi redoks sustavi na koje D-galaktoza ostvaruje učinke (SOD, GPx, lipidna peroksidacija) uključeni u održavanje homeostaze probavnog sustava.

Crijevo je primarni organ za apsorpciju i metabolizam hranjivih tvari iz prehrane. Osim toga, crijevo predstavlja ključnu imunološku i fizičku barijeru prema vanjskom svijetu koja je trajno izložena stranim tvarima i mikroorganizmima sa znatnim potencijalom za stvaranje elektrofila radi čega je probavni sustav davno prepoznat kao „tempirana bomba slobodnih radikala“ (720). Redoks homeostaza igra ključnu ulogu u održavanju strukture i funkcije barijere probavnog sustava (719). Primjerice, oštećenje sluznice uzrokovano indometacinom može se spriječiti pretretmanom SOD-om (744). Smanjena aktivnost SOD-a u crijevu povezana je s nastankom želučanog vrieda, a povećana aktivnost sastavni je dio procesa cijeljenja vrieda (719,745). Aktivnost GPx-a (koja je, čini se, potencirana tretmanom D-galaktozom) ključna je za održavanje probavne barijere jer sprječava apsorpciju štetnih hidroperoksida iz hrane te štiti sluznicu od slobodnih radikala koji nastaju uslijed djelovanja intraluminalnih mikroorganizama (719,746,747). Nadalje, miševi s izbačenim genom za naširoko izraženi GPx1 te GPx2, varijantu enzima specifičnu za epitelne stanice, razvijaju upalu i kolitis (748). Naposljetku, nekontrolirani nastanak crijevnih elektrofila zbog upale, disbioze, ili unosa alkohola, herbicida, željeza, ili pojedinih lijekova (npr. nesteroidnih protuupalnih lijekova)(749) potiče peroksidaciju lipida koja uzrokuje nastanak primarnih i sekundarnih produkata peroksidacije (615). Koncept da neravnoteža između elektrofilnog i nukleofilnog tonusa potiče inicijaciju i širenje te odgađa završni korak i zaustavljanje peroksidacije lipida, u središtu je većine teorija nastanka patofizioloških stanja povezanih s oksidativnim stresom (pogotovo onih povezanih s viškom elektrofila (109,433)), a nakupljanje sekundarnih spojeva lipidne peroksidacije očito je u brojnim patološkim stanjima uključujući i ona koja zahvaćaju

probavni sustav (npr. refluksni ezofagitis, gastritis, želučani vried i *H.pylori* infekciju, i upalnu bolest crijeva (719)).

Kako su dishomeostaza probavnog sustava i upala prepoznati kao važni etiopatogenetski čimbenici upale i neurodegeneracije središnjeg živčanog sustava (750), opisani učinci D-galaktoze na crijevnu redoks homeostazu trebali bi biti dodatno istraženi u kontekstu dugotrajne primjene (pogotovo u kontekstu korištenja dugoročnog tretmana otapanjem u vodi za piće dostupnoj *ad libitum* što je u prethodnim istraživanjima pokazalo blagotvorne neuroprotektivne učinke (330,497,561,751)). Potonje je posebno važno budući da kronična oralna primjena relativno malih doza D-galaktoze (100 mg/kg) može uzrokovati oštećenje kognitivnih funkcija i oksidativni stres ukoliko je tretman dostavljen putem orogastrične sonde kao bolus doza jednom dnevno (527). Suprotno, čak i vrlo velike oralne doze D-galaktoze ne potiču upalu u štakora ukoliko je primjena raspodijeljena kroz čitav dan (752). Mhd Omar i suradnici pokušali su dodavanjem velike količine D-galaktoze u prehranu izazvati upalu i štetne metaboličke učinke u štakora kako bi ispitali protuupalne učinke fruktooligosaharida u prehrani (752). Prehrana obogaćena D-galaktozom sadržavala je 50 g D-galaktoze na 100 g hrane, a tretman je trajao 12 tjedana (752). Budući da prosječni štakor pojede oko 15 g standardiziranih peleta hrane na dan (753), štakori na dijeti bogatoj D-galaktozom unosili su otprilike 7,5 g D-galaktoze dnevno što je otprilike 150 puta veća doza u usporedbi s onom za koju su Budni i suradnici pokazali da uzrokuje oksidativni stres i kognitivno oštećenje kad se koristi kao ponavljano dnevno davanje u bolus dozi orogastričnom sondom (527). Čak i uz navedene vrlo visoke koncentracije D-galaktoze, Mhd Omar i suradnici nisu primijetili promjene zonulina, IL-a 1 $\beta$ , IL-a 6, TNF-a  $\alpha$ , niti c-reaktivnog proteina u plazmi u usporedbi s kontrolnim štakorima koji su primali izokaloričnu dijetu s dodatkom škroba (752). Osim toga, 12 tjedana prehrane bogate D-galaktozom uzrokovalo je pad porasta tjelesne mase i ~55% smanjenje koncentracije endotoksina u plazmi što govori u prilog poboljšanju funkcije crijevne barijere (752). Iako mehanizam kojim oralna primjena D-galaktoze dovodi do poboljšanja funkcije crijevne barijere tek treba istražiti, jedna mogućnost je poticaj stvaranja probavne sluzi i sluzne barijere koja čini prvu liniju obrane probavne sluznice od intraluminalnih mikroorganizama i toksina (754,755), a čija je važnost prepoznata u kontekstu neuroloških poremećaja (645). Druga mogućnost, koja se temelji na rezultatima koji su prikazani ovdje, je da oralna primjena D-galaktoze čuva probavnu sluznicu blagotvornim učinkom na crijevnu redoks homeostazu što štiti epitelne stanice od intraluminalnih hidroperoksida i elektrofila čija je proizvodnja stimulirana interakcijom mikroorganizama sa crijevnom barijerom. U ovom je

kontekstu posebno važno istražiti je li za blagotvorne učinke (ili izostanak štetnih učinaka) ključna prisutnost D-galaktoze s „fiziološke“ (luminalne) strane enterocita. Potonje je posebno zanimljivo u kontekstu kronične parenteralne primjene D-galaktoze koja izaziva štetne učinke (756), a prilikom koje putem sustavne cirkulacije određena koncentracija D-galaktoze svakako dopijeva do stanica probavnog sustava. Međutim, bez jasnih eksperimentalnih podataka, koji u ovom trenutku ne postoje, nije moguće zaključiti koja koncentracija D-galaktoze je dostupna stanicama probavnog sustava tijekom kronične parenteralne primjene te koji bi sve mehanizmi mogli objasniti moguće različite učinke luminalne i sustavne prisutnosti D-galaktoze u kontekstu homeostaze enterocita.

Uz navedene promjene redoks homeostaze probavnog sustava, nakon oralnog tretmana otopinom D-galaktoze opažen je porast izražaja pERK-a u svim vremenskim točkama (30, 60, i 120 min) nakon tretmana (Slika 38). Naj snažniji izražaj bio je u stanicama nalik na enteroendokrine stanice i u vlaknima nalik živčanim završecima što bi moglo upućivati na aktivaciju enteroendokrine osi nakon oralnog tretmana D-galaktozom. Navedena zapažanja u skladu su s prijašnjim rezultatima koji su pokazali da bi tretman D-galaktozom mogao potaknuti lučenje inkretina poput GLP-a 1 što bi moglo objasniti neuroprotektivne učinke galaktoze (537,612). Zanimljivo, koncentracija GLP-a 1 i njegovog aktivnog fragmenta u plazmi nije bila značajno izmijenjena akutnim oralnim tretmanom D-galaktozom (Slika 39). Naoko oprečni rezultati stimulacije enteroendokrinih stanica bez očitog porasta koncentracije inkretina vjerojatno odražavaju činjenicu da je prva vremenska točka mjerenja u ovom eksperimentu bila 30 min nakon tretmana, a ranija su istraživanja pokazala da akutni oralni tretman D-galaktozom (1 ml; 200 mg/kg) postiže vršne vrijednosti GLP-a 1 u plazmi ( $+111\pm 12\%$ ) 15 min nakon tretmana (537).

### **6.3.2. Učinci akutnog oralnog tretmana D-galaktozom na sustavnu redoks ravnotežu i redoks homeostazu središnjeg živčanog sustava**

#### **6.3.2.1. Učinci akutnog oralnog tretmana D-galaktozom na sustavnu redoks homeostazu**

Analiza učinaka akutnog oralnog tretmana D-galaktozom (1 ml; 200 mg/kg) upućuje na nedostatnost jednokratnog akutnog oralnog davanja da naruši sustavnu redoks ravnotežu. Zanimljivo, istovjetno učincima u crijevu, tretman D-galaktozom smanjio je koncentraciju TBARS-a u plazmi, a drugi biljezi nisu pokazali značajnih odstupanja. Biološka pozadina opaženog smanjenja produkata peroksidacije lipida još nije razjašnjena, ali, kao i u probavnom sustavu, moguće je da tretman D-galaktozom smanjuje stvaranje TBARS-a supresijom lipidne peroksidacije ili potiče uklanjanje štetnih produkata peroksidacije poput štetnog elektrofilnog aldehida MDA-a. Jedno moguće objašnjenje kojim bi tretman D-galaktozom mogao potaknuti uklanjanje MDA-a je stimulacija enzima aldehyd-dehidrogenaze. Aldehyd-dehidrogenaza evolucijski je očuvani enzim koji obnaša funkciju hvatanja aldehida što štiti stanicu od oksidativnog stresa (757), a D-galaktoza bi mogla potaknuti aktivnost enzima hormetskim mehanizmom stvaranjem male količine produkata peroksidacije lipida ili obnavljanjem staničnih zaliha NADPH-a. Još nije razjašnjeno jesu li opažene promjene posljedica lokalnih učinaka u plazmi ili učinaka na pojedine organe, međutim, moguće je da je smanjenje koncentracije produkata peroksidacije lipida posljedica učinaka na jetru koja ima najveći kapacitet za unos i metabolizam galaktoze (498).

#### **6.3.2.2. Učinci akutnog oralnog tretmana D-galaktozom na redoks homeostazu hipokampusa**

Za razliku od učinaka u probavnom sustavu i u plazmi, jednokratni akutni oralni tretman D-galaktozom ostvaruje blage oksidativne promjene redoks homeostaze u hipokampusu. Paradoksalno, uz oksidativni pomak, zapažen je i reduktivni kompenzatorni odgovor. Primjerice, 30 min nakon tretmana D-galaktozom dolazi do smanjenja aktivnosti SOD-a u hipokampusu. Smanjenje aktivnosti SOD-a već je opisano nakon kroničnog parenteralnog tretmana D-galaktozom (505,758,759), međutim, ovo je prvi nalaz akutnog sniženja aktivnosti u središnjem živčanom sustavu nakon oralnog tretmana u štakora. Osim SOD-a, tretman je

ostvario najzapaženiji učinak na kapacitet disocijacije  $H_2O_2$ . Kronični parenteralni tretman D-galaktozom snižava aktivnost katalaza (smanjuje kapacitet disocijacije  $H_2O_2$ ), a brojni terapijski pristupni normaliziraju ovaj učinak (507,510,759). Suprotno, u provedenom pokusu, jednokratni akutni oralni tretman D-galaktozom povećao je kapacitet disocijacije  $H_2O_2$ . Stvaranje slobodnih radikala smatra se najvažnijim molekularnim mehanizmom nastanka patofizioloških promjena nalik starenju tijekom kroničnom parenteralnog tretmana galaktozom. Opaženi paradoksalni porast kapaciteta za disocijaciju  $H_2O_2$  mogao bi biti potaknut supstratnom stimulacijom enzimatske aktivnosti. To sugerira da bi bar neke molekularne promjene povezane s blagotvornim učinkom D-galaktoze mogle biti posredovane hormezom – patofiziološkim fenomenom koji opisuje težnju biološkog sustava da odgovori na stresorom izazvanu homeostatsku neravnotežu protektivnom hiperkompencijom (760). U prilog navedenoj hipotezi govori i nalaz povećanog kapaciteta peroksidacije posredovane citokromskim kompleksom za koju je ranije pokazano da se povećava uslijed oksidacije proteina reaktivnim halogenim spojevima (761). Načela hormeze detaljno su istražena u kontekstu oksidativnog stresa gdje se niskoj (tolerabilnoj) koncentraciji reaktivnih radikala pripisuju blagotvorna svojstva modulacije i povećanja kapaciteta sustava redoks homeostaze (762,763). Primjerice, protektivni učinak posredovan poticanjem blagog oksidativnog stresa opisan je tijekom proučavanja mehanizma djelovanja 3,5,4'-trihidroksi-trans-stilbena, polifenola iz crvenog grožđa s brojnim blagotvornim učincima poznatog kao resveratrol (437).

Izostanak promjene tiola niske molekularne mase i blagi oksidativni pomak koncentracije sulfhidrilnih skupina proteina i lipidne peroksidacije, koji je potpuno kompenziran u prvih 120 min nakon tretmana D-galaktozom, pruža dodatne dokaze koji podupiru hipotezu da jednokratna oralna primjena D-galaktoze može ostvariti hormetski učinak u hipokampusu i uzrokovati hiperkompencijski odgovor s povećanjem kapaciteta nukleofilnog tonusa redoks sustava. Biljezi ukupnog reduktivnog kapaciteta također ukazuju na povećanje reduktivnog kapaciteta usprkos sniženju kapaciteta SOD-a.

Pomoću prostorno-vremenske analize tkivnog reduktivnog kapaciteta HistoNRP metodom otkriveno je da je opisani hormetski učinak anatomske specifičan obzirom da je kratkotrajna reduktivna hiperkompencija uočena u ventralnom, ali ne i dorzalnom hipokampusu, te u temporalnom, ali ne i u parijetalnom korteksu (Slika 42). U ovom kontekstu, bilo bi zanimljivo detaljnije istražiti odgovor redoks sustava u regijama mozga koje pokazuju monotonu i linearnu spregu između doze D-galaktoze i učinka na lokalni reduktivni kapacitet kako bi se ispitalo postoji li poveznica između metaboličkog kapaciteta za D-galaktozu i odgovora redoks

ravnoteže što bi pružilo dodatne dokaze za ili protiv hormetske hipoteze. Nakon što je postavljena radna hipoteza da bi učinci D-galaktoze u hipokampusu mogli biti posredovani niskom (tolerabilnom) razinom oksidativnog stresa i adaptivnim mehanizmima, istražen je NADPH sustav jer su prijašnja istraživanja pokazala da NADPH-om regulirano otpuštanje oksidativnog puta pentoza-fosfata služi kao brzi metabolički sustav za detoksikaciju elektrofila koji je evolucijski očuvan (764,765). U trenutku elektrofilnog izazova, stanice reagiraju povećanjem prepisivanja gena za komponente sustava antioksidativne zaštite (766). Međutim, prije nego što se poticanjem antioksidativnih gena poveća izražaj funkcionalnih hvatača slobodnih radikala, preživljenje stanice ovisi o kratkotrajnim protektivnim mehanizmima koji se oslanjaju na zalihi reduktivnih ekvivalenata, najčešće u obliku NADPH-a (764,765,767). Kako bi navedeni mehanizam pružao učinkovitu zaštitu, stanice su trebale razviti fleksibilne strategije biokemijskog preusmjerenja za snabdijevanje puta pentoza-fosfata supstratima za proizvodnju NADPH-a (764,765,767,768). Analiza hipokampalnog NADPH-a podržava hormetsku hipotezu zaštitnog učinka galaktoze obzirom da je blagi prooksidativni učinak D-galaktoze bio povezan s trendom povećanja koncentracije NADPH-a. U kontekstu promjena NADP-a i prethodno opisanih promjena biljega redoks homeostaze, rezultati upućuju na povećan obrtaj NADPH-a uz metaboličko preusmjerenje s ciljem obnavljanja zaliha reducirajućih ekvivalenata i obnove nukleofilnog tonusa.

Opisano povećanje dostupnosti i obrtaja NADPH-a u skladu je s klasičnom staničnim prilagodbenim odgovorom na izlaganje slobodnim radikalima jer u radnom modelu funkcionalna metabolička regulacija koja pruža supstrate za redukciju  $\text{NADP}^+$  ne obnavlja samo najvažnije stanične antioksidativne sustave poput GPx-a, već može i reaktivirati katalazu (769). Uz opisano, posebno je zanimljiv učinak tretmana D-galaktozom na koncentraciju ukupnog NADP-a. Istraživanja pokazuju da oksidativni stres može stimulirati naglu fosforilaciju  $\text{NAD}^+$  u  $\text{NADP}^+$  aktivacijom  $\text{NAD}^+$  kinaze (NADK; EC 2.7.1.23) kako bi se povećala dostupnost supstrata za stvaranje NADPH-a. Međutim, navedeni mehanizam opisan je u biljaka i kvasaca (770–772). Suprotno, istraživanja pokazuju da ljudske stanice stvaraju NADPH za borbu protiv elektrofilnog izazova sustavom inducibilne  $\text{NADP}^+$  ovisne dehidrogenaze, a ne povećanjem  $\text{NADP}^+$  zaliha otpuštanjem NADK-a (772–774). Ova važna razlika također je odražena u činjenici da kvasci i biljke imaju tri dobro poznate i opisane izoforme NADK-a (775), dok je u sisavaca 2001. godine opisan tek jedan gen koji sadrži informaciju za citosolnu NADK (776). Nedavno je opisana dodatna mitohondrijska varijanta NADK u sisavaca s još nerazjašnjenim fiziološkim i patofiziološkim značajem (777).

Patofiziološka uloga NADK-a u glodavaca još uvijek je neistražena. Važna uloga ovog enzima u glodavaca odražava se u opažanju da gubitak oba alela NADK-a u miša dovodi do smrti još tijekom embrionalnog razvoja (778), a prostorno-vremenski izražaj aktivnosti ovog enzima igra važnu ulogu u pravilnom razvoju zametka štakora (779). Osim toga, neki neizravni dokazi upućuju na moguću važnu ulogu NADK-a u odgovoru na oksidativni stres. Etanolom uzrokovano povećanje koncentracije  $\text{NADP}^+$  u hepatocitima štakora najvjerojatnije je posljedica učinka na NADK (780), a oksidativni stres uzrokovan butiratom potiče povećanje citosolnog NADK-a i  $\text{NADP}^+$  uz smanjenje  $\text{NAD}^+$  (781). Obzirom na biološku važnost  $\text{NADP}^+$  i NADK-a (772–774), opažanje dramatičnog povećanja hipokampalnog  $\text{NADP}^+$  nakon jednokratnog akutnog oralnog tretmana D-galaktozom postavlja važno pitanje o mogućoj ulozi NADK-a na razmeđu redoks regulacije i metabolizma u središnjem živčanom sustavu glodavaca (i ostalih sisavaca).

Nakon opažanja blagog (tolerabilnog) oksidativnog izazova kompenziranog metaboličkim skretanjem s povećanjem reduktivnih ekvivalenata, istraženo je prati li opisani metabolički pomak smanjenje neuronalne aktivnosti pomoću c-fos biljega aktivacije neurona (782,783). Navedeno istraživačko pitanje bilo je vođeno hipotezom da: i) skretanje metaboličkih supstrata prema putu pentoza-fosfata za sintezu reduktivnih ekvivalenata smanjuje dostupnost supstrata za donju glikolizu; ii) smanjenje metaboličkih zaliha dovodi do aktivacije dodatnih mehanizama za smanjenje aktivnosti stanice i ograničavanje dostupnosti NADH-a koji u slučaju oslabljene reaktivnosti može imati štetne posljedice zbog potencijala za stvaranje slobodnih radikala (771).

Izražaj hipokampalnog c-fos govori u prilog navedenoj hipotezi jer je jednokratni akutni oralni tretman D-galaktozom doveo do progresivnog smanjenja aktivnosti stanica i pada izražaja biljega aktivacije. Uz navedeno pretpostavljeno je da će, uz adaptivno smanjenje aktivnosti stanica, povećano izlaganje dostupnoj D-galaktozi dovesti do povećanja izražaja ključnih enzimatskih regulatora Leloirovog puta što bi stanici omogućilo da uravnoteži iskorištavanje D-galaktoze za proizvodnju energije i reduktivnih ekvivalenata u slučaju dugotrajne dostupnosti supstrata obzirom da glukoza-6-fosfat može biti preusmjeren prema glikolizi ili prema putu pentoza-fosfata. Izražaj GALK-a 1, enzima vratara koji katalizira prvi usmjereni korak Leloirovog puta, bio je obrnuto proporcionalan padu aktivnosti izmjenom pomoću izražaja c-fosa što govori u prilog postavljenoj hipotezi (Slika 42). Naposljetku, kako je skupina istraživača okupljena oko Prof. Wenera Reuttera prethodno pokazala da je jedan od mogućih mehanizama kojim D-galaktoza ostvaruje neuroprotektivne učinke trošenje ekvivalenata



amonijaka putem biosinteze aminokiselina iz heksoza, u opisanom je istraživanju ispitano mogu li metaboličke promjene uzrokovane primjenom D-galaktoze uzrokovati promjenu hipokampalne homeostaze glutamata (498). Nakupljanje glutamata ima dobro poznate neurotoksične učinke što bi moglo biti važno u kontekstu neurodegeneracije i AB-a (784). Međutim, glutamat je također jedan od najvažnijih ekscitatornih neurotransmitera i ima važnu ulogu u regulaciji neuronalne energetske homeostaze putem glutamat-glutamin ciklusa – ključnog elementa procesa laktatnog prijenosa (*engl. lactate shuttle*) koji čini podlogu teoretskog razumijevanja suvremene neuroenergetike (785). Osim toga, metabolizam glutamata izravno je spregnut s biokemijskim putevima koji su odgovorni za iskorištavanje galaktoze jer prvi enzim koji predstavlja i usko grlo puta biosinteze heksozamina, glutamin-fruktoza-6-fosfat-transaminaza (GFAT; EC 2.6.1.16), fruktozu-6-fosfat i glutamin pretvara u glutamat i glukozamin-6-fosfat. Istraživanja pokazuju da stanična zaliha fruktoza-6-fosfata raste u slučajevima povećane dostupnosti galaktoze (493) pa je moguće da poticanje putova glikozilacije proteina galaktozom usporedno obnavlja stanične zalihe glutamata procesom transaminacije. Ovaj mehanizam mogao bi biti zaslužan za opaženo obnavljanje zaliha glutamata (koje prati izražaj GALK-a 1) koje su akutno ispražnjene nakon tretmana D-galaktozom.

### **6.3.2.3. Značaj jedinstvenog biokemijskog obrasca metabolizma D-galaktoze u kontekstu ograničene dostupnosti hranjivih tvari i hormetske hipoteze**

Trenutni dokazi govore u prilog konceptu da jedinstveni metabolički obrazac D-galaktoze aktivira zaštitne mehanizme u uvjetima ograničene dostupnosti hranjivih tvari (493). Sasaoka i suradnici pokazali su da galaktoza potiče obrazac zrele glikozilacije proteina uspješnije nego glukoza ili manoza (493). S obzirom na važnost glikozilacije proteina, navedena opažanja ukazuju da bi galaktoza mogla očuvati energetske osjetljive funkcije stanice tijekom smanjene dostupnosti supstrata. Očuvanje obrasca zrele glikozilacije posebno je važno za anaboličku signalizaciju jer je poznato da su čimbenici rasta i njihovi receptori izuzetno glikozilirani i osjetljivi na poremećaj dostupnosti energije i hranjivih tvari (786). Zanimljivo, čak i u prisutnosti galaktoze u tragovima (0,3 mM) u uvjetima smanjene dostupnosti supstrata, galaktoza je normalizirala poremećaj signalizacije i sazrijevanja inzulinu sličnog čimbenika rasta 1 (IGF-1; *engl. insulin-like growth factor 1*) i epidermalnog čimbenika rasta u HEK293 stanica (493). Isti učinak nije bilo moguće ponoviti primjenom 0,3 mM glukoze (493).

Mogućnost galaktoze da očuva funkciju signalizacije čimbenicima rasta mogla bi biti neposredno vezana uz fosforilaciju  $\text{NAD}^+$  u kontekstu nedavnih zapažanja da čimbenici rasta poput inzulina i IGF-a 1 kontroliraju aktivnost NADK-a putem Akt-om posredovane fosforilacije (787). Oksidativni stres poznata je posljedica nedostatne dostupnosti hranjivih tvari. Povećana koncentracija superoksidnih radikala i  $\text{H}_2\text{O}_2$  opisana je u uvjetima ograničavanja dostupnosti glukoze, glutamina, piruvata, seruma ili aminokiselina, a stvaranje slobodnih radikala u uvjetima nedostatne dostupnosti hranjivih tvari smatra se jednim od važnih mehanizama pokretanja procesa autofagije (788,789). U ovom kontekstu, činjenica da se galaktoza metabolizira primarno u smjeru puta pentoza-fosfata, a ne glikolizom, čini ju još zanimljivijom za očuvanje staničnih funkcija u uvjetima gladovanja jer, uz očuvanje anaboličke signalizacije čimbenicima rasta, galaktoza omogućava sintezu nukleofilnih supstrata ključnih za obnavljanje antioksidativnog kapaciteta za neutralizaciju slobodnih radikala nastalih u procesu gladovanja. Skretanje metabolizma prema putu pentoza-fosfata moglo bi aktivirati i druge prilagodbene mehanizme poput oslobađanja gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaze (GAPDH; EC 1.2.1.12) smanjenjem dostupnosti supstrata gliceraldehid-3-fosfata što preusmjerava GAPDH u jezgru gdje obnaša funkciju transkripcijskog regulatora (790,791).

Brojni dokazi podupiru hipotezu da je galaktoza evolucijski odabrana kao savršeni šećer za nadilaženje fluktuacija u dostupnosti energetske supstrate te čuvar signalizacije čimbenicima rasta. Navedena hipoteza pogotovo ima smisla u kontekstu činjenice da je galaktoza najvažnija u mozgu, najosjetljivijem i energetski najovisnijem organu, i u periodu sisanja, najosjetljivijem i energetski najovisnijem periodu života sisavca. Imajući ovo na umu, moguće je da se ista biokemijska podloga koja omogućava galaktozi da zaštiti mozak od nestašice energije tijekom razvojnog razdoblja, može iskoristiti kao alternativni izvor energije, za održavanje obrazaca glikozilacije i očuvanje signalizacije čimbenicima rasta te za nadoknadu nukleofilnog tonusa u procesu neurodegeneracije koje je isto ranjivo biološko stanje okarakterizirano manjkom nukleofilnog tonusa i energetske supstrate. Predloženi je koncept poduprt opažanjima da dugoročna primjena D-galaktoze u vodi za piće sprječava (497) i normalizira (376) kognitivno oštećenje u STZ-icv štakorskom modelu AB-a s narušenom inzulinskom signalizacijom u mozgu (377). Osim toga, tretman D-galaktozom može normalizirati metabolizam glukoze u mozgu u STZ-icv štakorskom modelu (376) i Tg2576 mišjem transgeničnom modelu AB-a (330).

Iako brojni dokazi podupiru hipotezu da jedinstvena biokemijska uloga galaktoze omogućava zaštitu u uvjetima ograničene dostupnosti hranjivih tvari, ne treba zanemariti činjenicu da brojni dokazi pokazuju da dugotrajna primjena galaktoze može uzrokovati oksidativni stres. Štoviše, brojne istraživačke skupine pomoću dugoročne (i u pravilu parenteralne) primjene galaktoze u glodavaca potiču oksidativni stres i uzrokuju patofiziološke promjene povezane sa starenjem (756), što dovodi do pitanja: Kako je moguće da galaktoza potiče oksidativni stres, ali istodobno štiti stanice od fluktuacija dostupnih energetske supstrata i povećava kapacitet stanica za neutralizaciju slobodnih radikala? Neki od rezultata predstavljeni u sklopu ove disertacije, razmotreni u širem kontekstu objavljenih opažanja, mogli bi pomoći ponuditi odgovor na postavljeno pitanje.

Specifična reorganizacija metabolizma povezana s izlaganjem galaktozi mogla bi biti neposredna posljedica mogućnosti galaktoze da potakne stvaranje male, tolerabilne, količine staničnog oksidativnog stresa koji mogu potaknuti aktivaciju puteva za obnavljanje nukleofilnih zaliha hormetskom stimulacijom. Rezultati više istraživačkih skupina govore u prilog navedenoj hipotezi kao što je prikazano u daljnjem tekstu. Dinamika metaboličke reorganizacije povezana s izlaganjem D-galaktozi nalikuje na biokemijsku reorganizaciju koja nastaje uslijed akutnog izlaganja oksidativnom stresu. Otpuštanje utoka supstrata u oksidativnu granu puta pentoza-fosfata s posljedičnim obnavljanjem zaliha NADPH-a, smatra se evolucijski očuvanim mehanizmom zaštite od slobodnih radikala prisutnim širom živog svijeta (764). Zanimljivo, istovjetan obrazac korištenja energetske supstrata opisan je prilikom izlaganja galaktozi (790,791). Nadalje, inhibicija glikolize oksidativnim stresom dodatno je pospješena inaktivacijom enzima vratara GAPDH i fosfofruktokinaze-1 (PFK-1; *engl. phosphofructokinase-1*)(435). U stanicama sisavaca GAPDH služi kao pleiotropni senzor elektrofilnog tonusa i oksidativnog stresa putem više mehanizama od kojih je jedan od najvažnijih neposredni učinak elektrofila na strukturu enzima. Primjerice, tijekom porasta elektrofilnog tonusa, uslijed oksidacije, formiraju se disulfidne veze na cisteinima u blizini aktivnog mjesta enzima što prolazno suprimira aktivnost enzima. S-tiolacija enzima smatra se važnim protektivnim mehanizmom jer omogućuje stanici da trenutno reaktivira glikolizu i stvaranje ATP-a nakon što je elektrofilni pomak uspješno neutraliziran nukleofilnim protektivnim mehanizmima (435). Povećanje elektrofilnog tonusa također inhibira PFK-1, ključan glikolitički enzim neposredno odgovoran za prvi usmjereni korak glikolize, moguće putem modulacije TP-a 53 posredovanog regulatora glikolize i apoptoze (TIGAR; *engl. TP-53-induced glycolysis and apoptosis regulator*) (435,792). Zanimljivo, metabolička aktivnost

GAPDH-a smanjena je u prisutnosti galaktoze (790,791), a nedavna istraživanja pokazala su da, za razliku od glukoze koja pojačava aktivnost glikolitičkog enzima vratara PFK-a 1, prisutnost galaktoze ne mijenja izražaj niti aktivnost enzima što omogućava preusmjeravanje supstrata prema putu pentoza-fosfata (493). Nadalje, opaženo je da dodavanje galaktoze u medij u kulturi stanica N2a uzrokuje povećani izražaj molekule regulatora TIGAR (793). Uzevši u obzir prethodno spomenute dokaze, moguće je da sličnost metaboličke dinamike potaknute galaktozom i slobodnim radikalima nije slučajnost te da biokemijska sudbina galaktoze ovisi o sposobnosti aktivacije puteva osjetljivih na porast elektrofilnog tonusa. U ovom su kontekstu posebno važni alternativni putevi metabolizma galaktoze katalizirani aldoza-reduktazom (AR; EC 1.1.1.21) i galaktoza-dehidrogenazom (EC 1.1.1.48) obzirom da se oni smatraju važnim izvorom slobodnih radikala uslijed povećanja izloženosti galaktozi. Potporu potonjoj hipotezi pružaju rezultati Li i suradnika koji su ispitivali učinke galaktoze u malignim i nemalignim staničnim linijama s ciljem istraživanja obustave glikolize kao moguće terapije malignih bolesti (793). Zanimljivo, učinak galaktoze u malignim staničnim linijama poništen je pretretmanom stanica sorbinilom, specifičnim inhibitorom AR-a (793), što upućuje da bi dodatni metabolički putovi mogli imati važnu ulogu u specifičnoj metaboličkoj reorganizaciji povezanoj s tretmanom galaktozom. Osim toga, ne može se isključiti mogućnost da galaktozom potaknuta hormeza ovisi o oksidativnom metabolizmu koji stvara znatnu količinu slobodnih radikala jer stanice kultivirane u mediju s galaktozom preferencijalno za stvaranje energije koriste oksidativnu fosforilaciju. Navedeno načelo koristi se i u kliničkoj praksi jer se probir bolesnika u kojih je postavljena sumnja na nasljedne bolesti povezane s disfunkcionalnim respiratornim lancem, provodi kultivacijom fibroblasta (794) ili primarnih mišićnih stanica (795) u mediju s galaktozom. U ovom kontekstu, protektivni učinci galaktoze mogli bi biti povezani s mitohormezom (796).

Hipoteza da su zaštitni učinci galaktoze nerazdvojni od poticanja stvaranja slobodnih radikala tek treba biti detaljnije istražena. Međutim, ukoliko se pokaže istinitom, implikacije hipoteze mogle bi biti važne za razumijevanje fizioloških i patofizioloških uloga ovog jedinstvenog monosaharida. Bolji uvid u mehanizme kojima galaktoza upravlja staničnim metaboličkim odgovorom mogao bi pomoći u razumijevanju: i) patofiziološke pozadine starenja u životinjskim modelima koji se temelje na dugoročnoj parenteralnoj primjeni galaktoze; ii) protektivnih učinaka galaktoze u STZ-icv štakorskom modelu AB-a; iii) poremećaju biokemijskih putova u nekim nasljednim bolestima; iv) još uvijek nerazjašnjene fiziološke i evolucijske uloge galaktoze. Što se tiče životinjskih modela, razumijevanje tanke linije između

hormezom posredovane aktivacije zaštitnih staničnih mehanizama i štetnih posljedica zasićenja metaboličkih puteva, moglo bi pružiti kontekst važan za shvaćanje paradoksalnih rezultata životinjskih studija s galaktozom. Uloga načina primjene i odnosa doze i učinka ključne su komponente pokusa s galaktozom koje još nisu dovoljno istražene. Obzirom da trenutni dokazi govore u prilog važnosti metaboličkog kapaciteta stanice za galaktozu kao jednog od ključnih čimbenika patofizioloških posljedica povećane izloženosti galaktozi te da doza i način primjene određuju lokalnu izloženost galaktozi različitih tkiva, razumijevanje navedenih koncepata potrebno je za tumačenje rezultata životinjskih studija. Rezultati brojnih studija ukazuju na štetni učinak parenteralno primijenjene D-galaktoze (507,756), a oralni tretman galaktozom pokazuje neuroprotektivne učinke u istraživanjima na štakorskom modelu sAB-a (330,376,497). Predložena su različita objašnjenja navedenog nesuglasja. Primjerice, pokazano je da za razliku od intraperitonealnog tretmana, oralni tretman D-galaktozom dovodi do poticanja lučenja neuroprotektivnog inkretina GLP-a 1 (376), a predloženo je i da su neuroprotektivni učinci posredovani modulacijom crijevnog mikrobioma i stimulacijom aferentnih završetaka vagusa (797). Drugo moguće objašnjenje je i znatno veća i brža izloženost galaktozi nakon intraperitonealne primjene. Primjerice, koncentracija galaktoze u plazmi dvostruko je veća nakon intraperitonealne primjene nego nakon dostave iste doze galaktoze putem orogastrične sonde (208% i 111% porast u intraperitonealno i oralno tretiranih životinja u usporedbi s kontrolom) u STZ-icv štakora 15 min nakon tretmana (376). U pokusu koji je proveden u sklopu ove disertacije, a u kojem su istraženi učinci jednokratnog akutnog oralnog davanja galaktoze, nije uočen porast koncentracije galaktoze u plazmi već 30 min nakon tretmana orogastričnom sondom što govori da je većina galaktoze već apsorbirana i metabolizirana u ovom vremenskom periodu. Važnost lokalne dinamike dostupnosti galaktoze odražena je i u opažanjima da D-galaktoza ostvaruje blagotvorne učinke na kognitivnu izvedbu nakon potkožne primjene (528). Osim toga, iako se probavni sustav ponaša kao pufer koji vremenski i kvantitativno ograničava izloženost ostalih tkiva galaktozi, oralna primjena može imati štetne posljedice u određenim uvjetima. Čini se da dugotrajni oralni tretman galaktozom može imati štetne posljedice ukoliko se galaktoza daje na način da se ponovljeno primjenjuje bolus doziranje putem orogastrične sonde, čak i ako se radi o malim dozama (527,798). Sa stajališta hormetske hipoteze, lokalne razlike u staničnoj dostupnosti galaktoze koje su posljedica različitog eksperimentalnog dizajna (npr. odabir doze, farmakokinetika), mogle bi objasniti neke oprečne rezultate. Primjerice, u istraživanjima istraživačke skupine prof. Šalković-Petrišić, neuroprotektivni učinci galaktoze ostvareni su otapanjem u vodi za piće dostupnoj *ad libitum* (376,497). Zanimljivo, koncentracija galaktoze u plazmi u tretiranih

životinja nije bila promijenjena ili je čak bila snižena u usporedbi s kontrolnih životinjama što govori da nije došlo do zasićenja metaboličkog kapaciteta za galaktozu (376). Drugi važan čimbenik su moguće razlike koje nastaju zbog poremećenog metabolizma zbog kojeg bi pojedini životinjski modeli ili vrste mogli biti osjetljiviji na hormetski učinak galaktoze. Iako rezultati pokusa provedenih u sklopu ove disertacije govore da neuroprotektivni učinci nisu specifični za STZ-icv model, već da postoje i u kontrolnih životinja (u pokusu u kojem su životinje bile razdvojene tijekom kronične primjene oralne galaktoze u vodi za piće), većina trenutno dostupnih rezultata o blagotvornim učincima galaktoze temelji se na istraživanjima u štakorskom modelu AB-a u kojem metabolizam galaktoze još nije istražen. Naposljetku, koncept hormeze intrinzično ovisi o kompenzatornom kapacitetu stanice te je izvjesno da neka patofiziološka stanja mogu narušiti učinkovitost navedenog pristupa, umanjujući mogućnost stanice da izdrži stimulaciju kontroliranom noksom ili odgovori adaptivnom blagotvornom hiperkompenzacijom zaštitnih mehanizama nakon povlačenja podražaja.

### **6.3.3. Akutni učinci D-galaktoze na redoks homeostazu probavnog sustava *ex vivo***

Obzirom na rezultate *in vivo* istraživanja koji su pokazali da jednokratna akutna oralna primjena D-galaktoze blagotvorno utječe na redoks homeostazu u tankom crijevu štakora (Slika 32, Slika 33, Slika 34, Slika 35, Slika 36, Slika 37), provedena su *ex vivo* istraživanja u kojima je ispitan mogući protektivni učinak galaktoze tijekom egzogene oksidativne nokse izazvane inkubacijom u prisutstvu AAPH-a i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u izoliranim tkivnim prstenovima kontrolnih i STZ-icv štakora (Slika 43, Slika 44, Slika 45, Slika 46, Slika 47). Model *ex vivo* oksidacijskog izazova ukazao je na pad kapaciteta kompenzatornog odgovora u tkivnim prstenovima izoliranim iz STZ-icv životinja. Duodenalni prstenovi kontrolnih životinja su na inkubaciju u prisutnosti AAPH-a i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> odgovorili povećanjem reduktivnog kapaciteta dok je u STZ-icv tkivu odgovor izostao ili je opažen pad (Slika 43). Bazalno, analiza reduktivnog kapaciteta metastabilnim ABTS radikal-kationom pokazala je da ne postoji naglašena razlika, a NRP analiza pokazala je da tkivo STZ-icv životinja ima nešto viši reduktivni kapacitet u usporedbi s kontrolnom skupinom. Bazalni reduktivni kapacitet izmjeren NRP-om u tkivu STZ-icv životinja odgovarao je približno vrijednostima kontrolnih tkivnih prstenova nakon inkubacije u H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Slika 43). Opažena razlika vjerojatno odražava različitu osjetljivost navedenih pokusa na pojedine sastavnice nukleofilne grane redoks homeostaze, a jedna i druga

analiza potvrđuju nemogućnost dodatnog kompenzatornog odgovora u STZ-icv tkivu. Zanimljivo, u kontrolnoj je skupini ko-inkubacija s galaktozom poništila povećanje reduktivnog kapaciteta u odgovoru na AAPH što bi moglo ukazivati na smanjenje podražaja za kompenzatornu aktivaciju nukleofilnog sustava. U STZ-icv prstenovima nije opažena promjena u odgovoru u prisutnosti galaktoze. Tijekom inkubacije s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u kontrolnom tkivu galaktoza nije ostvarila nikakav učinak, a u STZ-icv prstenovima opažen je dodatni pad. Slični su rezultati opaženi i tijekom procjene reduktivnog kapaciteta pomoću NRP metode. U kontrolnoj skupini galaktoza je dovela do pojačanog kompenzatornog odgovora na oksidaciju (više izraženo tijekom inkubacije s AAPH-om), a u STZ-icv tkivu nije bilo promjena (AAPH) ili je galaktoza uzrokovala dodatni pad reduktivnog kapaciteta. Izostanak odgovora STZ-icv tkiva na oksidativnu noksiju i na ko-inkubaciju s D-galaktozom moguće je objasniti na temelju prethodnih zapažanja. Naime, u *in vivo* pokusu s jednokratnom akutnom oralnom primjenom D-galaktoze (Slika 32), uočeno je da su blagotvorni učinci galaktoze u tkivu zdravih životinja bili povezani s trošenjem nukleofilnih supstrata (LMWT, NADPH). Slično, kompenzatorni odgovor stanice na oksidativnu noksiju uvelike ovisi o kapacitetu stanice da poveća nukleofilni tonus (sintezom NADPH-a i GSH-a) te mogućnosti da iskoristi sintetizirane reduktivne ekvivalente u enzimskim i ne-enzimskim reakcijama neutralizacije elektrofila. Obzirom da je u tkivu STZ-icv životinja izostao i kompenzatorni odgovor na inkubaciju s oksidansima i odgovor na ko-inkubaciju s galaktozom, moguće je da odsutnost reaktivnosti STZ-icv tkiva odražava nedostatke zaliha reduktivnih supstrata i/ili nemogućnost aktivacije puteva sinteze LMWT-a i NADPH-a. Navedeno je u skladu s rezultatima analize redoks homeostaze *in vivo* (Slika 3) jer je mogućnost povećanja nukleofilnog tonusa sintezom reduktivnih ekvivalenata ključan čimbenik za očuvanje redoks ravnoteže stanice. Osim toga, u duodenumu STZ-icv životinja opaženo je smanjenje tiola niske molekularne mase, što govori u prilog navedenoj hipotezi (Slika 3). Rezultati *ex vivo* pokusa također pružaju dokaze koji idu u prilog hormetskoj hipotezi djelovanja galaktoze obzirom da se čini da je potrebna endogena rezerva kako bi se potaknuo protektivni potencirajući učinak galaktoze. *Ex vivo* analiza disocijacije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> također je u skladu s rezultatima iz *in vivo* pokusa i pokazuje povećanu aktivnost katalaze u STZ-icv duodenumu uz nemogućnost dodatnog povećanja tijekom inkubacije u oksidirajućim uvjetima sa ili bez D-galaktoze. Suprotno, u kontrolnim tkivnim prstenovima, aktivnost katalaze povećana je tijekom inkubacije s oksidansima, a dodatak D-galaktoze uz H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> posebno povećava aktivnost, što je u skladu s rezultatima pokusa s jednokratnim akutnim oralnim tretmanom otopinom D-galaktoze (Slika 35). Analiza aktivnosti peroksidaza pokazala je da D-galaktoza uzrokuje povećanje tijekom ko-inkubacije s AAPH-om koje je više naglašeno u

kontroli. Suprotno, ko-inkubacija  $H_2O_2$  i D-galaktoze dovodi do povećanja u kontroli, ali ne dovodi do promjene u STZ-icv tkivu u kojem je aktivnosti povećana bazalno tijekom inkubacije s  $H_2O_2$ . Potonje govori u prilog prethodnim zapažanjima da su zalihe reduktivnih ekvivalenata smanjene u tkivu probavnog sustava STZ-icv životinja jer i) u STZ-icv tkivu dolazi do povećanja aktivnosti tijekom inkubacije u prisutnosti  $H_2O_2$  (što bi moglo odražavati sniženi bazalni kapacitet neutralizacije elektrofila, moguće zbog smanjenog kapaciteta odgovora povećanjem aktivnosti SOD-a (Slika 44)); ii) ko-inkubacija s D-galaktozom ne dovodi do povećanja aktivnosti peroksidaza u STZ-icv životinja (za što su potrebni reduktivni supstrati (npr. GSH za GPx)). Zanimljivo, analiza TBARS-a nije pokazala značajne razlike između CTR i STZ tkiva tijekom inkubacija s oksidansima sa ili bez D-galaktoze (Slika 46). Sve zajedno, rezultati *ex vivo* pokusa potvrđuju *in vivo* zapažanja, ali upućuju da D-galaktoza ima ograničen protektivni učinak tijekom ko-inkubacije s oksidansima. Osim toga, čini se da tkivo STZ-icv životinja nema endogeni kapacitet da akutno iskoristi D-galaktozu za stabilizaciju redoks homeostaze, što bi moglo biti zbog nedostatka nukleofilnog tonusa za koji je *in vivo* pokus jednokratnog akutnog oralnog tretmana D-galaktozom pokazao da je spregnut s blagotvornim učinkom na redoks sustav. Opažene rezultate treba tumačiti oprezno, budući da: i) *ex vivo* uvjeti ne odražavaju sve fiziološke i patofiziološke aspekte koji su prisutni *in vivo*; ii) *ex vivo* inkubacija (s oksidansima i sa ili bez galaktoze) provedena je tijekom 30 minuta te rezultati ne odražavaju nužno promjene u drugom vremenskom periodu; iii) *ex vivo* inkubacija provedena je u uvjetima „umjerenog“ oksidativnog opterećenja te rezultati pokusa ne odražavaju učinke blagog ili snažnog oksidativnog opterećenja; iv) *ex vivo* inkubacija s D-galaktozom provedena je uz 100 mM koncentraciju, što ne odražava nužno uvjete postignute *in vivo*. Npr. akutna oralna otopina D-galaktoze u *in vivo* pokusu bila je izvorne koncentracije od 0,55 M što se mijenjalo miješanjem s intraluminalnim izlučevinama i sadržajem te prolaskom kroz tanko crijevo gdje se D-galaktoza apsorbira. Posljedično nije moguće precizno odrediti izloženost sluznice niti vjerno oponašati moguću interakciju s drugim intraluminalnim sadržajem i uvjetima (npr. pH).



### **6.3.4. Kronični učinci D-galaktoze u STZ-icv štakorskom modelu Alzheimerove bolesti**

#### **6.3.4.1. Kronični učinci oralnog tretmana D-galaktozom na objektno pamćenje u STZ-icv štakorskom modelu Alzheimerove bolesti**

Dosadašnja istraživanja pokazala su da kronični oralni tretman D-galaktozom ostvaruje neuroprotektivne učinke te sprječava (497) i poništava već razvijene (537) kognitivne poremećaje u STZ-icv štakorskom modelu AB-a (797). Opisani neuroprotektivni učinci D-galaktoze vjerojatno su ovisni o načinu primjene D-galaktoze. *Ad libitum* kronični oralni tretman s D-galaktozom otopljenom u vodi za piće (200 mg/kg) pokazuje blagotvorne učinke (497,528,537), a kronični tretman ponavljanim davanjem putem orogastrične sonde (100 mg/kg) uzrokuje poremećaj kognitivnih funkcija (799)). Kognitivni učinci *ad libitum* tretmana vrlo velikim dozama D-galaktoze još nisu istraženi, ali poznato je da i kronični tretman dozama od 300 mg/kg ostvaruje neuroprotektivne učinke usporedive onima koji su opisani tijekom tretmana s ~34% manjom dozom (497). Obzirom da *ad libitum* tretman vrlo velikom dozom D-galaktoze u hrani nije uspio polučiti očekivane proupalne učinke (koji su povezani s ponavljanim parenteralnim tretmanom ili tretmanom putem orogastrične sonde koji uzrokuju poremećaje pamćenja)(752), moguće je da čak i vrlo visoke doze primijenjene na ovaj način ne uzrokuju poremećaj pamćenja (ili čak ostvaruju blagotvorne učinke). Osim što način primjene i doza D-galaktoze tijekom kroničnog tretmana vjerojatno imaju važan utjecaj na ishod u testovima pamćenja, istraživanja pokazuju da postoji vremenski prozor u kojem D-galaktoza može ostvariti blagotvorne učinke. Primjerice, Chogtu i suradnici pokazali su da potkožna i oralna primjena D-galaktoze može ostvariti blagotvorne i štetne učinke ovisno o trajanju tretmana (528). Osim toga, iako kronična oralna primjena D-galaktoze u dozi od 200 mg/kg (*ad libitum*) sprječava i poništava kognitivnu disfunkciju u STZ-icv štakorskom modelu AB-a (497,537), Babić Perhoč i suradnici pokazali su da tretman D-galaktozom ne može poništiti nastale kognitivne deficite ukoliko je uveden 4 mjeseca nakon intracerebroventrikularne primjene STZ (330). Naposljetku, većina istraživanja koja pokazuju blagotvorne učinke D-galaktoze provedena su u STZ-icv štakorskom modelu AB (330,497,537,797) te nije jasno u kolikoj su mjeri opisani učinci specifični za model bolesti. Međutim, studija Chogtu i suradnika pokazala je da D-galaktoza može ostvariti blagotvorne učinke i u kontrolnih štakora (nakon oralne i potkožne primjene)(528), što govori u prilog mogućnosti generalizacije nekih opažanja iz studija na STZ-icv modelu.

U studiji provedenoj u sklopu ove disertacije istražen je učinak kroničnog oralnog tretmana D-galaktozom (200 mg/kg; 8 tjedana; *ad libitum* u vodi za piće). Za razliku od prethodnih sličnih studija (330,497,537), u kojima su tijekom tretmana štakori bili u zasebnim kavezima (kako bi se osigurala primjena pune doze tretmana svakoj životinji) tijekom noći nakon čega su boravili u zajedničkim kavezima u vremenu od 8 sati (kako bi se izbjegao učinak socijalne izolacije), u ovom pokusu štakori su cijelo vrijeme pokusa boravili u zasebnim kavezima. Učinak socijalne izolacije na kognitivne sposobnosti i homeostazu središnjeg živčanog sustava intenzivno se istražuje, a poznato je i da socijalna izolacija predstavlja rizični faktor za razvoj AB-a (800,800–804). Međutim, primarni cilj provedenog pokusa bio je istražiti učinak STZ-a i tretmana D-galaktozom na homeostazu probavnog sustava i crijevni mikrobiom, a boravak u zajedničkom kavezu omogućava modulaciju oba faktora (npr. putem koprofagije). Kao i u prethodnim istraživanjima, 4 tjedna nakon tretmana STZ-icv životinje pokazale su poremećaj objektnog pamćenja (Slika 48). Neočekivano, u STZ-icv štakorskom modelu AB-a, opažen je i trend hipersocijalnog ponašanja koji nalikuje fenotipu životinjskih modela poremećaja pažnje s hiperaktivnošću (ADHD; *engl. attention deficit hyperactivity disorder*), prije nego što su životinje bile razdvojene što bi moglo ukazivati na poremećaj dopaminergičkog sustava (346,805). Nakon 4 i 8 tjedana tretmana D-galaktoza je popravila objektno pamćenje u STZ-icv štakorskom modelu AB-a, a smanjila razvoj kognitivne disfunkcije u socijalno izoliranih kontrolnih životinja (Slika 48). Tijekom vremena opažen je očekivani porast naklonjenosti društvenom kontaktu koji odražava usamljenost tijekom socijalne izolacije. U provedenom eksperimentu po prvi put je pokazano da D-galaktoza blagotvorno djeluje na razvoj kognitivnog oštećenja koje nastaje uslijed socijalne izolacije što bi moglo imati važne posljedice za razumijevanje mehanizma djelovanja D-galaktoze te razvoj strategija za liječenje i sprječavanje nastanka kognitivne disfunkcije (Slika 48).

#### **6.3.4.2. Kronični učinci oralne D-galaktoze na probavni sustav u STZ-icv štakorskom modelu Alzheimerove bolesti**

##### **6.3.4.2.1. Kronični učinci oralne D-galaktoze na redoks homeostazu probavnog sustava u STZ-icv štakorskom modelu Alzheimerove bolesti**

Primarni cilj provedenog istraživanja bio je ispitati učinke kroničnog oralnog tretmana D-galaktozom na homeostazu probavnog sustava u STZ-icv štakorskom modelu AB-a. Prethodni rezultati pokazali su da je poremećaj crijevne homeostaze u STZ-icv modelu AB-a povezan s redoks dishomeostazom (534,535,553). Obzirom na povezanost redoks homeostaze s očuvanjem strukture i funkcije crijevne barijere, moguće je da poremećaj crijeva sudjeluje u nastanku ili progresiji neurodegenerativnih promjena u STZ-icv modelu. Kronični oralni tretman D-galaktozom pokazao je neuroprotektivne učinke u STZ-icv štakorskom modelu AB-a (330,497,537), a istraživanje učinaka jednokratnog oralnog davanja D-galaktoze pokazalo je da bi galaktoza mogla djelovati u crijevu i stabilizirati redoks homeostazu (554). Obzirom na navedeno, primarni cilj ovog pokusa bio je ispitati može li dugotrajna primjena oralne D-galaktoze poništiti poremećenu redoks homeostazu u crijevu STZ-icv štakorskog modela AB-a, te ispitati povezanost između utjecaja na redoks homeostazu i objektnog pamćenja nakon 8 tjedana tretmana. Analiza redoks homeostaze duodenuma, ileuma i kolona, pokazala je da: i) postoje tek skromne promjene redoks homeostaze u STZ-icv crijevu 12 tjedana nakon intracerebroventrikularne primjene STZ-a, što govori da tijekom promjena u probavnom sustavu nije progresivan niti linearan; ii) kronični tretman D-galaktozom ne ostvaruje iste učinke kao akutni tretman; iii) postoji naglašena interakcija tretmana STZ i D-galaktozom što govori da učinke D-galaktoze u crijevu STZ-icv štakora nije moguće predvidjeti na temelju analize učinaka u kohorti kontrolnih životinja (Slika 49, Slika 50). Obzirom da su u ovom istraživanju opaženi neuroprotektivni učinci te da su učinci na redoks homeostazu u probavnom sustavu bili slabo izraženi, a kronično peroralno davanje D-galaktoze u vodi za piće nije bilo povezano s normalizacijom navedenih promjena, trenutni rezultati upućuju na to da kronični oralni tretman D-galaktozom ne ostvaruje svoje učinke putem modulacije redoks sustava crijeva u STZ-icv štakorskom modelu AB-a. Štoviše, učinci koji su pokazali najizraženiju interakciju tretmana STZ-om i D-galaktozom (SH, NRP i  $\delta$ ABTS u kolonu) govore u prilog potencijalno štetnog, a ne zaštitnog lokalnog učinka u crijevu.

#### **6.3.4.2.2. Kronični učinci oralne D-galaktoze na cecalne kratkolančane masne kiseline i masne kiseline razgranatog lanca u STZ-icv štakorskom modelu Alzheimerove bolesti**

Osim utjecajem na redoks homeostazu u probavnom sustavu, kronični oralni tretman D-galaktozom mogao bi ostvariti neuroprotektivne učinke modulacijom crijevnog mikrobioma i metaboloma. SCFA i masne kiseline razgranatog lanca (BCFA; *engl. branched chain fatty acids*) važni su metaboliti posrednici putem kojih crijevna mikrobiota može utjecati na homeostazu čitavog organizma. Osim što imaju ključnu ulogu u homeostazi probavnog sustava i regulaciji sustavnog energetskeg metabolizma, SCFA i BCFA raspodijeljene su cirkulacijom po čitavom organizmu gdje putem epigenetske modulacije (npr. tkivno specifičnom modulacijom acetilacije histona 3 i 4) mijenjaju funkciju većine tkiva u organizmu sisavaca (806,807). Osim perifernih učinaka, SCFA i BCFA ostvaruju znatan učinak i u središnjem živčanom sustavu i to posredno modulacijom metabolizma, neuroimunoendokrine osi, te učinkom na strukturu krvno-moždane barijere (806,808). Komunikacija između crijevne mikrobiote i probavnog sustava i središnjeg živčanog sustava putem SCFA-a i BCFA-a važna je i u kontekstu AB-a obzirom da prikupljeni dokazi upućuju da bi na ovaj način disbioza mogla poticati poremećaj inzulina u mozgu, neuroupalu, i dishomeostazu A $\beta$ -a i proteina tau (809,810). SCFA i BCFA dosad nisu nikad bili istraženi u STZ-icv štakorskom modelu AB-a. Rezultati analize cecalnog sadržaja SCFA-a i BCFA-a pokazali su da kronični oralni tretman D-galaktozom mijenja obrazac intraluminalne koncentracije i zastupljenosti masnih kiselina. Osim neznatnog povećanja propionata u STZ-icv štakora, nisu uočene razlike između kontrolnih štakora i modela AB-a. Kronični oralni tretman D-galaktozom uzrokovao je smanjenje zastupljenosti svih izmjerenih SCFA-a (acetata, propionata, butirata, i valerata) te povećanje zastupljenosti BCFA-a (izovalerata i izobutirata)(Slika 51). Opisani učinak opažen je u obje skupine životinja (CTR i STZ-icv) te nije bilo naglašene interakcije. Opažene promjene mogle bi blagotvorno utjecati na kognitivnu funkciju. Primjerice, u studiji Marizzoni i suradnika, opisana je pozitivna korelacija upalnih parametara (cirkulirajućih proupalnih citokina i lipopolisaharida), biljega endotelne disfunkcije i standardiziranog omjera vrijednosti vezanja florbetapira, probe za pozitronsku emisijsku tomografiju A $\beta$ -a, s cirkulirajućom koncentracijom acetata i valerata (809). Međutim, u navedenoj korelacijskoj studiji opaženo je i da je koncentracija cirkulirajućeg butirata povezana s koncentracijom protuupalnih citokina poput IL-a 10. Opažene rezultate treba tumačiti s oprezom obzirom na malu veličinu učinaka i oprečna zapažanja u literaturi. Primjerice, iako je acetat u nekim studijama bio povezan s

neuropalom, nakupljanjem A $\beta$ -a, i endotelnom disfunkcijom (809), u drugim istraživanjima, u pravilu u životinjskim modelima, pokazano je kako acetat može ublažiti kognitivnu disfunkciju, te smanjiti neuropalu, aktivaciju mikroglije, i stvaranje IL-a 1 $\beta$  (811).

#### **6.3.4.2.3. Kronični učinci oralne D-galaktoze na crijevni mikrobiom u STZ-icv štakorskom modelu Alzheimerove bolesti**

Obzirom da kronični oralni tretman D-galaktozom može promijeniti metabolite crijevne mikrobiote, moguće je da tretman D-galaktozom ostvaruje neuroprotektivni potencijal modulacijom mikrobioma i mogućim sprječavanjem disbioze u STZ-icv štakorskom modelu AB-a. Crijevna mikrobiota nikad prije nije istražena u STZ-icv štakorskom modelu AB-a, a učinak oralnog tretmana D-galaktozom ispitan je u tek nekoliko studija. Kim i suradnici ispitivali su učinak oralne D-galaktoze u modelu atopijskog dermatitisa izazvanog 2,4-dinitroklorbenzenom u BALB/c miševa (620). Oralni tretman D-galaktozom u trajanju od 2 tjedna ublažio je fenotipska obilježja atopijskog dermatitisa (opaženo je smanjenje crvenila, perutanja i sušenja kože te ekzorijacije) (620). Tretman D-galaktozom smanjio je povećanje slezene i limfnih čvorova te koncentraciju imunoglobulina E u serumu što govori u prilog protuupalnih učinaka (620). Na histopatološkoj razini, tretman D-galaktozom smanjio je infiltraciju eozinofila i mastocita u kožu te spriječio 2,4-dinitroklorbenzenom uzrokovano zadebljanje epidermisa. Kao pretpostavljeni mehanizam protuupalnog djelovanja D-galaktoze, predložena je blagotvorna modulacija crijevnog mikrobioma karakterizirana povećanjem raznolikosti te smanjenjem zastupljenosti koljena *Firmicutes* uz povećanje zastupljenosti koljena *Bacteroidetes*. Stahel i suradnici ispitivali su učinak mliječnih šećera na inzulinsku rezistenciju i mikrobiotu te su opisali da dijeta koja sadržava 15% galaktoze povećava osjetljivost na inzulin i količinu jetrenog glikogena i blagotvorno utječe na crijevni mikrobiom smanjenjem *Firmicutes:Bacteroidetes* omjera (812). Zanimljivo, još je jedna studija pokazala protektivne učinke D-galaktoze ostvarene putem modulacije crijevnog mikrobioma, međutim, u njoj su ispitani učinci intraperitonealno primijenjene D-galaktoze i to u visokim dozama (750 mg/kg/dan)(529). Intraperitonealna primjena D-galaktoze zaštitila je C57BL/6 miševe od ozljede ozračivanjem i to modulacijom crijevne mikrobiote što je potvrđeno posredno s obzirom da je fekalna transplantacija iz miševa tretiranih D-galaktozom u ozračene miševe također povećala preživljenje i blagotvorno djelovala na upalne parametre (529). U istraživanju provedenom u sklopu ove disertacije opaženo je da je u STZ-icv životinja mjera  $\alpha$  raznolikosti

neznatno povećana, ali i karakterizirana visokom biološkom varijabilnosti unutar skupine, što bi moglo odražavati činjenicu da, ovisno o pokusu, u 10-20% životinja ne nastaju promjene nalik na neurodegeneraciju nakon STZ-icv postupka (moguće zbog biološke otpornosti samih životinja ili zbog metodoloških razloga(530)). Tretman D-galaktozom povećao je vrijednost 4 različita indeksa  $\alpha$  raznolikosti u STZ-icv životinja (*Shannon, Simpson, Chao1, Observed*), a u kontrolnoj skupini opaženo je povećanje samo prilikom analize indeksa *Shannon* i *Simpson*. Međutim, navedene su vrijednosti odražavale relativno skromne učinke. Analiza crijevnog mikrobioma na razini koljena pokazala je trend smanjenja koljena *Firmicutes* i povećanja koljena *Bacteroidetes* u kontrolnih i STZ-icv životinja. Omjer mnoštva *Firmicutes/Bacteroidetes* (F/B) smatra se jednim od važnih pokazatelja crijevne disbioze povezane s izražajem proupalnih biljega. Primjerice, povišen F/B omjer povezan je s izražajem IL-a 1 $\beta$ , IL-a 6, IL-a 8 i TLR-a 2, 4 i 5 te rizikom od razvoja šećerne bolesti (813,814), a gubitak tjelesne mase povezan je sa smanjenjem omjera (815). U životinjskim je modelima povećan omjer F/B povezan s upalom (primjerice u modelima moždanog udara i starenja), a intervencije koje smanjuju F/B povezane su sa smanjenjem upale i boljim preživljenjem (816). U presječnoj studiji Sajia i suradnika pronađeno je da je F/B omjer povećan u bolesnika s demencijom u usporedbi s kontrolnom skupinom (817). Međutim, postoje i oprečni podaci koji pokazuju da bi smanjeni F/B omjer mogao biti štetan, a ne blagotvoran. Primjerice, Vogt i suradnici pronašli su smanjenje zastupljenosti koljena *Firmicutes*, te povećanje koljena *Bacteroidetes* u ljudi oboljelih od AB, u usporedbi s kontrolnom skupinom (818). U životinjskim modelima za oba su koljena pronađeni dokazi smanjenja i povećanja u usporedbi s kontrolnom skupinom, što bi moglo odražavati metodološke razlike (819). Međutim, uzrok opažene varijabilnosti nije do kraja razjašnjen te se čini da dob životinja, dijeta i tip modela nisu uzrok varijabilnosti, iako bi spol životinja mogao biti važan čimbenik koji nije uzet u obzir (819). Pad omjera F/B također je u nekim studijama povezan sa starenjem (820), a neki su istraživači u pojedinim kohortama opisali smanjenje udjela koljena *Firmicutes* u AB-u u usporedbi s blagim kognitivnim oštećenjem i kontrolnom skupinom (821). Analiza učinka STZ-icv i kroničnog oralnog tretmana D-galaktozom na crijevni mikrobiom na razini porodice pokazala je da D-galaktoza povećava udio porodice *Rikenellaceae* i *Prevotellaceae*, a smanjuje *Lactobacillaceae* i *Eubacterium coprostanoligenes*. U STZ-icv bila je smanjena zastupljenost *Rikenellaceae*, a povećana zastupljenost *Oscillospira* u usporedbi s kontrolom (Slika 55). Crijevni mikrobiom u bolesnika s blagim kognitivnim oštećenjem i AB-om, pokazuje smanjeni udio porodice *Rikenellaceae* u usporedbi s mikrobiomom zdravih kontrola (822), a slične su promjene zapažene i u životinjskim modelima bolesti (823). Modulacija crijevnog mikrobioma

koja rezultira povećanjem udjela *Rikenellaceae* povezana je s boljom kognitivnom funkcijom u C57BL/6 miševa (824). Treba napomenuti da, kao i kod drugih sastavnica mikrobioma, postoje dokazi koji pokazuju da je zastupljenost *Rikenellaceae* u AB-u povećana (825). U APP/PS1 mišjem modelu AB-a pronađena je smanjena zastupljenost porodice *Prevotellaceae* u usporedbi s kontrolnim miševima, a slične su promjene opisane općenito za neurodegenerativne bolesti (npr. PB)(826). Kronična oralna primjena D-galaktoze smanjila je zastupljenost porodice *Lactobacillaceae*, a povećana prisutnost ove porodice zabilježena je u bolesnika s neurodegenerativnim poremećajima (252,827). Analiza na razini rodova pokazala je da kronični tretman D-galaktozom povećava udio roda *Tuzzerella* za koji su istraživanja pokazala da je smanjen u oboljelih od AB-a (828). Kronični oralni tretman D-galaktozom također povećava prisutnost roda *Alistipes* te smanjuje zastupljenost roda *Family\_XIII\_UCG\_001*, međutim, fiziološka i patofiziološka važnost ovih rodova još nije dostatno istražena.

#### **6.3.4.2.4. Kronični učinci oralne D-galaktoze na inkretinski sustav u STZ-icv štakorskom modelu Alzheimerove bolesti**

Jedan od mogućih mehanizama djelovanja kroničnog oralnog tretmana D-galaktozom mogla bi biti modulacija lučenja inkretina (797) obzirom da brojni dokazi govore u prilog njihovom neuroprotektivnom djelovanju (443,829–835). Prethodna istraživanja pokazala su da akutna i kronična oralna primjena D-galaktoze dovode do povećanja koncentracije cirkulirajućeg aktivnog GLP-a 1 u STZ-icv štakorskom modelu AB-a što bi moglo objasniti blagotvoran učinak kronične oralne primjene D-galaktoze na metabolizam glukoze i kognitivne funkcije (537). U pokusu provedenom u sklopu ove disertacije koncentracija cirkulirajućeg GLP-a 1 također je bila smanjena u STZ-icv životinja, a kronični oralni tretman D-galaktozom povećao je vrijednosti za ~75% u prosjeku, čime su postignute koncentracije usporedive izmjerenima u kontroli (Slika 52). Zanimljivo, iako je tretman galaktozom povećao vrijednosti GLP-a 1 samo u STZ-icv životinja, vrijednosti GIP-a bile su veće za 50-60% u obje skupine tretiranih životinja u usporedbi s netretiranima. S obzirom da je većina promjena vezanih uz SCFA, BCFA i crijevni mikrobiom pokazivala izostanak interakcije, promjene GIP-a (ali ne nužno i GLP-a 1), mogle bi biti vezane uz opisane promjene mikrobiote.

### **6.3.5. Kronični učinci oralne D-galaktoze u 6-OHDA štakorskom modelu Parkinsonove bolesti**

#### **6.3.5.1. Kronični učinci oralne D-galaktoze na motoričku funkciju i objektno pamćenje u 6-OHDA štakorskom modelu Parkinsonove bolesti**

Učinak kroničnog oralnog tretmana D-galaktozom ispitan je u 6-OHDA modelu PB-a na temelju hipoteze da bi blagotvorni učinci D-galaktoze, opisani u STZ-icv štakorskom modelu AB-a, mogli djelovati na tijek razvoja patologije i u drugim modelima neurodegenerativnih bolesti. Učinak D-galaktoze dosad nije ispitan u modelima PB-a *in vivo*. Međutim, istraživanja Powers i suradnika pokazala su da zamjena glukoze iz medija za stanične kulture galaktozom štiti stanice od toksičnog učinka N,N'-dimetil-4,4'-bipiridinij diklorida (parakvata) – herbicida koji uzrokuje nakupljanje superoksidnih aniona i koristi se za modeliranje PB-a (402,403,836,837). U *in vivo* pokusu provedenom u sklopu ove disertacije, oralni tretman D-galaktozom u trajanju od 9 tjedana nije popravio motoričku funkciju u 6-OHDA životinja. Blagotvorni učinci D-galaktoze opisani u STZ-icv modelu AB-a mogli bi biti specifično vezani uz kognitivne funkcije te je ispitan učinak na objektno pamćenje u 6-OHDA modelu. Zanimljivo, iako se radi o malim učincima sa širokim intervalima pouzdanosti, kronični tretman D-galaktozom u prosjeku je štetno djelovao na objektno pamćenje u kontrolnih životinja (iako su učinci bili vrlo mali), dok je neznatan blagotvorni učinak opažen u 6-OHDA štakora (bez kontroliranja za motoričke simptome)(Slika 58). Međutim, s obzirom da je u pokusu opažena vrlo velika varijabilnost u odgovoru na 6-OHDA, životinje su raspodijeljene u skupine na temelju završne izvedbe na rotirajućem cilindru kako bi se simulirala ugniježđena studija slučajeva i kontrola što bi omogućilo razumijevanje čimbenika rizika u uzorcima i mjerenjima provedenima tijekom pokusa. Stratifikacijom životinja opaženo je nekoliko učinaka: i) naglašena varijabilnost u odgovoru na 6-OHDA, što potvrđuje znatno razdvajanje skupina raspodijeljenih na temelju završne izvedbe; ii) nešto niža, iako još uvijek nepouzdana, procjena objektnog pamćenja u 6-OHDA životinja koje su razvile simptome u usporedbi sa 6-OHDA životinjama koje nisu razvile simptome (bez obzira jesu li tretirane D-galaktozom) i 6-OHDA životinja koje su razvile simptome, ali su tretirane D-galaktozom; iii) nešto niža masa u odnosu na dob u trenutku tretmana intrastrijatalnim 6-OHDA-om u životinja koje su imale smanjen rizik za razvoj motoričkih poremećaja, što bi moglo upućivati na dosad nepoznate metaboličke faktore rizika. Niža masa u odnosu na dob u trenutku izlaganja 6-OHDA-u pokazala se kao zaštitni faktor i u modelu u kojem je pripadnost leglu definirana kao kovarijata,



što dodatno potvrđuje da opaženi učinak nije vezan uz dob već predstavlja skup nepoznatih čimbenika koji vjerojatno utječu na tjelesnu masu. Zbog izrazite varijabilnosti u odgovoru na 6-OHDA tretman koji bi mogao biti rezultat nepoznatih (metaboličkih) čimbenika rizika te odražavati sustavnu pogrešku, učinak kroničnog oralnog tretmana D-galaktozom na motoriku u 6-OHDA štakora ispitan je u novom pokusu pomoću alternativnog dizajna u kojem je umanjena biološka varijabilnost odgovora: i) u nultoj točki uklanjanjem životinja s tjelesnom masom koja odskače od populacijske srednje vrijednosti; ii) u nultoj točki prikupljanjem podataka o bazalnoj izvedbi svih životinja što omogućava kasniju korekciju tijekom modeliranja; iii) u vremenskoj točki 10 dana nakon tretmana u trenutku u kojem su životinje na temelju izvedbe raspodijeljene u parove ujednačene po trenutnoj motoričkoj izvedbi i masi. Ispitivanje učinaka D-galaktoze potom je provedeno u parovima kako bi se osigurao balans u poznatim čimbenicima rizika i kako bi se otklonio šum izazvan nepoznatim čimbenicima rizika. Eksperimentalni dizajn prilagođen ispitivanju učinaka D-galaktoze u kontekstu opisanih poznatih čimbenika pokazao je da D-galaktoza doista nema protektivne učinke na motoričku izvedbu. Štoviše, mješoviti model u kojem su kao nezavisne varijable definirani tretman, vremenska točka (obzirom da su provedena ponavljanja ispitivanja motorike), masa životinje, te interakcija tretmana, vremenske točke i mase, uz identifikator životinje definiran kao nasumični učinak (kako bi se model prilagodilo za međuzavisnost opažanja uzrokovanu ponavljanim mjerenjima), pokazao je da bi tretman D-galaktozom mogao djelovati štetno na motoričku izvedbu 6-OHDA životinja.

#### **6.3.5.2. Kronični učinci oralne D-galaktoze na inkretinski sustav u 6-OHDA štakorskom modelu Parkinsonove bolesti**

Iako brojna istraživanja govore u prilog neuroprotektivnog učinka inkretina u PB-u (443,834,838–844), uloga endogenih inkretina u etiopatogenezi bolesti slabo je istražena. Neke studije ukazuju da je u ljudi oboljelih od PB-a smanjeno lučenje inkretina u odgovoru na obrok (845), međutim, nije poznato jesu li bazalne vrijednosti inkretina rizični čimbenik za razvoj simptoma PB-a. Osim toga, s obzirom da su istraživanja pokazala da kronična oralna primjena D-galaktoze može povećati bazalne vrijednosti inkretina u STZ-icv štakorskom modelu AB-a (537)(Slika 52), postoji mogućnost da tretman galaktozom ostvaruje slične učinke i u 6-OHDA modelu. U pokusu provedenom u sklopu ove disertacije, opaženo je da su bazalne vrijednosti

GLP-a 1 u plazmi ~20% više u štakora koji nisu razvili simptome PB-a nakon intrastrijatalnog tretmana 6-OHDA-om. Suprotno, štakori u kojih su simptomi bili najizraženiji imali su ~13% niže vrijednosti GLP-a 1 u plazmi (Slika 61), što bi moglo govoriti u prilog uloge GLP-a 1 u razvoju patološkog fenotipa u modelu PB-a. U kontekstu prethodno opisanih metaboličkih razlika (niža tjelesna masa u odnosu na dob u skupini štakora sa smanjenim rizikom razvoja patološkog fenotipa nakon primjene 6-OHDA-a), razlike u bazalnim vrijednostima GLP-a 1 u plazmi mogle bi odražavati ukupno metaboličko stanje organizma za koje se čini da je rizični čimbenik za osjetljivost na 6-OHDA. Zanimljivo, u štakora tretiranih 6-OHDA-om koji nisu imali simptome, a primali su D-galaktozu, vrijednosti GLP-a 1 bile su smanjene, dok je u štakora u kojih je došlo do razvoja simptoma učinak D-galaktoze bio obrnut te su vrijednosti bile slične onima kao u štakora s niskim rizikom koji nisu primali galaktozu (Slika 61). Opisani rezultati sugeriraju da bi patofiziološki mehanizmi povezani s razvojem fenotipa PB-a nakon tretmana 6-OHDA-om mogli biti posredno ili neposredno povezani s enteroendokrinim sustavom jer su povezani s promjenom lučenja inkretina u odgovoru na oralni tretman galaktozom. U cerebrospinalnom likvoru 6-OHDA-om tretiranih štakora nađene su neznatno više vrijednosti GLP-a 1 u usporedbi s kontrolnom skupinom. Osim toga, opaženo je da je tretman s D-galaktozom povezan s nižim vrijednostima u kontrolnoj skupini i u skupini štakora koji su imali povećani rizik za razvoj simptoma, dok je u skupini s nižim rizikom tretman D-galaktozom doveo do povišenih vrijednosti GLP-a 1 u središnjem živčanom sustavu. U kontekstu dizajna navedenog eksperimenta teško je razlučiti uzročno-posljedične veze navedenih parametara, međutim, moguće je da su povećane vrijednosti GLP-a 1 u središnjem živčanom sustavu djelovale protektivno te spriječile razvoj motoričkih poremećaja u podskupini štakora tretiranih 6-OHDA-om koji nisu razvili simptome. U ovom kontekstu, čini se da povišene vrijednosti GLP-a 1 u plazmi nisu ostvarile neuroprotektivan učinak neposredno jer su u skupini s niskim i visokim rizikom za razvoj simptoma (te visokim i niskim bazalnim vrijednostima GLP-a 1 u plazmi), vrijednosti GLP-a 1 u središnjem živčanom sustavu bile podjednake. Suprotno, moguće je da je biološki fenomen koji je doveo do pada vrijednosti GLP-a 1 u središnjem živčanom sustavu u odgovoru na tretman D-galaktozom povećao rizik u podskupini štakora koji su kasnije razvili izražene motoričke simptome (Slika 61).

Vrijednosti cirkulirajućeg GIP-a, koji također ostvaruje neuroprotektivne učinke u PB-u (846), bile su povećane u štakora s niskim rizikom za razvoj motoričkih simptoma PB-a nakon intrastrijatalnog tretmana 6-OHDA-om. Zanimljivo, u štakora koji nisu razvili simptome, tretman D-galaktozom bio je povezan s nižim vrijednostima GIP-a, dok u štakora s visokim

rizikom za razvoj simptoma nije bilo razlike u koncentraciji GIP-a u plazmi između štakora koji su bili tretirani galaktozom i onih koji nisu. Vrijednosti GIP-a u cerebrospinalnom likvoru odražavale su vrijednosti izmjerene u plazmi, što govori u prilog da bi GIP mogao biti protektivni čimbenik tijekom razvoja PB-a koji djeluje posredno (Slika 62). Na temelju dobivenih rezultata čini se da bi inkretini mogli djelovati kao endogeni protektivni čimbenici u 6-OHDA modelu PB-a, a na temelju učinaka agonista inkretinskih receptora u oboljelih od PB-a, čini se da bi sličnu ulogu mogli ostvarivati i u ljudi.

### **6.3.5.3. Kronični učinci oralne D-galaktoze na redoks homeostazu i funkciju probavnog sustava u 6-OHDA štakorskom modelu Parkinsonove bolesti**

Iako D-galaktoza nije pokazala neuroprotektivni učinak u kontekstu razvoja motoričkih deficita u 6-OHDA modelu PB-a, postoji mogućnost da kronični oralni tretman D-galaktozom u vodi za piće ostvaruje blagotvorne učinke u probavnom sustavu što bi moglo smanjiti razvoj i/ili progresiju gastrointestinalnih poremećaja kod oboljelih od PB-a i životinjskih modela PB-a (205,680,707,709,847–851). Jedan od mehanizama kojim bi D-galaktoza mogla ostvariti protektivne učinke u probavnom sustavu je modulacija redoks homeostaze (554) koja je ključna za očuvanje strukture i funkcije probavne barijere. Prethodno istraživanje, provedeno u sklopu ove disertacije, pokazalo je da mjerenjem 8 biljega redoks homeostaze (lipidna peroksidacija, koncentracija tiola niske molekularne mase, koncentracija slobodnih sulfhidrilnih skupina, aktivnost SOD-a, aktivnost Mn-SOD-a, ukupni kapacitet disocijacije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, kapacitet disocijacije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> neosjetljiv na AZD, NRP) u tri segmenta probavne cijevi (duodenum, ileum, kolon), 12 tjedana nakon bilateralne intrastrijatalne primjene 6-OHDA, nema znakova redoks dishomeostaze ni oksidativnog stresa u probavnom sustavu (Tablica 2, Slika 30, Slika 31). Međutim, u provedenom istraživanju ispitana je redoks homeostaza u homogenatima tkiva, a moguće je da su pojedini tipovi stanica više osjetljivi na elektrofilni podražaj. Obzirom na izraženu konstipaciju i promjene motoričkih obrazaca u životinjskim modelima PB-a, provedena je analiza oksidativnog oštećenja mišićnog sloja probavne cijevi pomoću imunofluorescencijske analize nitrotirozina (852–855). Zanimljivo, u štakora u kojih je razvijeno motoričko oštećenje, a nisu bili tretirani D-galaktozom, signal nitrotirozina u mišićnom sloju probavne cijevi bio je povećan, dok je u onih u kojih nije došlo do razvoja motoričkog oštećenja signal bio usporediv s onim izmjerenim u kontrolnoj skupini. Tretman D-galaktozom smanjio je signal bez obzira jesi li štakori razvili motoričke simptome ili ne, što

govori u prilog smanjenja oksidativnog opterećenja u stanicama glatkog mišićja probavne cijevi.

Smanjeno oksidativno opterećenje u 6-OHDA štakora tretiranih D-galaktozom moglo bi biti povezano s boljom funkcijom probavnog sustava bez obzira na izostanak blagotvornog učinka galaktoze na razvoj motoričkih simptoma. Funkcionalne analize probave govore u prilog postavljenoj hipotezi. Tretman D-galaktozom ostvario je učinak na neke indikatore funkcije probave poput ukupne mase i broj jedinica fecesa, te sadržaj izdvojene vode. Primjerice, tretman D-galaktozom nije bio povezan s promjenom ukupne mase fecesa proizvedene u 24 sata, bez obzira na ispoljavanje motoričkih simptoma u 6-OHDA modelu PB-a (životinje s razvijenim motoričkim simptomima neovisno o tretmanu galaktozom imale su veću ukupnu masu fecesa). Međutim, ovakav tretman normalizirao (smanjio) je broj jedinica fecesa proizvedenih u 24 sata u skupini životinja koja nije razvila motoričke simptome, a povećao ga je u skupini u kojoj je intrastrijatalni tretman uzrokovao pad motoričke funkcije, tako da su životinje s motoričkim simptomima imale podjednake vrijednosti slične onima koje nisu imale simptome (Slika 64). Ukupna masa fecesa korigirana za broj jedinica fecesa još je jasnije pokazala učinak D-galaktoze jer je u skupini s izraženim simptomima smanjila vrijednosti na one usporedive s životinjama bez simptoma te na one u kontrolnim skupinama. Nadalje, tretman D-galaktozom smanjio je ukupni sadržaj vode koji je u životinja sa simptomima bio povećan u usporedbi sa životinjama koje nakon primjene 6-OHDA nisu razvile simptome. Međutim, tretman D-galaktozom bio je povezan i sa suprotnim učinkom u 6-OHDA životinja bez simptoma što govori da bi blagotvorni učinci mogli biti povezani s postojanjem oštećenja. Drugim riječima, galaktoza bi mogla biti štetna u životinja u kojih nije došlo do oštećenja nigrostrijatalnog dopaminergičkog sustava, a ostvariti učinak samo u onih u kojih postoji oštećenje motorike i komunikacije s probavnim sustavom. Postavljena hipoteza počiva na pretpostavki da je do poremećaja motorike probavnog sustava došlo primarno u životinja koje su razvile i motoričke simptome uslijed primjene 6-OHDA, što je potvrđeno samo posredno na temelju opaženih funkcionalnih parametara. Stoga bi postavljenu hipotezu trebalo provjeriti neposrednom procjenom motoričke funkcije probavne cijevi u štakora sa i bez simptoma. Ukoliko se doista potvrdi da poremećaj motoričke funkcije probavne cijevi postoji samo u štakora sa simptomima PB-a, što je u skladu s trenutnom hipotezom nastanka poremećaja probave u PB-u putem nigro-vagalnog sustava (730), navedeno bi moglo biti povezano i s postojanjem povećanog signala nitrotirozina u mišićnim stanicama probavne cijevi samo u 6-OHDA štakora s razvijenim fenotipom PB-a.

#### **6.3.5.4. Kronični učinci oralne D-galaktoze na biokemijske parametre fecesa u 6-OHDA štakorskom modelu Parkinsonove bolesti**

Budući da tretman D-galaktozom može modulirati redoks homeostazu probavne cijevi (554), smanjuje signal nitrotirozina koji je biljeg oksidativnog oštećenja u mišićju probavnog sustava u modelu PB-a (Slika 63), mijenja funkcionalne probavne parametre (Slika 64) te utječe na SCFA, BCFA i crijevnu mikrobiotu (Slika 51, Slika 53, Slika 54, Slika 55, Slika 56), postoji mogućnost da galaktoza mijenja intraluminalnu redoks homeostazu, odnosno redoks homeostazu fecesa. Biokemijska mjerenja biljega redoks homeostaze u ekstraktima fecesa prikupljenog tijekom 24 sata, 14 dana nakon intrastrijatalnog tretmana 6-OHDA-om, pokazala su snižene vrijednosti reduktivnog kapaciteta i bazalnog  $H_2O_2$  te povećane vrijednosti disocijacije  $H_2O_2$  u fecesu životinja koje su imale veći rizik za razvoj fenotipa PB-a (Slika 65). Zanimljivo, kad su uzorci razrijeđeni do koncentracije u kojoj je u potpunosti izgubljen kapacitet disocijacije  $H_2O_2$  inkubirani s izoliranom katalazom, uočen je isti obrazac disocijacije što govori da u uzorcima fecesa životinja s visokim rizikom za razvoj motoričkih simptoma postoji molekula ili molekule koje posreduju u procesu aktivacije enzima. Kod većine mjerenja ponovno je uočen sličan obrazac po kojem tretman D-galaktozom u životinja koje naposljetku nisu razvile motoričke poremećaje ima suprotan učinak nego u skupini životinja u kojima je kasnije došlo do razvoja fenotipa nalik PB-u. Primjerice, tretman D-galaktozom snižava reduktivni kapacitet fecesa u životinja koje su kasnije bile bez simptoma, a u životinja koje su kasnije razvile simptome tretman je bio povezan s povećanim kapacitetom. Sličan obrazac uočen je i prilikom analize bazalnih vrijednosti  $H_2O_2$ , a kvalitativna interakcija između razvoja simptoma i učinka tretmana galaktozom bila je prisutna i pri mjerenjima disocijacijskog kapaciteta za  $H_2O_2$  posredovanog uzorcima ili egzogenom katalazom. Obzirom da je sličan obrazac interakcije opažen i pri funkcionalnim mjerenjima, postoji mogućnost da biokemijski parametri odražavaju neke funkcionalne promjene probavnog sustava, da su s njima uzročno povezani, ili da treći, nezavisni čimbenik (primjerice poremećaj eferentne funkcije vagusa) uzrokuje nastanak oba biološka fenomena što bi trebalo biti razjašnjeno provođenjem dodatnih pokusa. Iako brojni dokazi upućuju na važnost oksidativnog stresa u PB-u (468,713–717) i na zahvaćenost probavnog sustava (205,680,707,709,847–851), biljezi redoks homeostaze u fecesu do sad nisu nikad izmjereni u oboljelih od PB-a niti štakorskih modela PB-a. Obzirom da su promjene između štakora s niskim i visokim rizikom u fecesu opažene već 14 dana nakon

primjene 6-OHDA, daljnja bi istraživanja trebala detaljnije ispitati prediktivnu vrijednost analize stolice u PB-u.

Osim biokemijskih biljega redoks homeostaze fecesa, analiziran je i sastav nepolarnih lipida te sadržaj sluzi. Zanimljivo, životinje s niskim rizikom za razvoj motoričkih poremećaja nakon intrastrijatalne primjene 6-OHDA imale su feces s manje nepolarnih lipida, a više sluzi u usporedbi s životinjama u koje su kasnije razvile motoričke poremećaje. Ova su opažanja u skladu s prethodnim analizama jer govore da bi metabolički poremećaj (povećana tjelesna masa s obzirom na dob, niže vrijednosti inkretina) mogao predstavljati rizični čimbenik za razvoj PB fenotipa. Osim toga, povećana koncentracija lipida u fecesu mogla bi biti posljedica disbioze i fenomena prerastanja mikroorganizama u tankom crijevu koji su često prisutni u PB-u (205,856,857) jer povećana prisutnost bakterija može ubrzati razgradnju žučnih kiselina što umanjuje kapacitet apsorpcije masti u PB-u (858). Povećan sadržaj sluzi u stolici u životinja koje su bile zaštićene od razvoja motoričkih poremećaja mogao bi objasniti neke od promjena redoks homeostaze jer sluzna barijera igra važnu ulogu u očuvanju sluznice probavnog sustava, što je posebno važno u neurološkim poremećajima (645). Osim toga, disbioza u PB-u mogla bi biti povezana s poremećajem lučenja sluzi (645,859–862) pa je moguće da je u životinja koje su bile zaštićene od 6-OHDA bila prisutna povoljna mikrobiota. U prilog potonjoj hipotezi govore istraživanja koja pokazuju da je modulacijom crijevne mikrobiote antibioticima moguće zaštititi životinje od razvoja patološkog fenotipa u životinjskim modelima PB-a (863). Osim toga, u životinja s manjim rizikom za razvoj simptoma PB-a nakon primjene 6-OHDA izmjerene su više koncentracije inkretina GLP-a 1 i GIP-a (Slika 61, Slika 62), a u prethodnim studijama pokazano je da je poticanje lučenja inkretina posredovano mikrobiotom protektivno u modelima PB-a (864–866). Bez obzira na uzrok opaženih promjena u fecesu, istraživanja provedena u sklopu ove disertacije po prvi put pokazuju da bi feces mogao odražavati vrlo rane promjene u modelima PB-a, što bi moglo biti posebno korisno za ranu dijagnostiku PB-a ili pravovremeno otkrivanje rizičnih čimbenika za razvoj bolesti povezanih s probavnim sustavom.



## 7. ZAKLJUČAK

1. Patofiziološke promjene prisutne su u probavnom sustavu štakorskog modela sporadične Alzheimerove bolesti jedan mjesec nakon intracerebroventrikularnog tretmana streptozotocinom. Ovaj zaključak temeljen je na sljedećim nalazima istraživanja:

- i. U duodenumu štakorskog modela sporadične Alzheimerove bolesti izazvanog intracerebroventrikularnim streptozotocinom, jedan mjesec nakon tretmana, postoji poremećaj redoks homeostaze karakteriziran smanjenjem koncentracije tiola niske molekularne mase i proteinskih sulfhidrila, te porastom aktivnosti katalaza/peroksidaza i nakupljanjem sekundarnih produkata peroksidacije lipida. Mehanizam poremećaja redoks dishomeostaze mogao bi biti povezan s nemogućnosti tkiva da poveća proizvodnju i iskorištavanje nukleofilnih supstrata što onemogućava kompenzatorni odgovor na elektrofilno opterećenje.
- ii. Uočeni poremećaj redoks homeostaze združen je s narušenom strukturom crijevne barijere koja je u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti izazvanom intracerebroventrikularnim streptozotocinom na makromorfološkoj razini okarakterizirana skraćivanjem resica i produbljivanjem kripti, a na mikromorfološkoj snižavanjem i proširenjem preostalih epitelnih stanica probavne sluznice. Opisane promjene govore u prilog poremećenom procesu obnavljanja stanica probavne sluznice, što bi moglo biti povezano s poremećajem regulacije apoptoze epitelnih stanica probavne sluznice u ovom modelu.
- iii. Sluznica probavnog sustava u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti izazvanom intracerebroventrikularnim streptozotocinom sadrži povećani broj vrčastih stanica s mjehurićima probavne sluzi, što odražava poremećaj regulacije izlučivanja sluzi u lumen probavne cijevi povezan s neosjetljivosti na neuronalno poticanje lučenja.



- iv. Probavna sluz u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti razrijeđena je, smanjene kiselosti i lubrikativnog kapaciteta te narušene funkcije formiranja sluzne barijere, što povećava izloženost sluznice intraluminalnim tvarima.
  - v. Patofiziološke promjene probavnog sustava u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti povezane su s neosjetljivošću osovine crijevo-mozak na inkretine. Poremećaj regulacije osovine crijevo-mozak inkretinima uključuje središnju komponentu neosjetljivosti na inkretine te periferne promjene izražaja receptora i signalizacije u probavnom sustavu.
2. Redoks homeostaza nije poremećena u probavnom sustavu istraživanog štakorskog modela za Parkinsonovu bolest s izraženim motoričkim simptomima tri mjeseca nakon intrastrijalnog tretmana 6-hidroksidopaminom.
  3. Akutni oralni tretman otopinom D-galaktoze (200 mg/kg) utječe na redoks homeostazu štakorskog probavnog i središnjeg živčanog sustava što potvrđuju sljedeći nalazi istraživanja:
    - i. Akutni oralni tretman otopinom D-galaktoze (200 mg/kg) utječe na enteroendokrine stanice i na redoks homeostazu štakorskog probavnog sustava poticanjem aktivnosti superoksid-dismutaza te smanjenjem peroksidacije lipida uz trošenje nukleofilnih supstrata.
    - ii. Akutni tretman D-galaktozom ne utječe na sustavnu redoks homeostazu, ali smanjuje koncentraciju sekundarnih produkata peroksidacije lipida u plazmi štakora.
    - iii. Akutni tretman D-galaktozom uzrokuje slabo izražene prooksidativne učinke u središnjem živčanom sustavu koji su povezani s kompenzatornim porastom reduktivnog kapaciteta i koncentracije nukleofilnih supstrata, što govori u prilog hormetskome mehanizmu djelovanja.

4. Učinak D-galaktoze na redoks homeostazu ima ograničen zaštitni potencijal u probavnom sustavu štakorskog modela sporadične Alzheimerove bolesti izazvanom intracerebroventrikularnim streptozotocinom zbog nedostatnog kapaciteta porasta nukleofilnog tonusa.
5. Kronični oralni tretman otopinom D-galaktoze (200 mg/kg) sprječava nastanak poremećaja objektnog pamćenja u kontrolnih životinja tijekom socijalne izolacije te popravlja objektno pamćenje u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti izazvanom intracerebroventrikularnim streptozotocinom. što potvrđuju sljedeći nalazi istraživanja:
  - i. Redoks homeostaza nije promijenjena u duodenumu, ileumu, niti kolonu u štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti izazvanom intracerebroventrikularnim streptozotocinom tri mjeseca nakon intracerebroventrikularnog tretmana, što ukazuje na poremećaj redoks sustava crijeva koji prati specifični prostorno-vremenski obrazac. Kronični oralni tretman D-galaktozom (200 mg/kg) utječe na pojedine biljege redoks homeostaze, ali učinak na redoks homeostazu probavnog sustava ne može objasniti blagotvorno djelovanje D-galaktoze na objektno pamćenje.
  - ii. Kronični oralni tretman D-galaktozom (200 mg/kg) mijenja obrazac intraluminalne koncentracije kratkolančanih masnih kiselina i masnih kiselina razgranatog lanca, te ostvaruje učinak na crijevni mikrobiom, što bi moglo biti povezano s blagotvornim učincima na funkciju središnjeg živčanog sustava.
  - iii. Kronični oralni tretman D-galaktozom (200 mg/kg) normalizira sniženu koncentraciju peptida-1 sličnog glukagonu u plazmi štakorskog modela sporadične Alzheimerove bolesti izazvanog intracerebroventrikularnim streptozotocinom te povećava koncentraciju cirkulirajućeg inzulinotropnog peptida ovisnog o glukozi. Učinci D-galaktoze na inkretinski sustav mogli bi biti povezani s učincima na kratkolančane masne kiseline, masne kiseline razgranatog lanca i crijevni mikrobiom.

6. Kronični oralni tretman otopinom D-galaktoze (200 mg/kg) u štakorskom modelu Parkinsonove bolesti izazvanom intrastrijatalnim 6-hidroksidopaminom ne sprječava razvoj motoričkog deficita već može dovesti do pogoršanja motoričkih funkcija. Kronični tretman oralnom D-galaktozom vjerojatno nije povezan sa sprječavanjem razvoja poremećaja objektnog pamćenja ili je učinak galaktoze vrlo slabo izražen.
  - i. Metabolička funkcija povezana s regulacijom tjelesne mase te bazalna koncentracija cirkulirajućih inkretina peptida-1 sličnog glukagonu i inzulinotropnog peptida ovisnog o glukozi mogli bi biti protektivni čimbenici u kontekstu razvoja motoričkih poremećaja u štakorskom modelu Parkinsonove bolesti izazvanog intrastrijatalnim 6-hidroksidopaminom.
  - ii. Rizik za razvoj motoričkih poremećaja u štakorskom modelu Parkinsonove bolesti izazvanom intrastrijatalnim 6-hidroksidopaminom povezan je s funkcionalnim parametrima probavnog sustava te redoks homeostazom i biokemijskim sastavom fecesa.
  - iii. Kronični oralni tretman D-galaktozom blagotvorno djeluje na redoks homeostazu u glatkom mišićju crijeva te na funkcionalne parametre probavnog sustava i redoks homeostazu i biokemijski sastav fecesa u štakorskom modelu Parkinsonove bolesti izazvanom intrastrijatalnim 6-hidroksidopaminom.
7. Prema trenutno dostupnim podacima D-galaktoza ne ostvaruje opći neuroprotektivni učinak u svim modelima neurodegenerativnih bolesti, već je blagotvorni učinak specifičan za pojedine animalne modele.

## 8. KRATKI SADRŽAJ

Alzheimerova (AB) i Parkinsonova bolest (PB) najučestalije su neurodegenerativne bolesti s nerazjašnjenom etiopatogenezom, a istraživanja upućuju na važnu ulogu probavnog sustava, koji je u životinjskim modelima AB-a i PB-a slabo istražen. Mimetici inkretina ispituju se kao moguća terapija, a nasuprot štetnim učincima parenteralne, peroralno primijenjena D-galaktoza potiče lučenje inkretina i sprječava nastanak kognitivnog oštećenja u u štakorskom modelu sporadičnog AB-a (sAB) izazvanom intracerebroventrikularnim streptozotocinom (STZ-icv). U ovom istraživanju istražene su patofiziološke promjene u probavnom sustavu u štakorskim modelima sAB-a i PB-a te je ispitan potencijalni učinak peroralne D-galaktoze u normalizaciji tih promjena. U probavnom sustavu STZ-icv modela sAB-a, opisan je poremećaj redoks homeostaze povezan s neosjetljivošću osovine crijevo-mozak na inkretine, narušenom strukturom i funkcijom crijevne barijere te poremećajem homeostaze sluzi, dok u modelu PB-a izazvanom 6-hidroksidopaminom nije bilo poremećaja crijevnog redoks sustava. Akutni tretman D-galaktozom popravljiva redoks homeostazu u crijevu i mozgu, međutim, neuroprotektivni učinci kroničnog tretmana u modelu sAB-a nisu povezani s modulacijom crijevne redoks homeostaze, već s modulacijom mikrobiote te poticanjem lučenja inkretina. U modelu PB-a, kronični tretman D-galaktozom ne sprječava razvoj motoričkih simptoma, ali popravljiva funkciju i redoks homeostazu probavnog sustava. Dobiveni rezultati doprinose razumijevanju patofizioloških promjena probavnog sustava u životinjskim modelima AB-a i PB-a te pružaju nove uvide u mehanizam neuroprotektivnog djelovanja D-galaktoze u neurodegenerativnim poremećajima.



## **9. SUMMARY**

### **Pathophysiological alterations of gastrointestinal system in animal models of Alzheimer's and Parkinson's disease**

**Jan Homolak**

**2023**

Alzheimer's (AD) and Parkinson's disease (PD) are the most common neurodegenerative diseases with unresolved etiopathogenesis. Evidence suggests gastrointestinal system (GIS) plays a role which in animal models of AD/PD remains poorly investigated. Therapeutic potential of incretins is investigated and, opposing the harmful effects of parenteral D-galactose, oral D-galactose stimulates incretins and prevents cognitive impairment in the intracerebroventricular streptozotocin (STZ-icv) AD rat model. This study aimed to investigate pathophysiological alterations of GIS in rat models of AD/PD, and protective effects of oral D-galactose. STZ-icv GIS was characterized by redox dyshomeostasis associated with incretin insensitivity of the gut-brain axis, impaired structure and function of the gastrointestinal barrier, and altered mucus homeostasis. In the 6-hydroxydopamine-induced PD model GIS, no redox changes were observed. Acute D-galactose treatment improves redox homeostasis in the intestine and brain, however, the neuroprotective effects of chronic treatment in the STZ-icv are not related to modulation of intestinal redox homeostasis, but of microbiota and stimulation of incretins. Chronic D-galactose treatment does not prevent the development of motor symptoms in the PD model, but improves GIS function and redox homeostasis. The results contribute to the understanding of GIS pathophysiology in experimental AD and PD and provide novel insights into mechanisms by which D-galactose exerts neuroprotective effects in neurodegeneration.



## 10. POPIS LITERATURE

1. 2020 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia* [Internet]. 2020 [pristupljeno 09.04.2021.];16(3):391–460. Dostupno na: <https://alz-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/alz.12068>
2. Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2011 19;377(9770):1019–31.
3. Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, Arrighi HM. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2007;3(3):186–91.
4. Nichols E, Szeke CEI, Vollset SE, Abbasi N, Abd-Allah F, Abdela J, i sur. 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. 2019;18(1):88-106.
5. Wimo A, Guerchet M, Ali GC, Wu YT, Prina AM, Winblad B, i sur. The worldwide costs of dementia 2015 and comparisons with 2010. *Alzheimers Dement*. 2017;13(1):1–7.
6. Reitz C, Rogaeva E, Beecham GW. Late-onset vs nonmendelian early-onset Alzheimer disease: A distinction without a difference? *Neurol Genet*. 2020;6(5):e512.
7. Bekris LM, Yu CE, Bird TD, Tsuang DW. Genetics of Alzheimer Disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol*. 2010 Dec;23(4):213-27.
8. Goedert M, Spillantini MG. A century of Alzheimer's disease. *Science*. 2006;314(5800):777–81.
9. Reynolds DS. A short perspective on the long road to effective treatments for Alzheimer's disease. *British Journal of Pharmacology*. 2019;176(18):3636–48.
10. Long JM, Holtzman DM. Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell*. 2019;179(2):312–39.
11. Rogers SL, Doody RS, Mohs RC, Friedhoff LT. Donepezil improves cognition and global function in Alzheimer disease: a 15-week, double-blind, placebo-controlled study. Donepezil Study Group. *Arch Intern Med*. 1998;158(9):1021–31.
12. Tan CC, Yu JT, Wang HF, Tan MS, Meng XF, Wang C, i sur. Efficacy and safety of donepezil, galantamine, rivastigmine, and memantine for the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *J Alzheimers Dis*. 2014;41(2):615–31.
13. Dou KX, Tan MS, Tan CC, Cao XP, Hou XH, Guo QH, i sur. Comparative safety and effectiveness of cholinesterase inhibitors and memantine for Alzheimer's disease: a network meta-analysis of 41 randomized controlled trials. *Alzheimers Res Ther*. 2018;10(1):126.
14. Atri A. The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum: Diagnosis and Management. *Med Clin North Am*. 2019;103(2):263–93.



15. Rodda J, Morgan S, Walker Z. Are cholinesterase inhibitors effective in the management of the behavioral and psychological symptoms of dementia in Alzheimer's disease? A systematic review of randomized, placebo-controlled trials of donepezil, rivastigmine and galantamine. *Int Psychogeriatr*. 2009;21(5):813–24.
16. Cummings JL, Schneider L, Tariot PN, Kershaw PR, Yuan W. Reduction of behavioral disturbances and caregiver distress by galantamine in patients with Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry*. 2004;161(3):532–8.
17. Chase TN, Farlow MR, Clarence-Smith K. Donepezil Plus Solifenacin (CPC-201) Treatment for Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics*. 2017;14(2):405–16.
18. Cummings J. New approaches to symptomatic treatments for Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2021;16(1):2.
19. Wang X, Sun G, Feng T, Zhang J, Huang X, Wang T, *i sur*. Sodium oligomannate therapeutically remodels gut microbiota and suppresses gut bacterial amino acids-shaped neuroinflammation to inhibit Alzheimer's disease progression. *Cell Res*. 2019;29(10):787–803.
20. Atri A, Frölich L, Ballard C, Tariot PN, Molinuevo JL, Boneva N, *i sur*. Effect of Idalopirdine as Adjunct to Cholinesterase Inhibitors on Change in Cognition in Patients With Alzheimer Disease: Three Randomized Clinical Trials. *JAMA*. 2018;319(2):130–42.
21. Verma S, Kumar A, Tripathi T, Kumar A. Muscarinic and nicotinic acetylcholine receptor agonists: current scenario in Alzheimer's disease therapy. *J Pharm Pharmacol*. 2018;70(8):985–93.
22. Koch G, Motta C, Bonni S, Pellicciari MC, Picazio S, Casula EP, *i sur*. Effect of Rotigotine vs Placebo on Cognitive Functions Among Patients With Mild to Moderate Alzheimer Disease: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Netw Open*. 2020;3(7):e2010372.
23. Matthews DC, Ritter A, Thomas RG, Andrews RD, Lukic AS, Revta C, *i sur*. Rasagiline effects on glucose metabolism, cognition, and tau in Alzheimer's dementia. *Alzheimers Dement (N Y)*. 2021;7(1):e12106.
24. Grossberg GT, Kohegyi E, Mergel V, Josiassen MK, Meulien D, Hobart M, *i sur*. Efficacy and Safety of Brexpiprazole for the Treatment of Agitation in Alzheimer's Dementia: Two 12-Week, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trials. *Am J Geriatr Psychiatry*. 2020;28(4):383–400.
25. Cummings JL, Lyketsos CG, Peskind ER, Porsteinsson AP, Mintzer JE, Scharre DW, *i sur*. Effect of Dextromethorphan-Quinidine on Agitation in Patients With Alzheimer Disease Dementia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2015;314(12):1242–54.
26. Herrmann N, Ruthirakuhan M, Gallagher D, Verhoeff NPLG, Kiss A, Black SE, *i sur*. Randomized Placebo-Controlled Trial of Nabilone for Agitation in Alzheimer's Disease. *Am J Geriatr Psychiatry*. 2019;27(11):1161–73.
27. Ballard C, Banister C, Khan Z, Cummings J, Demos G, Coate B, *i sur*. Evaluation of the safety, tolerability, and efficacy of pimavanserin versus placebo in patients with

- Alzheimer's disease psychosis: a phase 2, randomised, placebo-controlled, double-blind study. *Lancet Neurol.* 2018;17(3):213–22.
28. Rosenberg PB, Lanctôt KL, Drye LT, Herrmann N, Scherer RW, Bachman DL, i sur. Safety and Efficacy of Methylphenidate for Apathy in Alzheimer's Disease: A Randomized, Placebo-Controlled Trial. *J Clin Psychiatry.* 2013 Aug;74(8):810-6.
  29. Scherer RW, Drye L, Mintzer J, Lanctôt K, Rosenberg P, Herrmann N, i sur. The Apathy in Dementia Methylphenidate Trial 2 (ADMET 2): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials.* 2018;19(1):46.
  30. Zhu CW, Grossman HT, Sano M. Why Do They Just Sit? Apathy as a Core Symptom of Alzheimer Disease. *Am J Geriatr Psychiatry.* 2019;27(4):395–405.
  31. Homolak J, Mudrovčić M, Vukić B, Toljan K. Circadian Rhythm and Alzheimer's Disease. *Med Sci (Basel).* 2018;6(3):52.
  32. Toljan K, Homolak J. Circadian changes in Alzheimer's disease: Neurobiology, clinical problems, and therapeutic opportunities. *Handb Clin Neurol.* 2021;179:285–300.
  33. Herring WJ, Ceesay P, Snyder E, Bliwise D, Budd K, Hutzelmann J, i sur. Polysomnographic assessment of suvorexant in patients with probable Alzheimer's disease dementia and insomnia: a randomized trial. *Alzheimers Dement.* 2020;16(3):541–51.
  34. Scott LJ. Lemborexant: First Approval. *Drugs.* 2020 ;80(4):425–32.
  35. Cummings J, Lee G, Ritter A, Sabbagh M, Zhong K. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2020. *Alzheimers Dement (N Y).* 2020;6(1):e12050.
  36. Cummings JL, Tong G, Ballard C. Treatment Combinations for Alzheimer's Disease: Current and Future Pharmacotherapy Options. *Journal of Alzheimer's Disease.* 2019;67(3):779–94.
  37. Dhillon S. Aducanumab: First Approval. *Drugs.* 2021;81(12):1437–43.
  38. Barenholtz Levy H. Accelerated Approval of Aducanumab: Where Do We Stand Now? *Ann Pharmacother.* 2022;56(6):736–9.
  39. Dunn B, Stein P, Cavazzoni P. Approval of Aducanumab for Alzheimer Disease-The FDA's Perspective. *JAMA Intern Med.* 2021;181(10):1276–8.
  40. Liu KY, Howard R. Can we learn lessons from the FDA's approval of aducanumab? *Nat Rev Neurol.* 2021;17(11):715–22.
  41. Alexander GC, Knopman DS, Emerson SS, Ovbiagele B, Kryscio RJ, Perlmutter JS, i sur. Revisiting FDA Approval of Aducanumab. *N Engl J Med.* 2021;385(9):769–71.
  42. Mukhopadhyay S, Banerjee D. A Primer on the Evolution of Aducanumab: The First Antibody Approved for Treatment of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2021;83(4):1537–52.

43. Yuksel JM, Noviasky J, Britton S. Aducanumab for Alzheimer's Disease: Summarized Data From EMERGE, ENGAGE, and PRIME Studies. *Sr Care Pharm.* 2022;37(8):329–34.
44. Tahami Monfared AA, Tafazzoli A, Ye W, Chavan A, Zhang Q. Long-Term Health Outcomes of Lecanemab in Patients with Early Alzheimer's Disease Using Simulation Modeling. *Neurol Ther.* 2022;11(2):863–80.
45. van Dyck CH, Swanson CJ, Aisen P, Bateman RJ, Chen C, Gee M, i sur. Lecanemab in Early Alzheimer's Disease. *N Engl J Med.* 2023; 388:9-21.
46. Vos T, Flaxman AD, Naghavi M, Lozano R, Michaud C, Ezzati M, i sur. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet.* 2012;380(9859):2163–96.
47. Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med.* 2016;8(6):595-608.
48. Hardy J, Selkoe DJ. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science.* 2002;297(5580):353-6.
49. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* 1992;256(5054):184–5.
50. Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, i sur. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature.* 1991;349(6311):704–6.
51. Alves SS, M.P. da Silva-Junior R, Servilha-Menezes G, Homolak J, Salkovic-Petrisic M, Garcia-Cairasco N. The scientific path towards Alzheimer's disease understanding: insulin resistance as a common link between current hypotheses. *J Alzheimers Dis.* 2021;82(1):71-105.
52. Aizenstein HJ, Nebes RD, Saxton JA, Price JC, Mathis CA, Tsopelas ND, i sur. Frequent amyloid deposition without significant cognitive impairment among the elderly. *Arch Neurol.* 2008;65(11):1509–17.
53. Bennett DA, Schneider JA, Arvanitakis Z, Kelly JF, Aggarwal NT, Shah RC, i sur. Neuropathology of older persons without cognitive impairment from two community-based studies. *Neurology.* 2006;66(12):1837–44.
54. Brayne C, Richardson K, Matthews FE, Fleming J, Hunter S, Xuereb JH, i sur. Neuropathological correlates of dementia in over-80-year-old brain donors from the population-based Cambridge city over-75s cohort (CC75C) study. *J Alzheimers Dis.* 2009;18(3):645–58.
55. Carvalho DZ, St Louis EK, Knopman DS, Boeve BF, Lowe VJ, Roberts RO, i sur. Association of Excessive Daytime Sleepiness With Longitudinal  $\beta$ -Amyloid Accumulation in Elderly Persons Without Dementia. *JAMA Neurol.* 2018;75(6):672-680.
56. Brayne C. The elephant in the room - healthy brains in later life, epidemiology and public health. *Nat Rev Neurosci.* 2007;8(3):233–9.

57. Dickson DW, Crystal HA, Mattiace LA, Masur DM, Blau AD, Davies P, i sur. Identification of normal and pathological aging in prospectively studied nondemented elderly humans. *Neurobiol Aging*. 1992;13(1):179–89.
58. Selkoe DJ. Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism: a reprise. *J Alzheimers Dis*. 2006;9(3 Suppl):163–8.
59. Sojkova J, Resnick SM. In vivo human amyloid imaging. *Curr Alzheimer Res*. 2011;8(4):366–72.
60. Zigman WB, Devenny DA, Krinsky-McHale SJ, Jenkins EC, Urv TK, Wegiel J, i sur. Alzheimer's Disease in Adults with Down Syndrome. *Int Rev Res Ment Retard*. 2008;36:103-145.
61. Nicoll JAR, Buckland GR, Harrison CH, Page A, Harris S, Love S, i sur. Persistent neuropathological effects 14 years following amyloid- $\beta$  immunization in Alzheimer's disease. *Brain*. 2019;142(7):2113–26.
62. Karran E, De Strooper B. The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure? *J Neurochem*. 2016;139 Suppl 2:237–52.
63. Herrup K. The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nat Neurosci*. 2015 Jun;18(6):794–9.
64. Modrego P, Lobo A. A good marker does not mean a good target for clinical trials in Alzheimer's disease: the amyloid hypothesis questioned. *Neurodegener Dis Manag*. 2019;9(3):119–21.
65. Davies P, Maloney AJ. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet*. 1976;2(8000):1403.
66. Hampel H, Mesulam MM, Cuello AC, Farlow MR, Giacobini E, Grossberg GT, i sur. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain*. 2018;141(7):1917–33.
67. Bohdanecký Z, Jarvik ME, Carley JL. Differential impairment of delayed matching in monkeys by scopolamine and scopolamine methylbromide. *Psychopharmacologia*. 1967;11(4):293–9.
68. Drachman DA, Leavitt J. Human memory and the cholinergic system. A relationship to aging? *Arch Neurol*. 1974;30(2):113–21.
69. Pazzagli A, Pepeu G. Amnesic properties of scopolamine and brain acetylcholine in the rat. *Int J Neuropharmacol*. 1965 Sep;4(5):291-9.
70. Bartus RT. Evidence for a direct cholinergic involvement in the scopolamine-induced amnesia in monkeys: effects of concurrent administration of physostigmine and methylphenidate with scopolamine. *Pharmacol Biochem Behav*. 1978;9(6):833–6.
71. Bowen DM, Smith CB, White P, Davison AN. Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain*. 1976;99(3):459–96.

72. Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1999 ;66(2):137–47.
73. Perry EK, Perry RH, Blessed G, Tomlinson BE. Necropsy evidence of central cholinergic deficits in senile dementia. *Lancet*. 1977;1(8004):189.
74. Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, Coyle JT, Delon MR. Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science*. 1982;215(4537):1237–9.
75. Bierer LM, Haroutunian V, Gabriel S, Knott PJ, Carlin LS, Purohit DP, i sur. Neurochemical correlates of dementia severity in Alzheimer's disease: relative importance of the cholinergic deficits. *J Neurochem*. 1995;64(2):749–60.
76. Francis PT, Palmer AM, Sims NR, Bowen DM, Davison AN, Esiri MM, i sur. Neurochemical studies of early-onset Alzheimer's disease. Possible influence on treatment. *N Engl J Med*. 1985;313(1):7–11.
77. Perry EK, Tomlinson BE, Blessed G, Perry RH, Cross AJ, Crow TJ. Neuropathological and biochemical observations on the noradrenergic system in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci*. 1981;51(2):279–87.
78. Terry AV, Buccafusco JJ. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;306(3):821–7.
79. Šimić G, Babić Leko M, Wray S, Harrington C, Delalle I, Jovanov-Milošević N, i sur. Tau Protein Hyperphosphorylation and Aggregation in Alzheimer's Disease and Other Tauopathies, and Possible Neuroprotective Strategies. *Biomolecules*. 2016;6(1):6.
80. Mohandas E, Rajmohan V, Raghunath B. Neurobiology of Alzheimer's disease. *Indian J Psychiatry*. 2009;51(1):55-61.
81. Arnsten AFT, Datta D, Del Tredici K, Braak H. Hypothesis: Tau pathology is an initiating factor in sporadic Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2021;17(1):115–24.
82. Maccioni RB, Farías G, Morales I, Navarrete L. The revitalized tau hypothesis on Alzheimer's disease. *Arch Med Res*. 2010;41(3):226–31.
83. Mandelkow EM, Mandelkow E. Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol*. 1998;8(11):425–7.
84. Chong FP, Ng KY, Koh RY, Chye SM. Tau Proteins and Tauopathies in Alzheimer's Disease. *Cell Mol Neurobiol*. 2018;38(5):965–80.
85. Kosik KS, Joachim CL, Selkoe DJ. Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(11):4044–8.

86. Braak H, Del Tredici K. Are cases with tau pathology occurring in the absence of A $\beta$  deposits part of the AD-related pathological process? *Acta Neuropathol.* 2014 ;128(6):767–72.
87. Stoothoff WH, Johnson GVW. Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1739(2–3):280–97.
88. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(13):4913–7.
89. Mudher A, Lovestone S. Alzheimer’s disease-do tauists and baptists finally shake hands? *Trends Neurosci.* 2002;25(1):22–6.
90. Ghoshal N, García-Sierra F, Wu J, Leurgans S, Bennett DA, Berry RW, i sur. Tau conformational changes correspond to impairments of episodic memory in mild cognitive impairment and Alzheimer’s disease. *Exp Neurol.* 2002;177(2):475–93.
91. Gauthier S, Feldman HH, Schneider LS, Wilcock GK, Frisoni GB, Hardlund JH, i sur. Efficacy and safety of tau-aggregation inhibitor therapy in patients with mild or moderate Alzheimer’s disease: a randomised, controlled, double-blind, parallel-arm, phase 3 trial. *Lancet.* 2016;388(10062):2873–84.
92. Li C, Götz J. Tau-based therapies in neurodegeneration: opportunities and challenges. *Nat Rev Drug Discov.* 2017;16(12):863–83.
93. Du X, Wang X, Geng M. Alzheimer’s disease hypothesis and related therapies. *Transl Neurodegener.* 2018;7:2.
94. Swerdlow RH, Burns JM, Khan SM. The Alzheimer’s disease mitochondrial cascade hypothesis. *J Alzheimers Dis.* 2010;20 Suppl 2(Suppl 2):S265-279.
95. Ashleigh T, Swerdlow RH, Beal MF. The role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer’s disease pathogenesis. *Alzheimers Dement.* 2022; 1-10. [Dostupno na: <https://doi.org/10.1002/alz.12683>
96. Swerdlow RH, Khan SM. A “mitochondrial cascade hypothesis” for sporadic Alzheimer’s disease. *Med Hypotheses.* 2004;63(1):8–20.
97. Fišar Z. Linking the Amyloid, Tau, and Mitochondrial Hypotheses of Alzheimer’s Disease and Identifying Promising Drug Targets. *Biomolecules.* 2022;12(11):1676.
98. Mancuso M, Coppedè F, Murri L, Siciliano G. Mitochondrial cascade hypothesis of Alzheimer’s disease: myth or reality? *Antioxid Redox Signal.* 2007;9(10):1631–46.
99. Swerdlow RH. The mitochondrial hypothesis: Dysfunction, bioenergetic defects, and the metabolic link to Alzheimer’s disease. *Int Rev Neurobiol.* 2020;154:207–33.
100. Swerdlow RH. Mitochondria and Mitochondrial Cascades in Alzheimer’s Disease. *J Alzheimers Dis.* 2018;62(3):1403–16.

101. Gella A, Durany N. Oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell Adh Migr*. 2009 Jan-Mar;3(1):88-93.
102. Huang WJ, Zhang X, Chen WW. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biomed Rep*. 2016 May;4(5):519-522.
103. Markesbery WR. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med*. 1997;23(1):134-47.
104. Padurariu M, Ciobica A, Lefter R, Serban IL, Stefanescu C, Chirita R. The oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Psychiatr Danub*. 2013;25(4):401-9.
105. Praticò D. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease: a reappraisal. *Trends Pharmacol Sci*. 2008;29(12):609-15.
106. Praticò D. Evidence of oxidative stress in Alzheimer's disease brain and antioxidant therapy: lights and shadows. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1147:70-8.
107. Swomley AM, Butterfield DA. Oxidative stress in Alzheimer disease and mild cognitive impairment: evidence from human data provided by redox proteomics. *Arch Toxicol*. 2015;89(10):1669-80.
108. Christen Y. Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr*. 2000;71(2):621S-629S.
109. Homolak J. Redox Homeostasis in Alzheimer's Disease. *Redox Signaling and Biomarkers in Ageing* [Internet]. 2021 [pristupljeno 04.12.2021.]; Dostupno na: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-84965-8\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-030-84965-8_15)
110. Lecca D, Jung YJ, Scerba MT, Hwang I, Kim YK, Kim S, i sur. Role of chronic neuroinflammation in neuroplasticity and cognitive function: A hypothesis. *Alzheimers Dement*. 2022 Nov;18(11):2327-2340.
111. Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, i sur. Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *Lancet Neurol*. 2015 Apr;14(4):388-405.
112. Kinney JW, Bemiller SM, Murtishaw AS, Leisgang AM, Salazar AM, Lamb BT. Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (N Y)*. 2018;4:575-590.
113. Morales I, Guzmán-Martínez L, Cerda-Troncoso C, Farías GA, Maccioni RB. Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:112.
114. Ismail R, Parbo P, Madsen LS, Hansen AK, Hansen KV, Schaldemose JL, i sur. The relationships between neuroinflammation, beta-amyloid and tau deposition in Alzheimer's disease: a longitudinal PET study. *J Neuroinflammation*. 2020;17(1):151.
115. Zotova E, Nicoll JA, Kalaria R, Holmes C, Boche D. Inflammation in Alzheimer's disease: relevance to pathogenesis and therapy. *Alzheimers Res Ther*. 2010;2(1):1.

116. Ennerfelt HE, Lukens JR. The role of innate immunity in Alzheimer's disease. *Immunol Rev.* 2020;297(1):225–46.
117. Heneka MT, Golenbock DT, Latz E. Innate immunity in Alzheimer's disease. *Nat Immunol.* 2015;16(3):229-36.
118. Frost GR, Jonas LA, Li YM. Friend, Foe or Both? Immune Activity in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci.* 2019;11:337.
119. Alzheimer's Association Calcium Hypothesis Workgroup. Calcium Hypothesis of Alzheimer's disease and brain aging: A framework for integrating new evidence into a comprehensive theory of pathogenesis. *Alzheimers Dement.* 2017;13(2):178-182.e17.
120. Khachaturian ZS. Hypothesis on the regulation of cytosol calcium concentration and the aging brain. *Neurobiol Aging.* 1987;8(4):345–6.
121. Landfield PW, Pitler TA. Prolonged Ca<sup>2+</sup>-dependent afterhyperpolarizations in hippocampal neurons of aged rats. *Science.* 1984;226(4678):1089–92.
122. Landfield PW. "Increased calcium-current" hypothesis of brain aging. *Neurobiol Aging.* 1987;8(4):346–7.
123. Popugaeva E, Pchitskaya E, Bezprozvanny I. Dysregulation of Intracellular Calcium Signaling in Alzheimer's Disease. *Antioxid Redox Signal.* 2018;29(12):1176–88.
124. Demuro A, Parker I, Stutzmann GE. Calcium signaling and amyloid toxicity in Alzheimer disease. *J Biol Chem.* 2010;285(17):12463–8.
125. Magi S, Castaldo P, Macrì ML, Maiolino M, Matteucci A, Bastioli G, i sur. Intracellular Calcium Dysregulation: Implications for Alzheimer's Disease. *Biomed Res Int.* 2016;2016:6701324.
126. Verkhatsky A. Astroglial Calcium Signaling in Aging and Alzheimer's Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2019;11(7):a035188.
127. Tong BCK, Wu AJ, Li M, Cheung KH. Calcium signaling in Alzheimer's disease & therapies. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2018;1865(11 Pt B):1745–60.
128. Miles WR, Root HF. Psychologic Tests Applied to Diabetic Patients. *Archives of Internal Medicine.* 1922;30:767–77.
129. Bucht G, Adolfsson R, Lithner F, Winblad B. Changes in blood glucose and insulin secretion in patients with senile dementia of Alzheimer type. *Acta Med Scand.* 1983;213(5):387–92.
130. Frölich L, Blum-Degen D, Bernstein HG, Engelsberger S, Humrich J, Laufer S, i sur. Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna).* 1998;105(4–5):423–38.
131. Hoyer S. Is sporadic Alzheimer disease the brain type of non-insulin dependent diabetes mellitus? A challenging hypothesis. *J Neural Transm (Vienna).* 1998;105(4–5):415–22.



132. Kellar D, Craft S. Brain insulin resistance in Alzheimer's disease and related disorders: mechanisms and therapeutic approaches. *Lancet Neurol.* 2020;19(9):758–66.
133. Fang J, Pieper AA, Nussinov R, Lee G, Bekris L, Leverenz JB, i sur. Harnessing endophenotypes and network medicine for Alzheimer's drug repurposing. *Med Res Rev.* 2020;40(6):2386–426.
134. Chung J, Wang X, Maruyama T, Ma Y, Zhang X, Mez J, i sur. Genome-wide association study of Alzheimer's disease endophenotypes at prediagnosis stages. *Alzheimers Dement.* 2018;14(5):623–33.
135. Louwersheimer E, Wolfsgruber S, Espinosa A, Lacour A, Heilmann-Heimbach S, Alegret M, i sur. Alzheimer's disease risk variants modulate endophenotypes in mild cognitive impairment. *Alzheimers Dement.* 2016;12(8):872–81.
136. Braskie MN, Ringman JM, Thompson PM. Neuroimaging measures as endophenotypes in Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis.* 2011;2011:490140.
137. Deming Y, Xia J, Cai Y, Lord J, Holmans P, Bertelsen S, i sur. A potential endophenotype for Alzheimer's disease: cerebrospinal fluid clusterin. *Neurobiol Aging.* 2016;37:208.e1-208.e9.
138. Blanken AE, Dutt S, Li Y, Nation DA, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Disentangling Heterogeneity in Alzheimer's Disease: Two Empirically-Derived Subtypes. *J Alzheimers Dis.* 2019;70(1):227–39.
139. Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkmann J, i sur. Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2017;3:17013.
140. Twelves D, Perkins KSM, Counsell C. Systematic review of incidence studies of Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2003;18(1):19–31.
141. Savica R, Grossardt BR, Bower JH, Ahlskog JE, Rocca WA. Incidence and pathology of synucleinopathies and tauopathies related to parkinsonism. *JAMA Neurol.* 2013;70(7):859–66.
142. Dorsey ER, Constantinescu R, Thompson JP, Biglan KM, Holloway RG, Kieburtz K, i sur. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology.* 2007;68(5):384–6.
143. Murray CJL, Vos T, Lozano R, Naghavi M, Flaxman AD, Michaud C, i sur. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet.* 2012;380(9859):2197–223.
144. Leibson CL, Long KH, Maraganore DM, Bower JH, Ransom JE, O'Brien PC, i sur. Direct medical costs associated with Parkinson's disease: a population-based study. *Mov Disord.* 2006;21(11):1864–71.
145. Quinn N, Critchley P, Marsden CD. Young onset Parkinson's disease. *Mov Disord.* 1987;2(2):73–91.

146. Rocca WA, McDonnell SK, Strain KJ, Bower JH, Ahlskog JE, Elbaz A, i sur. Familial aggregation of Parkinson's disease: The Mayo Clinic family study. *Ann Neurol.* 2004;56(4):495–502.
147. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, i sur. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science.* 1997;276(5321):2045–7.
148. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, i sur. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature.* 1998;392(6676):605–8.
149. Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, i sur. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science.* 2003;299(5604):256–9.
150. Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MMK, Harvey K, Gispert S, i sur. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science.* 2004;304(5674):1158–60.
151. Paisán-Ruíz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simón J, van der Brug M, i sur. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron.* 2004;44(4):595–600.
152. Zimprich A, Müller-Myhsok B, Farrer M, Leitner P, Sharma M, Hulihan M, i sur. The PARK8 locus in autosomal dominant parkinsonism: confirmation of linkage and further delineation of the disease-containing interval. *Am J Hum Genet.* 2004;74(1):11–9.
153. Aharon-Peretz J, Rosenbaum H, Gershoni-Baruch R. Mutations in the glucocerebrosidase gene and Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *N Engl J Med.* 2004;351(19):1972–7.
154. Ascherio A, Schwarzschild MA. The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *Lancet Neurol.* 2016;15(12):1257–72.
155. Tran J, Anastacio H, Bardy C. Genetic predispositions of Parkinson's disease revealed in patient-derived brain cells. *NPJ Parkinsons Dis.* 2020;6:8.
156. Chai C, Lim KL. Genetic Insights into Sporadic Parkinson's Disease Pathogenesis. *Curr Genomics.* 2013 Dec;14(8):486-501.
157. Jankovic J, Tan EK. Parkinson's disease: etiopathogenesis and treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2020 Aug;91(8):795-808.
158. Feustel AC, MacPherson A, Fergusson DA, Kieburtz K, Kimmelman J. Risks and benefits of unapproved disease-modifying treatments for neurodegenerative disease. *Neurology.* 2020;94(1):e1–14.
159. Shoulson I. DATATOP: a decade of neuroprotective inquiry. Parkinson Study Group. Deprenyl And Tocopherol Antioxidative Therapy Of Parkinsonism. *Ann Neurol.* 1998;44(3 Suppl 1):S160-166.

160. Jankovic J, Berkovich E, Eyal E, Tolosa E. Symptomatic efficacy of rasagiline monotherapy in early Parkinson's disease: post-hoc analyses from the ADAGIO trial. *Parkinsonism Relat Disord*. 2014;20(6):640–3.
161. Jankovic J. Pathogenesis-targeted therapeutic strategies in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2019;34(1):41–4.
162. Brys M, Fanning L, Hung S, Ellenbogen A, Penner N, Yang M, i sur. Randomized phase I clinical trial of anti- $\alpha$ -synuclein antibody BIIB054. *Mov Disord*. 2019 ;34(8):1154–63.
163. Jankovic J, Goodman I, Safirstein B, Marmon TK, Schenk DB, Koller M, i sur. Safety and Tolerability of Multiple Ascending Doses of PRX002/RG7935, an Anti- $\alpha$ -Synuclein Monoclonal Antibody, in Patients With Parkinson Disease: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol*. 2018;75(10):1206–14.
164. Savitt D, Jankovic J. Targeting  $\alpha$ -Synuclein in Parkinson's Disease: Progress Towards the Development of Disease-Modifying Therapeutics. *Drugs*. 2019;79(8):797–810.
165. Seppi K, Ray Chaudhuri K, Coelho M, Fox SH, Katzenschlager R, Perez Lloret S, i sur. Update on treatments for nonmotor symptoms of Parkinson's disease-an evidence-based medicine review. *Mov Disord*. 2019;34(2):180–98.
166. Cummings J, Isaacson S, Mills R, Williams H, Chi-Burris K, Corbett A, i sur. Pimavanserin for patients with Parkinson's disease psychosis: a randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet*. 2014;383(9916):533–40.
167. Ryan M, Eatmon CV, Slevin JT. Drug treatment strategies for depression in Parkinson disease. *Expert Opin Pharmacother*. 2019;20(11):1351–63.
168. Palma JA, Kaufmann H. Treatment of autonomic dysfunction in Parkinson disease and other synucleinopathies. *Mov Disord*. 2018 Mar;33(3):372-390.
169. Fang JY, Tolleson C. The role of deep brain stimulation in Parkinson's disease: an overview and update on new developments. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2017;13:723-732.
170. Groiss SJ, Wojtecki L, Südmeyer M, Schnitzler A. Deep brain stimulation in Parkinson's disease. *Ther Adv Neurol Disord*. 2009;2(6):20–8.
171. Bronstein JM, Tagliati M, Alterman RL, Lozano AM, Volkmann J, Stefani A, i sur. Deep brain stimulation for Parkinson disease: an expert consensus and review of key issues. *Arch Neurol*. 2011;68(2):165.
172. Weaver F, Follett K, Hur K, Ippolito D, Stern M. Deep brain stimulation in Parkinson disease: a metaanalysis of patient outcomes. *J Neurosurg*. 2005;103(6):956–67.
173. Schlesinger I, Sinai A, Zaaroor M. MRI-Guided Focused Ultrasound in Parkinson's Disease: A Review. *Parkinsons Dis*. 2017;2017:8124624.
174. Martínez-Fernández R, Máñez-Miró JU, Rodríguez-Rojas R, Del Álamo M, Shah BB, Hernández-Fernández F, i sur. Randomized Trial of Focused Ultrasound Subthalamotomy for Parkinson's Disease. *N Engl J Med*. 2020;383(26):2501–13.

175. Stefanis L.  $\alpha$ -Synuclein in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(2):a009399.
176. Recchia A, Debetto P, Negro A, Guidolin D, Skaper SD, Giusti P. Alpha-synuclein and Parkinson's disease. *FASEB J.* 2004;18(6):617–26.
177. Xu L, Pu J. Alpha-Synuclein in Parkinson's Disease: From Pathogenetic Dysfunction to Potential Clinical Application. *Parkinsons Dis.* 2016;2016:1720621.
178. Brás IC, Outeiro TF. Alpha-Synuclein: Mechanisms of Release and Pathology Progression in Synucleinopathies. *Cells.* 2021;10(2):375.
179. Lee VMY, Trojanowski JQ. Mechanisms of Parkinson's disease linked to pathological alpha-synuclein: new targets for drug discovery. *Neuron.* 2006;52(1):33–8.
180. Henrich MT, Geibl FF, Lakshminarasimhan H, Stegmann A, Giasson BI, Mao X, i sur. Determinants of seeding and spreading of  $\alpha$ -synuclein pathology in the brain. *Sci Adv.* 2020;6(46):eabc2487.
181. Thomzig A, Wagenführ K, Pinder P, Joncic M, Schulz-Schaeffer WJ, Beekes M. Transmissible  $\alpha$ -synuclein seeding activity in brain and stomach of patients with Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* 2021;141(6):861–79.
182. Rahayel S, Mišić B, Zheng YQ, Liu ZQ, Abdelgawad A, Abbasi N, i sur. Differentially targeted seeding reveals unique pathological alpha-synuclein propagation patterns. *Brain.* 2022;145(5):1743–56.
183. Park JS, Davis RL, Sue CM. Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease: New Mechanistic Insights and Therapeutic Perspectives. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2018;18(5):21.
184. Moon HE, Paek SH. Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease. *Exp Neurol.* 2015 Jun;24(2):103-16.
185. Borsche M, Pereira SL, Klein C, Grünewald A. Mitochondria and Parkinson's Disease: Clinical, Molecular, and Translational Aspects. *J Parkinsons Dis.* 2021;11(1):45–60.
186. Prasuhn J, Davis RL, Kumar KR. Targeting Mitochondrial Impairment in Parkinson's Disease: Challenges and Opportunities. *Front Cell Dev Biol.* 2021;8:615461.
187. Malpartida AB, Williamson M, Narendra DP, Wade-Martins R, Ryan BJ. Mitochondrial Dysfunction and Mitophagy in Parkinson's Disease: From Mechanism to Therapy. *Trends Biochem Sci.* 2021 Apr;46(4):329-343.
188. Wright R. Mitochondrial dysfunction and Parkinson's disease. *Nat Neurosci.* 2022;25(1):2.
189. Kouli A, Camacho M, Allinson K, Williams-Gray CH. Neuroinflammation and protein pathology in Parkinson's disease dementia. *Acta Neuropathol Commun.* 2020;8(1):211.
190. Barnum CJ, Tansey MG. Modeling neuroinflammatory pathogenesis of Parkinson's disease. *Prog Brain Res.* 2010;184:113–32.

191. Tansey MG, Goldberg MS. Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiol Dis.* 2010 Mar;37(3):510-8.
192. Tansey MG, McCoy MK, Frank-Cannon TC. Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: Potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. *Exp Neurol.* 2007 Nov;208(1):1-25.
193. Lee JK, Tran T, Tansey MG. Neuroinflammation in Parkinson's disease. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2009 Dec;4(4):419–29.
194. Monahan AJ, Warren M, Carvey PM. Neuroinflammation and peripheral immune infiltration in Parkinson's disease: an autoimmune hypothesis. *Cell Transplant.* 2008;17(4):363–72.
195. Rocha NP, de Miranda AS, Teixeira AL. Insights into Neuroinflammation in Parkinson's Disease: From Biomarkers to Anti-Inflammatory Based Therapies. *Biomed Res Int.* 2015;2015:628192.
196. Çınar E, Tel BC, Şahin G. Neuroinflammation in Parkinson's Disease and its Treatment Opportunities. *Balkan Med J.* 2022;39(5):318–33.
197. Liddle RA. Parkinson's Disease from the Gut. *Brain Res.* 2018;1693(Pt B):201-206.
198. Breen DP, Halliday GM, Lang AE. Gut-brain axis and the spread of  $\alpha$ -synuclein pathology: Vagal highway or dead end? *Mov Disord.* 2019;34(3):307–16.
199. Challis C, Hori A, Sampson TR, Yoo BB, Challis RC, Hamilton AM, i sur. Gut-seeded  $\alpha$ -synuclein fibrils promote gut dysfunction and brain pathology specifically in aged mice. *Nat Neurosci.* 2020 Mar;23(3):327-336.
200. Schaeffer E, Kluge A, Böttner M, Zunke F, Cossais F, Berg D, i sur. Alpha Synuclein Connects the Gut-Brain Axis in Parkinson's Disease Patients - A View on Clinical Aspects, Cellular Pathology and Analytical Methodology. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:573696.
201. Rietdijk CD, Perez-Pardo P, Garssen J, van Wezel RJA, Kraneveld AD. Exploring Braak's Hypothesis of Parkinson's Disease. *Front Neurol.* 2017 ;8:37.
202. Lionnet A, Leclair-Visonneau L, Neunlist M, Murayama S, Takao M, Adler CH, i sur. Does Parkinson's disease start in the gut? *Acta Neuropathol.* 2018;135(1):1–12.
203. Borghammer P, Van Den Berge N. Brain-First versus Gut-First Parkinson's Disease: A Hypothesis. *J Parkinsons Dis.* 2019;9(s2):S281-S295.
204. Van Den Berge N, Ulusoy A. Animal models of brain-first and body-first Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2022;163:105599.
205. Fu P, Gao M, Yung KKL. Association of Intestinal Disorders with Parkinson's Disease and Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *ACS Chem Neurosci.* 2020;11(3):395–405.

206. Cheesman M, Ho H, Bishop K, Sin MK. Constipation Management in Parkinson Disease. *J Neurosci Nurs*. 2021;53(6):262–6.
207. Yu QJ, Yu SY, Zuo LJ, Lian TH, Hu Y, Wang RD, i sur. Parkinson disease with constipation: clinical features and relevant factors. *Sci Rep*. 2018;8(1):567.
208. Xu J, Wang L, Chen X, Le W. New Understanding on the Pathophysiology and Treatment of Constipation in Parkinson's Disease. *Front Aging Neurosci*. 2022;14:917499.
209. Svensson E, Henderson VW, Borghammer P, Horváth-Puhó E, Sørensen HT. Constipation and risk of Parkinson's disease: A Danish population-based cohort study. *Parkinsonism Relat Disord*. 2016;28:18–22.
210. Adams-Carr KL, Bestwick JP, Shribman S, Lees A, Schrag A, Noyce AJ. Constipation preceding Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016;87(7):710–6.
211. Stirpe P, Hoffman M, Badiali D, Colosimo C. Constipation: an emerging risk factor for Parkinson's disease? *Eur J Neurol*. 2016;23(11):1606–13.
212. Lin CH, Lin JW, Liu YC, Chang CH, Wu RM. Risk of Parkinson's disease following severe constipation: a nationwide population-based cohort study. *Parkinsonism Relat Disord*. 2014;20(12):1371–5.
213. Nakase T, Tatewaki Y, Thyreau B, Mutoh T, Tomita N, Yamamoto S, i sur. Impact of constipation on progression of Alzheimer's disease: A retrospective study. *CNS Neurosci Ther*. 2022 Dec;28(12):1964-1973.
214. Wang F, Fei M, Hu WZ, Wang XD, Liu S, Zeng Y, i sur. Prevalence of Constipation in Elderly and Its Association With Dementia and Mild Cognitive Impairment: A Cross-Sectional Study. *Front Neurosci*. 2022;15:821654.
215. Chen CL, Liang TM, Chen HH, Lee YY, Chuang YC, Chen NC. Constipation and Its Associated Factors among Patients with Dementia. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(23):9006.
216. Weimers P, Halfvarson J, Sachs MC, Saunders-Pullman R, Ludvigsson JF, Peter I, i sur. Inflammatory Bowel Disease and Parkinson's Disease: A Nationwide Swedish Cohort Study. *Inflamm Bowel Dis*. 2019;25(1):111–23.
217. Wang D, Zhang X, Du H. Inflammatory bowel disease: A potential pathogenic factor of Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2022;119:110610.
218. Rønnow Sand J, Troelsen FS, Horváth-Puhó E, Henderson VW, Sørensen HT, Erichsen R. Risk of dementia in patients with inflammatory bowel disease: a Danish population-based study. *Aliment Pharmacol Ther*. 2022 Sep;56(5):831-843.
219. Kim GH, Lee YC, Kim TJ, Kim ER, Hong SN, Chang DK, i sur. Risk of Neurodegenerative Diseases in Patients with Inflammatory Bowel Disease: A Nationwide Population-based Cohort Study. *J Crohns Colitis*. 2022;16(3):436-443.

220. Szandruk-Bender M, Wiatrak B, Szelağ A. The Risk of Developing Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease in Patients with Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis. *J Clin Med.* 2022;11(13):3704.
221. Zhang B, Wang HE, Bai YM, Tsai SJ, Su TP, Chen TJ, i sur. Inflammatory bowel disease is associated with higher dementia risk: a nationwide longitudinal study. *Gut.* 2021;70(1):85-91.
222. Cui G, Li S, Ye H, Yang Y, Huang Q, Chu Y, i sur. Are neurodegenerative diseases associated with an increased risk of inflammatory bowel disease? A two-sample Mendelian randomization study. *Front Immunol.* 2022;13:956005.
223. Li H, Wen Z. Effects of ulcerative colitis and Crohn's disease on neurodegenerative diseases: A Mendelian randomization study. *Front Genet.* 2022;13:846005.
224. Guo X, Chong L, Zhang X, Li R. Letter to the editor: Genetically determined IBD is associated with decreased risk of Alzheimer's disease: a Mendelian randomisation study. *Gut.* 2022;71(8):1688-1689.
225. Camacho-Soto A, Gross A, Searles Nielsen S, Dey N, Racette BA. Inflammatory bowel disease and risk of Parkinson's disease in Medicare beneficiaries. *Parkinsonism Relat Disord.* 2018;50:23–8.
226. Zheng H, Qian X, Tian W, Cao L. Exploration of the Common Gene Characteristics and Molecular Mechanism of Parkinson's Disease and Crohn's Disease from Transcriptome Data. *Brain Sci.* 2022;12(6):774.
227. Zhuang Z, Gao M, Yang R, Liu Z, Cao W, Huang T. Causal relationships between gut metabolites and Alzheimer's disease: a bidirectional Mendelian randomization study. *Neurobiol Aging.* 2021;100:119.e15-119.e18.
228. Ning J, Huang SY, Chen SD, Zhang YR, Huang YY, Yu JT. Investigating Casual Associations Among Gut Microbiota, Metabolites, and Neurodegenerative Diseases: A Mendelian Randomization Study. *J Alzheimers Dis.* 2022;87(1):211–22.
229. Adewuyi EO, O'Brien EK, Nyholt DR, Porter T, Laws SM. A large-scale genome-wide cross-trait analysis reveals shared genetic architecture between Alzheimer's disease and gastrointestinal tract disorders. *Commun Biol.* 2022;5(1):691.
230. Lee HS, Lobbetael E, Vermeire S, Sabino J, Cleynen I. Inflammatory bowel disease and Parkinson's disease: common pathophysiological links. *Gut.* 2021;70(2):408–17.
231. Hickman S, Izzy S, Sen P, Morsett L, El Khoury J. Microglia in neurodegeneration. *Nat Neurosci.* 2018;21(10):1359–69.
232. Perry VH, Nicoll JAR, Holmes C. Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol.* 2010;6(4):193–201.
233. Muzio L, Viotti A, Martino G. Microglia in Neuroinflammation and Neurodegeneration: From Understanding to Therapy. *Front Neurosci.* 2021;15:742065.

234. Erny D, Hrabě de Angelis AL, Jaitin D, Wieghofer P, Staszewski O, David E, i sur. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat Neurosci*. 2015;18(7):965–77.
235. Neish AS. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*. 2009;136(1):65–80.
236. Dinan TG, Cryan JF. Gut instincts: microbiota as a key regulator of brain development, ageing and neurodegeneration. *J Physiol*. 2017;595(2):489–503.
237. Cattaneo A, Cattane N, Galluzzi S, Provasi S, Lopizzo N, Festari C, i sur. Association of brain amyloidosis with pro-inflammatory gut bacterial taxa and peripheral inflammation markers in cognitively impaired elderly. *Neurobiol Aging*. 2017;49:60–8.
238. Knox EG, Aburto MR, Clarke G, Cryan JF, O’Driscoll CM. The blood-brain barrier in aging and neurodegeneration. *Mol Psychiatry*. 2022;27(6):2659–73.
239. Cockerill I, Oliver JA, Xu H, Fu BM, Zhu D. Blood-Brain Barrier Integrity and Clearance of Amyloid- $\beta$  from the BBB. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1097:261–78.
240. Takechi R, Pallegage-Gamarallage MM, Lam V, Giles C, Mamo JC. Aging-related changes in blood-brain barrier integrity and the effect of dietary fat. *Neurodegener Dis*. 2013;12(3):125–35.
241. Desai BS, Monahan AJ, Carvey PM, Hendey B. Blood-brain barrier pathology in Alzheimer’s and Parkinson’s disease: implications for drug therapy. *Cell Transplant*. 2007;16(3):285–99.
242. Carvey PM, Hendey B, Monahan AJ. The Blood Brain Barrier in Neurodegenerative Disease: A Rhetorical Perspective. *J Neurochem*. 2009;111(2):291-314.
243. Braniste V, Al-Asmakh M, Kowal C, Anuar F, Abbaspour A, Tóth M, i sur. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci Transl Med*. 2014;6(263):263ra158.
244. Takiishi T, Fenero CIM, Câmara NOS. Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life. *Tissue Barriers*. 2017;5(4):e1373208.
245. Sun Z, Song ZG, Liu C, Tan S, Lin S, Zhu J, i sur. Gut microbiome alterations and gut barrier dysfunction are associated with host immune homeostasis in COVID-19 patients. *BMC Med*. 2022;20(1):24.
246. Di Tommaso N, Gasbarrini A, Ponziani FR. Intestinal Barrier in Human Health and Disease. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(23):12836.
247. Camilleri M. The Leaky Gut: Mechanisms, Measurement and Clinical Implications in Humans. *Gut*. 2019;68(8):1516-1526.
248. Chakaroun RM, Massier L, Kovacs P. Gut Microbiome, Intestinal Permeability, and Tissue Bacteria in Metabolic Disease: Perpetrators or Bystanders? *Nutrients*. 2020;12(4):1082.



249. Köhler CA, Maes M, Slyepchenko A, Berk M, Solmi M, Lanctôt KL, i sur. The Gut-Brain Axis, Including the Microbiome, Leaky Gut and Bacterial Translocation: Mechanisms and Pathophysiological Role in Alzheimer's Disease. *Curr Pharm Des.* 2016;22(40):6152–66.
250. Pistollato F, Sumalla Cano S, Elio I, Masias Vergara M, Giampieri F, Battino M. Role of gut microbiota and nutrients in amyloid formation and pathogenesis of Alzheimer disease. *Nutr Rev.* 2016;74(10):624–34.
251. Jiang C, Li G, Huang P, Liu Z, Zhao B. The Gut Microbiota and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2017;58(1):1–15.
252. Romano S, Savva GM, Bedarf JR, Charles IG, Hildebrand F, Narbad A. Meta-analysis of the Parkinson's disease gut microbiome suggests alterations linked to intestinal inflammation. *NPJ Parkinsons Dis.* 2021;7(1):27.
253. Lubomski M, Xu X, Holmes AJ, Muller S, Yang JYH, Davis RL, i sur. The Gut Microbiome in Parkinson's Disease: A Longitudinal Study of the Impacts on Disease Progression and the Use of Device-Assisted Therapies. *Front Aging Neurosci.* 2022;14:875261.
254. Shen T, Yue Y, He T, Huang C, Qu B, Lv W, i sur. The Association Between the Gut Microbiota and Parkinson's Disease, a Meta-Analysis. *Front Aging Neurosci.* 2021;13:636545.
255. Nielsen SD, Pearson NM, Seidler K. The link between the gut microbiota and Parkinson's Disease: A systematic mechanism review with focus on  $\alpha$ -synuclein transport. *Brain Res.* 2021;1769:147609.
256. Hirayama M, Ohno K. Parkinson's Disease and Gut Microbiota. *Ann Nutr Metab.* 2021;77 Suppl 2:28–35.
257. Salim S, Ahmad F, Banu A, Mohammad F. Gut microbiome and Parkinson's disease: Perspective on pathogenesis and treatment. *J Adv Res.* 2022;S2090-1232(22)00242-9.
258. Rani L, Mondal AC. Unravelling the role of gut microbiota in Parkinson's disease progression: Pathogenic and therapeutic implications. *Neurosci Res.* 2021;168:100–12.
259. Walker AC, Bhargava R, Dove AS, Brust AS, Owji AA, Czyż DM. Bacteria-Derived Protein Aggregates Contribute to the Disruption of Host Proteostasis. *Int J Mol Sci.* 2022;23(9):4807.
260. Friedland RP, Chapman MR. The role of microbial amyloid in neurodegeneration. *PLoS Pathog.* 2017;13(12):e1006654.
261. Wang C, Lau CY, Ma F, Zheng C. Genome-wide screen identifies curli amyloid fibril as a bacterial component promoting host neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021;118(34):e2106504118.
262. Jasemi S, Paulus K, Noli M, Simula ER, Ruberto S, Sechi LA. Antibodies against HSV-1 and Curli Show the Highest Correlation in Parkinson's Disease Patients in Comparison to Healthy Controls. *Int J Mol Sci.* 2022;23(23):14816.

263. Chen SG, Stribinskis V, Rane MJ, Demuth DR, Gozal E, Roberts AM, et al. Exposure to the Functional Bacterial Amyloid Protein Curli Enhances Alpha-Synuclein Aggregation in Aged Fischer 344 Rats and *Caenorhabditis elegans*. *Sci Rep*. 2016;6:34477.
264. Dawson TM, Golde TE, Tourenne CL. Animal Models of Neurodegenerative Diseases. *Nat Neurosci*. 2018;21(10):1370-1379.
265. Ribeiro FM, Camargos ER da S, de Souza LC, Teixeira AL. Animal models of neurodegenerative diseases. *Braz J Psychiatry*. 2013;35 Suppl 2:S82-91.
266. Tello JA, Williams HE, Eppler RM, Steinhilb ML, Khanna M. Animal Models of Neurodegenerative Disease: Recent Advances in Fly Highlight Innovative Approaches to Drug Discovery. *Front Mol Neurosci*. 2022;15:883358.
267. Strome EM, Doudet DJ. Animal models of neurodegenerative disease: insights from in vivo imaging studies. *Mol Imaging Biol*. 2007;9(4):186-95.
268. Phillips W, Michell A, Pruess H, Barker RA. Animal models of neurodegenerative diseases. *Methods Mol Biol*. 2009;549:137-55.
269. Alexander AG, Marfil V, Li C. Use of *Caenorhabditis elegans* as a model to study Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Front Genet*. 2014;5:279.
270. Alvarez J, Alvarez-Illera P, Santo-Domingo J, Fonteriz RI, Montero M. Modeling Alzheimer's Disease in *Caenorhabditis elegans*. *Biomedicines*. 2022;10(2):288.
271. Hughes S, van Dop M, Kolsters N, van de Klashorst D, Pogosova A, Rijs AM. Using a *Caenorhabditis elegans* Parkinson's Disease Model to Assess Disease Progression and Therapy Efficiency. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022;15(5):512.
272. Youssef K, Tandon A, Rezai P. Studying Parkinson's disease using *Caenorhabditis elegans* models in microfluidic devices. *Integr Biol (Camb)*. 2019;11(5):186-207.
273. Schmidt E, Seifert M, Baumeister R. *Caenorhabditis elegans* as a model system for Parkinson's disease. *Neurodegener Dis*. 2007;4(2-3):199-217.
274. Cooper JF, Van Raamsdonk JM. Modeling Parkinson's Disease in *C. elegans*. *J Parkinsons Dis*. 2018;8(1):17-32.
275. Emborg ME. Nonhuman primate models of Parkinson's disease. *ILAR J*. 2007;48(4):339-55.
276. Potts LF, Wu H, Singh A, Marcilla I, Luquin MR, Papa SM. Modeling Parkinson's disease in monkeys for translational studies, a critical analysis. *Exp Neurol*. 2014;256:133-43.
277. Porras G, Li Q, Bezard E. Modeling Parkinson's disease in primates: The MPTP model. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(3):a009308.
278. Beckman D, Morrison JH. Towards developing a rhesus monkey model of early Alzheimer's disease focusing on women's health. *Am J Primatol*. 2021;83(11):e23289.

279. Beckman D, Chakrabarty P, Ott S, Dao A, Zhou E, Janssen WG, i sur. A novel tau-based rhesus monkey model of Alzheimer's pathogenesis. *Alzheimers Dement.* 2021;17(6):933–45.
280. Yeo HG, Lee Y, Jeon CY, Jeong KJ, Jin YB, Kang P, i sur. Characterization of Cerebral Damage in a Monkey Model of Alzheimer's Disease Induced by Intracerebroventricular Injection of Streptozotocin. *J Alzheimers Dis.* 2015;46(4):989–1005.
281. Souder DC, Dreischmeier IA, Smith AB, Wright S, Martin SA, Sagar MAK, i sur. Rhesus monkeys as a translational model for late-onset Alzheimer's disease. *Aging Cell.* 2021;20(6):e13374.
282. Stonebarger GA, Bimonte-Nelson HA, Urbanski HF. The Rhesus Macaque as a Translational Model for Neurodegeneration and Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci.* 2021;13:734173.
283. Salkovic-Petrisic M, Perhoc AB, Homolak J, Knezovic A, Osmanovic Barilar J, Riederer P. Experimental Approach to Alzheimer's Disease with Emphasis on Insulin Resistance in the Brain. In: Kostrzewa RM, editor. *Handbook of Neurotoxicity* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2021 [pristupljeno 07.09.2021.]; 1–52. Dostupno na: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-71519-9\\_98-1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-71519-9_98-1)
284. Webster SJ, Bachstetter AD, Nelson PT, Schmitt FA, Van Eldik LJ. Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Front Genet.* 2014;5:88.
285. Dunnett SB, Lelos M. Behavioral analysis of motor and non-motor symptoms in rodent models of Parkinson's disease. In: Björklund A, Cenci MA, editors. *Progress in Brain Research* [Internet]. Elsevier; 2010 [pristupljeno 04.01.2023.]; 35–51. (Recent Advances in Parkinson's Disease; vol. 184). Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079612310840038>
286. During EH, Osorio RS, Elahi FM, Mosconi L, de Leon MJ. The concept of FDG-PET endophenotype in Alzheimer's disease. *Neurol Sci.* 2011;32(4):559–69.
287. Makin S. The amyloid hypothesis on trial. *Nature.* 2018;559(7715):S4–7.
288. Lane E, Dunnett S. Animal models of Parkinson's disease and L-dopa induced dyskinesia: How close are we to the clinic? *Psychopharmacology (Berl).* 2008;199(3):303–12.
289. Baronti F, Mouradian MM, Conant KE, Giuffra M, Brughitta G, Chase TN. Partial dopamine agonist therapy of levodopa-induced dyskinesias. *Neurology.* 1992;42(6):1241–3.
290. Linazasoro G. Recent failures of new potential symptomatic treatments for Parkinson's disease: causes and solutions. *Mov Disord.* 2004;19(7):743–54.
291. Fox SH, Lang AE, Brotchie JM. Translation of nondopaminergic treatments for levodopa-induced dyskinesia from MPTP-lesioned nonhuman primates to phase IIa clinical studies: keys to success and roads to failure. *Mov Disord.* 2006;21(10):1578–94.

292. Foidl BM, Humpel C. Can mouse models mimic sporadic Alzheimer's disease? *Neural Regen Res.* 2020;15(3):401-406.
293. Kawabata S, Higgins GA, Gordon JW. Amyloid plaques, neurofibrillary tangles and neuronal loss in brains of transgenic mice overexpressing a C-terminal fragment of human amyloid precursor protein. *Nature.* 1991;354(6353):476-8.
294. Wirak DO, Bayney R, Ramabhadran TV, Fracasso RP, Hart JT, Hauer PE, i sur. Deposits of amyloid beta protein in the central nervous system of transgenic mice. *Science.* 1991;253(5017):323-5.
295. Kawabata S, Higgins GA, Gordon JW. Alzheimer's retraction. *Nature.* 1992;356(6364):23.
296. Spire TL, Hyman BT. Transgenic Models of Alzheimer's Disease: Learning from Animals. *NeuroRx.* 2005;2(3):423-37.
297. Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, i sur. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature.* 1995;373(6514):523-7.
298. Quon D, Wang Y, Catalano R, Scardina JM, Murakami K, Cordell B. Formation of beta-amyloid protein deposits in brains of transgenic mice. *Nature.* 1991;352(6332):239-41.
299. Mucke L, Masliah E, Johnson WB, Ruppe MD, Alford M, Rockenstein EM, i sur. Synaptotrophic effects of human amyloid beta protein precursors in the cortex of transgenic mice. *Brain Res.* 1994;666(2):151-67.
300. Higgins LS, Holtzman DM, Rabin J, Mobley WC, Cordell B. Transgenic mouse brain histopathology resembles early Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 1994;35(5):598-607.
301. Masliah E, Sisk A, Mallory M, Mucke L, Schenk D, Games D. Comparison of neurodegenerative pathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein and Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 1996;16(18):5795-811.
302. Irizarry MC, Soriano F, McNamara M, Page KJ, Schenk D, Games D, i sur. Abeta deposition is associated with neuropil changes, but not with overt neuronal loss in the human amyloid precursor protein V717F (PDAPP) transgenic mouse. *J Neurosci.* 1997;17(18):7053-9.
303. Masliah E, Sisk A, Mallory M, Games D. Neurofibrillary pathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2001;60(4):357-68.
304. Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, i sur. Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science.* 1996;274(5284):99-102.
305. Chapman PF, White GL, Jones MW, Cooper-Blacketer D, Marshall VJ, Irizarry M, i sur. Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat Neurosci.* 1999;2(3):271-6.

306. Irizarry MC, McNamara M, Fedorchak K, Hsiao K, Hyman BT. APPSw transgenic mice develop age-related A beta deposits and neuropil abnormalities, but no neuronal loss in CA1. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1997;56(9):965–73.
307. Elder GA, Gama Sosa MA, De Gasperi R. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med.* 2010;77(1):69–81.
308. Janus C, Westaway D. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Physiol Behav.* 2001;73(5):873–86.
309. Sanchez-Varo R, Mejias-Ortega M, Fernandez-Valenzuela JJ, Nuñez-Díaz C, Caceres-Palomo L, Vegas-Gomez L, i sur. Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease: An Integrative Analysis. *Int J Mol Sci.* 2022;23(10):5404.
310. Platt TL, Reeves VL, Murphy MP. Transgenic models of Alzheimer's disease: better utilization of existing models through viral transgenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1832(9):1437–48.
311. Götz J, Streffer JR, David D, Schild A, Hoernkli F, Pennanen L, i sur. Transgenic animal models of Alzheimer's disease and related disorders: histopathology, behavior and therapy. *Mol Psychiatry.* 2004;9(7):664–83.
312. Price DL, Tanzi RE, Borchelt DR, Sisodia SS. Alzheimer's disease: genetic studies and transgenic models. *Annu Rev Genet.* 1998;32:461–93.
313. Myers A, McGonigle P. Overview of Transgenic Mouse Models for Alzheimer's Disease. *Curr Protoc Neurosci.* 2019;89(1):e81.
314. Higgins GA, Jacobsen H. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease: phenotype and application. *Behav Pharmacol.* 2003;14(5–6):419–38.
315. Bornemann KD, Staufenbiel M. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;908:260–6.
316. Hock BJ, Lamb BT. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Trends Genet.* 2001;17(10):S7-12.
317. Kitazawa M, Medeiros R, Laferla FM. Transgenic mouse models of Alzheimer disease: developing a better model as a tool for therapeutic interventions. *Curr Pharm Des.* 2012;18(8):1131–47.
318. Honarpisheh P, Reynolds CR, Blasco Conesa MP, Moruno Manchon JF, Putluri N, Bhattacharjee MB, i sur. Dysregulated Gut Homeostasis Observed Prior to the Accumulation of the Brain Amyloid- $\beta$  in Tg2576 Mice. *Int J Mol Sci.* 2020;21(5).
319. Semar S, Klotz M, Letiembre M, Van Ginneken C, Braun A, Jost V, i sur. Changes of the enteric nervous system in amyloid- $\beta$  protein precursor transgenic mice correlate with disease progression. *J Alzheimers Dis.* 2013;36(1):7–20.
320. Brandscheid C, Schuck F, Reinhardt S, Schäfer KH, Pietrzik CU, Grimm M, i sur. Altered Gut Microbiome Composition and Tryptic Activity of the 5xFAD Alzheimer's Mouse Model. *J Alzheimers Dis.* 2017;56(2):775–88.

321. Chi H, Cao W, Zhang M, Su D, Yang H, Li Z, i sur. Environmental noise stress disturbs commensal microbiota homeostasis and induces oxi-inflammation and AD-like neuropathology through epithelial barrier disruption in the EOAD mouse model. *J Neuroinflammation*. 2021;18(1):9.
322. Wang Y, An Y, Ma W, Yu H, Lu Y, Zhang X, i sur. 27-Hydroxycholesterol contributes to cognitive deficits in APP/PS1 transgenic mice through microbiota dysbiosis and intestinal barrier dysfunction. *J Neuroinflammation*. 2020;17(1):199.
323. Al-Nakkash L, Mason D, Ismail N, Bowman T, Ahlert J, Rubin M, i sur. Exercise Training Prevents the Loss of Wall Thickness and Lowers Expression of Alzheimer's Related Proteins in 3xTg Mouse Jejunum. *Int J Environ Res Public Health*. 2022;19(21):14164.
324. Manocha GD, Floden AM, Miller NM, Smith AJ, Nagamoto-Combs K, Saito T, i sur. Temporal Progression of Alzheimer's disease in Brains and Intestines of Transgenic Mice. *Neurobiol Aging*. 2019;81:166-176.
325. Kim JE, Park JJ, Lee MR, Choi JY, Song BR, Park JW, i sur. Constipation in Tg2576 mice model for Alzheimer's disease associated with dysregulation of mechanism involving the mAChR signaling pathway and ER stress response. *PLoS One*. 2019;14(4):e0215205.
326. Stoye NM, Dos Santos Guilherme M, Endres K. Alzheimer's disease in the gut-Major changes in the gut of 5xFAD model mice with ApoA1 as potential key player. *FASEB J*. 2020;34(9):11883–99.
327. Nguyen VTT, Brücker L, Volz AK, Baumgärtner JC, Dos Santos Guilherme M, Valeri F, i sur. Primary Cilia Structure Is Prolonged in Enteric Neurons of 5xFAD Alzheimer's Disease Model Mice. *Int J Mol Sci*. 2021;22(24):13564.
328. Gorman MR, Yellon S. Lifespan daily locomotor activity rhythms in a mouse model of amyloid-induced neuropathology. *Chronobiol Int*. 2010;27(6):1159–77.
329. Bardgett ME, Davis NN, Schultheis PJ, Griffith MS. Ciproxifan, an H3 receptor antagonist, alleviates hyperactivity and cognitive deficits in the APP Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Learn Mem*. 2011;95(1):64–72.
330. Babic Perhoc A, Osmanovic Barilar J, Knezovic A, Farkas V, Bagaric R, Svarc A, i sur. Cognitive, behavioral and metabolic effects of oral galactose treatment in the transgenic Tg2576 mice. *Neuropharmacology*. 2019;148:50–67.
331. Bedrosian TA, Herring KL, Weil ZM, Nelson RJ. Altered temporal patterns of anxiety in aged and amyloid precursor protein (APP) transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(28):11686–91.
332. Pietropaolo S, Feldon J, Yee BK. Age-dependent phenotypic characteristics of a triple transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Behav Neurosci*. 2008;122(4):733–47.
333. Sterniczuk R, Dyck RH, Laferla FM, Antle MC. Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: part 1. Circadian changes. *Brain Res*. 2010;1348:139–48.

334. Rustay NR, Cronin EA, Curzon P, Markosyan S, Bitner RS, Ellis TA, i sur. Mice expressing the Swedish APP mutation on a 129 genetic background demonstrate consistent behavioral deficits and pathological markers of Alzheimer's disease. *Brain Res.* 2010;1311:136–47.
335. Walker JM, Fowler SW, Miller DK, Sun AY, Weisman GA, Wood WG, i sur. Spatial learning and memory impairment and increased locomotion in a transgenic amyloid precursor protein mouse model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res.* 2011;222(1):169–75.
336. Arendash GW, King DL, Gordon MN, Morgan D, Hatcher JM, Hope CE, i sur. Progressive, age-related behavioral impairments in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin-1 transgenes. *Brain Res.* 2001;891(1–2):42–53.
337. Van Dam D, D'Hooge R, Staufenbiel M, Van Ginneken C, Van Meir F, De Deyn PP. Age-dependent cognitive decline in the APP23 model precedes amyloid deposition. *Eur J Neurosci.* 2003;17(2):388–96.
338. Zhang Q, Du G, John V, Kapahi P, Bredesen DE. Alzheimer's Model Develops Early ADHD Syndrome. *J Neurol Neurophysiol.* 2015;6(6):1–6.
339. Rodgers SP, Born HA, Das P, Jankowsky JL. Transgenic APP expression during postnatal development causes persistent locomotor hyperactivity in the adult. *Mol Neurodegener.* 2012;7:28.
340. Jankowsky JL, Slunt HH, Gonzales V, Savonenko AV, Wen JC, Jenkins NA, i sur. Persistent amyloidosis following suppression of Abeta production in a transgenic model of Alzheimer disease. *PLoS Med.* 2005;2(12):e355.
341. Sarasa M, Pesini P. Natural Non-Transgenic Animal Models for Research in Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res.* 2009;6(2):171-8.
342. Johnstone EM, Chaney MO, Norris FH, Pascual R, Little SP. Conservation of the sequence of the Alzheimer's disease amyloid peptide in dog, polar bear and five other mammals by cross-species polymerase chain reaction analysis. *Brain Res Mol Brain Res.* 1991;10(4):299–305.
343. Sparks DL, Schreurs BG. Trace amounts of copper in water induce beta-amyloid plaques and learning deficits in a rabbit model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(19):11065–9.
344. Shree S, Bhardwaj R, Kashish, Deshmukh R. Non-transgenic Animal Models of Alzheimer's Disease. In: Bansal PK, Deshmukh R, editors. *Animal Models of Neurological Disorders: Principle and Working Procedure for Animal Models of Neurological Disorders* [Internet]. Singapore: Springer; 2017 [pristupljeno 30.12.2022.]; 3–22. Dostupno na: [https://doi.org/10.1007/978-981-10-5981-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-10-5981-0_2)
345. Mayer G, Nitsch R, Hoyer S. Effects of changes in peripheral and cerebral glucose metabolism on locomotor activity, learning and memory in adult male rats. *Brain Res.* 1990;532(1-2):95-100.

346. Lacković Z, Šalković M. Streptozotocin and alloxan produce alterations in rat brain monoamines independently of pancreatic beta cells destruction. *Life Sci.* 1990;46(1):49-54.
347. Ganda OP, Rossini AA, Like AA. Studies on streptozotocin diabetes. *Diabetes.* 1976;25(7):595–603.
348. Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul CL, Ramarao P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res.* 2005;52(4):313–20.
349. Sharma M, Gupta YK. Intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats produces both oxidative stress in the brain and cognitive impairment. *Life Sci.* 2001;68(9):1021-9.
350. Kraska A, Santin MD, Dorieux O, Joseph-Mathurin N, Bourrin E, Petit F, i sur. In Vivo Cross-sectional Characterization of Cerebral Alterations Induced by Intracerebroventricular Administration of Streptozotocin. *PLoS One.* 2012;7(9):e46196.
351. Correia SC, Santos RX, Santos MS, Casadesus G, Lamanna JC, Perry G, i sur. Mitochondrial abnormalities in a streptozotocin-induced rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 2013;10(4):406–19.
352. Bloch K, Gil-Ad I, Vanichkin A, Hornfeld SH, Koroukhov N, Taler M, i sur. Intracerebroventricular Streptozotocin Induces Obesity and Dementia in Lewis Rats. *J Alzheimers Dis.* 2017;60(1):121–36.
353. Biswas J, Gupta S, Verma DK, Gupta P, Singh A, Tiwari S, i sur. Involvement of glucose related energy crisis and endoplasmic reticulum stress: Insinuation of streptozotocin induced Alzheimer's like pathology. *Cell Signal.* 2018;42:211-226.
354. Mishra SK, Singh S, Shukla S, Shukla R. Intracerebroventricular streptozotocin impairs adult neurogenesis and cognitive functions via regulating neuroinflammation and insulin signaling in adult rats. *Neurochem Int.* 2018;113:56–68.
355. Salkovic-Petrisic M, Knezovic A, Hoyer S, Riederer P. What have we learned from the streptozotocin-induced animal model of sporadic Alzheimer's disease, about the therapeutic strategies in Alzheimer's research. *J Neural Transm (Vienna).* 2013;120(1):233-52.
356. Kamat PK, Kalani A, Rai S, Tota SK, Kumar A, Ahmad AS. Streptozotocin Intracerebroventricular-Induced Neurotoxicity and Brain Insulin Resistance: a Therapeutic Intervention for Treatment of Sporadic Alzheimer's Disease (sAD)-Like Pathology. *Mol Neurobiol.* 2016;53(7):4548-62.
357. Grieb P. Intracerebroventricular Streptozotocin Injections as a Model of Alzheimer's Disease: in Search of a Relevant Mechanism. *Mol Neurobiol.* 2016;53(3):1741–52.
358. Lester-Coll N, Rivera EJ, Soscia SJ, Doiron K, Wands JR, de la Monte SM. Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: relevance to sporadic Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2006;9(1):13–33.



359. Salkovic-Petrisic M, Osmanovic-Barilar J, Brückner MK, Hoyer S, Arendt T, Riederer P. Cerebral amyloid angiopathy in streptozotocin rat model of sporadic Alzheimer's disease: a long-term follow up study. *J Neural Transm (Vienna)*. 2011;118(5):765–72.
360. Knezovic A, Osmanovic-Barilar J, Curlin M, Hof PR, Simic G, Riederer P, i sur. Staging of cognitive deficits and neuropathological and ultrastructural changes in streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna)*. 2015;122(4):577–92.
361. Barilar JO, Knezovic A, Grünblatt E, Riederer P, Salkovic-Petrisic M. Nine-month follow-up of the insulin receptor signalling cascade in the brain of streptozotocin rat model of sporadic Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna)*. 2015;122(4):565–76.
362. Guo Z, Chen Y, Mao YF, Zheng T, Jiang Y, Yan Y, i sur. Long-term treatment with intranasal insulin ameliorates cognitive impairment, tau hyperphosphorylation, and microglial activation in a streptozotocin-induced Alzheimer's rat model. *Sci Rep*. 2017;7:45971.
363. Reeta KH, Singh D, Gupta YK. Chronic treatment with taurine after intracerebroventricular streptozotocin injection improves cognitive dysfunction in rats by modulating oxidative stress, cholinergic functions and neuroinflammation. *Neurochem Int*. 2017;108:146–56.
364. Rodrigues MV, Gutierrez JM, Carvalho F, Lopes TF, Antunes V, da Costa P, i sur. Protection of cholinergic and antioxidant system contributes to the effect of Vitamin D3 ameliorating memory dysfunction in sporadic dementia of Alzheimer's type. *Redox Rep*. 2019;24(1):34-40.
365. Yuliani T, Lobentanzer S, Klein J. Central cholinergic function and metabolic changes in streptozotocin-induced rat brain injury. *J Neurochem*. 2021;158(6):1307-1319.
366. Silva SSL, Tureck LV, Souza LC, Mello-Hortega JV, Piumbini AL, Teixeira MD, i sur. Animal model of Alzheimer's disease induced by streptozotocin: New insights about cholinergic pathway. *Brain Res*. 2023;1799:148175.
367. Michailidis M, Moraitou D, Tata DA, Kalinderi K, Papamitsou T, Papaliagkas V. Alzheimer's Disease as Type 3 Diabetes: Common Pathophysiological Mechanisms between Alzheimer's Disease and Type 2 Diabetes. *Int J Mol Sci*. 2022;23(5):2687.
368. Nguyen TT, Ta QTH, Nguyen TKO, Nguyen TTD, Giau VV. Type 3 Diabetes and Its Role Implications in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci*. 2020;21(9):3165.
369. Hoyer S. Glucose metabolism and insulin receptor signal transduction in Alzheimer disease. *Eur J Pharmacol*. 2004;490(1–3):115–25.
370. Talbot K. Brain insulin resistance in Alzheimer's disease and its potential treatment with GLP-1 analogs. *Neurodegener Dis Manag*. 2014;4(1):31-40.
371. De Felice FG, Lourenco MV, Ferreira ST. How does brain insulin resistance develop in Alzheimer's disease? *Alzheimers Dement*. 2014;10(1 Suppl):S26-32.

372. de la Monte SM, Tong M. Brain metabolic dysfunction at the core of Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol.* 2014;88(4):548–59.
373. Hoyer S, Lannert H. Long-term abnormalities in brain glucose/energy metabolism after inhibition of the neuronal insulin receptor: implication of tau-protein. *J Neural Transm Suppl.* 2007;(72):195–202.
374. Barilar JO, Knezovic A, Perhoc AB, Homolak J, Riederer P, Salkovic-Petrisic M. Shared cerebral metabolic pathology in non-transgenic animal models of Alzheimer's and Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna).* 2020;127(2):231-250.
375. Heo JH, Lee SR, Lee ST, Lee KM, Oh JH, Jang DP, i sur. Spatial distribution of glucose hypometabolism induced by intracerebroventricular streptozotocin in monkeys. *J Alzheimers Dis.* 2011;25(3):517–23.
376. Knezovic A, Osmanovic Barilar J, Babic A, Bagaric R, Farkas V, Riederer P, i sur. Glucagon-like peptide-1 mediates effects of oral galactose in streptozotocin-induced rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Neuropharmacology.* 2018;135:48–62.
377. Grünblatt E, Salkovic-Petrisic M, Osmanovic J, Riederer P, Hoyer S. Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. *J Neurochem.* 2007;101(3):757–70.
378. Talbot K, Wang HY. The nature, significance, and glucagon-like peptide-1 analog treatment of brain insulin resistance in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2014;10(1 Suppl):S12-25.
379. Boccardi V, Murasecco I, Mecocci P. Diabetes drugs in the fight against Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev.* 2019;54:100936.
380. Michailidis M, Tata DA, Moraitou D, Kavvadas D, Karachrysafi S, Papamitsou T, i sur. Antidiabetic Drugs in the Treatment of Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* 2022;23(9):4641.
381. Pilipenko V, Narbutė K, Pupure J, Langrate IK, Muceniece R, Kluša V. Neuroprotective potential of antihyperglycemic drug metformin in streptozotocin-induced rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol.* 2020;881:173290.
382. Mosconi L. Glucose metabolism in normal aging and Alzheimer's disease: Methodological and physiological considerations for PET studies. *Clin Transl Imaging.* 2013;1(4).
383. Dansokho C, Heneka MT. Neuroinflammatory responses in Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna).* 2018;125(5):771–9.
384. Gao Y, Tan L, Yu JT, Tan L. Tau in Alzheimer's Disease: Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Curr Alzheimer Res.* 2018;15(3):283–300.
385. Tobore TO. On the central role of mitochondria dysfunction and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurol Sci.* 2019;40(8):1527–40.

386. Konnova EA, Swanberg M. Animal Models of Parkinson's Disease. *Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects* [Internet]. Codon Publications; 2018 [pristupljeno 30.12.2022.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK536725/>
387. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*. 1997;388(6645):839–40.
388. Fleming SM, Fernagut PO, Chesselet MF. Genetic mouse models of parkinsonism: strengths and limitations. *NeuroRx*. 2005;2(3):495–503.
389. Chesselet MF, Richter F, Zhu C, Magen I, Watson MB, Subramaniam SR. A progressive mouse model of Parkinson's disease: the Thy1-aSyn ("Line 61") mice. *Neurotherapeutics*. 2012;9(2):297–314.
390. Volpicelli-Daley LA, Kirik D, Stoyka LE, Standaert DG, Harms AS. How can rAAV- $\alpha$ -synuclein and the fibril  $\alpha$ -synuclein models advance our understanding of Parkinson's disease? *J Neurochem*. 2016;139 Suppl 1(Suppl 1):131–55.
391. Decressac M, Mattsson B, Lundblad M, Weikop P, Björklund A. Progressive neurodegenerative and behavioural changes induced by AAV-mediated overexpression of  $\alpha$ -synuclein in midbrain dopamine neurons. *Neurobiol Dis*. 2012;45(3):939–53.
392. Van der Perren A, Van den Haute C, Baekelandt V. Viral vector-based models of Parkinson's disease. *Curr Top Behav Neurosci*. 2015;22:271–301.
393. Kirik D, Rosenblad C, Burger C, Lundberg C, Johansen TE, Muzyczka N, i sur. Parkinson-like neurodegeneration induced by targeted overexpression of alpha-synuclein in the nigrostriatal system. *J Neurosci*. 2002;22(7):2780–91.
394. Oliveras-Salvá M, Van der Perren A, Casadei N, Stroobants S, Nuber S, D'Hooge R, i sur. rAAV2/7 vector-mediated overexpression of alpha-synuclein in mouse substantia nigra induces protein aggregation and progressive dose-dependent neurodegeneration. *Mol Neurodegener*. 2013;8:44.
395. Schober A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res*. 2004;318(1):215–24.
396. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*. 2003;39(6):889–909.
397. Jackson-Lewis V, Blesa J, Przedborski S. Animal models of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2012;18 Suppl 1:S183-185.
398. Giovanni A, Sieber BA, Heikkila RE, Sonsalla PK. Studies on species sensitivity to the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Part 1: Systemic administration. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994;270(3):1000–7.
399. Sedelis M, Hofele K, Auburger GW, Morgan S, Huston JP, Schwarting RK. MPTP susceptibility in the mouse: behavioral, neurochemical, and histological analysis of gender and strain differences. *Behav Genet*. 2000;30(3):171–82.

400. Zhang QS, Heng Y, Mou Z, Huang JY, Yuan YH, Chen NH. Reassessment of subacute MPTP-treated mice as animal model of Parkinson's disease. *Acta Pharmacol Sin.* 2017;38(10):1317–28.
401. Vermilyea SC, Emborg ME.  $\alpha$ -Synuclein and nonhuman primate models of Parkinson's disease. *J Neurosci Methods.* 2015;255:38–51.
402. Nisticò R, Mehdawy B, Piccirilli S, Mercuri N. Paraquat- and rotenone-induced models of Parkinson's disease. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2011;24(2):313–22.
403. Berry C, La Vecchia C, Nicotera P. Paraquat and Parkinson's disease. *Cell Death Differ.* 2010;17(7):1115–25.
404. Kamel F. Epidemiology. Paths from pesticides to Parkinson's. *Science.* 2013;341(6147):722–3.
405. Bonnef-Barkay D, Reaney SH, Langston WJ, Di Monte DA. Redox cycling of the herbicide paraquat in microglial cultures. *Brain Res Mol Brain Res.* 2005;134(1):52–6.
406. Bartlett RM, Holden JE, Nickles RJ, Murali D, Barbee DL, Barnhart TE, et al. Paraquat is excluded by the blood brain barrier in rhesus macaque: An in vivo pet study. *Brain Res.* 2009;1259:74–9.
407. Naylor JL, Widdowson PS, Simpson MG, Farnworth M, Ellis MK, Lock EA. Further evidence that the blood/brain barrier impedes paraquat entry into the brain. *Hum Exp Toxicol.* 1995;14(7):587–94.
408. Cannon JR, Tapias V, Na HM, Honick AS, Drolet RE, Greenamyre JT. A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2009;34(2):279–90.
409. García-García F, Ponce S, Brown R, Cussen V, Krueger JM. Sleep disturbances in the rotenone animal model of Parkinson disease. *Brain Res.* 2005;1042(2):160–8.
410. Thiruchelvam M, Richfield EK, Baggs RB, Tank AW, Cory-Slechta DA. The nigrostriatal dopaminergic system as a preferential target of repeated exposures to combined paraquat and maneb: implications for Parkinson's disease. *J Neurosci.* 2000;20(24):9207–14.
411. Tieu K. A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2011;1(1):a009316.
412. Ungerstedt U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol.* 1968;5(1):107–10.
413. Bové J, Perier C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience.* 2012;211:51–76.
414. Jellinger K, Linert L, Kienzl E, Herlinger E, Youdim MB. Chemical evidence for 6-hydroxydopamine to be an endogenous toxic factor in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.* 1995;46:297–314.

415. Borah A, Mohanakumar KP. L-DOPA induced-endogenous 6-hydroxydopamine is the cause of aggravated dopaminergic neurodegeneration in Parkinson's disease patients. *Med Hypotheses*. 2012;79(2):271–3.
416. Torres EM, Dunnett SB. Amphetamine induced rotation in the assessment of lesions and grafts in the unilateral rat model of Parkinson's disease. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2007;17(3):206–14.
417. Goldstein DS, Kopin IJ. Evolution of concepts of stress. *Stress*. 2007;10(2):109–20.
418. Gomes M da M, Engelhardt E. Claude Bernard: bicentenary of birth and his main contributions to neurology. *Arq Neuropsiquiatr*. 2014;72(4):322–5.
419. Billman GE. Homeostasis: The Underappreciated and Far Too Often Ignored Central Organizing Principle of Physiology. *Front Physiol*. 2020;11:200.
420. Cannon WB. Organization for physiological homeostasis. *Physiological Reviews* [Internet]. 1929 [pristupljeno 19.04.2021.];9(3):399–431. Dostupno na: <https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/physrev.1929.9.3.399>
421. Timme-Laragy AR, Hahn ME, Hansen JM, Rastogi A, Roy MA. Redox stress and signaling during vertebrate embryonic development: regulation and responses. *Semin Cell Dev Biol*. 2018;80:17-28.
422. Hansen JM, Harris C. A novel hypothesis for thalidomide-induced limb teratogenesis: redox misregulation of the NF-kappaB pathway. *Antioxid Redox Signal*. 2004;6(1):1–14.
423. Kaludercic N, Deshwal S, Di Lisa F. Reactive oxygen species and redox compartmentalization. *Front Physiol*. 2014;5:285.
424. Wang RS, Oldham WM, Maron BA, Loscalzo J. Systems Biology Approaches to Redox Metabolism in Stress and Disease States. *Antioxid Redox Signal*. 2018;29(10):953-972.
425. Arrigo AP. Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic Biol Med*. 1999;27(9–10):936–44.
426. Jevtović-Todorović V, Guenther TM. Depletion of a discrete nuclear glutathione pool by oxidative stress, but not by buthionine sulfoximine. Correlation with enhanced alkylating agent cytotoxicity to human melanoma cells in vitro. *Biochem Pharmacol*. 1992;44(7):1383–93.
427. Ursini F, Maiorino M, Forman HJ. Redox homeostasis: The Golden Mean of healthy living. *Redox Biol*. 2016;8:205–15.
428. Buettner GR, Wagner BA, Rodgers VGJ. Quantitative Redox Biology: An approach to understanding the role of reactive species in defining the cellular redox environment. *Cell Biochem Biophys*. 2013;67(2):477-83.
429. Groeger AL, Freeman BA. Signaling Actions of Electrophiles: Anti-inflammatory Therapeutic Candidates. *Mol Interv*. 2010;10(1):39-50.

430. Vinogradova EV, Zhang X, Remillard D, Lazar DC, Suciu RM, Wang Y, i sur. An Activity-Guided Map of Electrophile-Cysteine Interactions in Primary Human T Cells. *Cell*. 2020;182(4):1009-1026.e29.
431. Kosmachevskaya OV, Shumaev KB, Topunov AF. Electrophilic Signaling: The Role of Reactive Carbonyl Compounds. *Biochemistry (Mosc)*. 2019;84(Suppl 1):S206–24.
432. O'Brien J, Wendell SG. Electrophile Modulation of Inflammation: A Two-Hit Approach. *Metabolites*. 2020;10(11):453.
433. Ursini F, Maiorino M, Forman HJ. Redox homeostasis: The Golden Mean of healthy living. *Redox Biol*. 2016;8:205-15.
434. Doorn JA, Petersen DR. Covalent modification of amino acid nucleophiles by the lipid peroxidation products 4-hydroxy-2-nonenal and 4-oxo-2-nonenal. *Chem Res Toxicol*. 2002;15(11):1445–50.
435. Mullarky E, Cantley LC. Diverting Glycolysis to Combat Oxidative Stress. In: Nakao K, Minato N, Uemoto S, editors. *Innovative Medicine: Basic Research and Development* [Internet]. Tokyo: Springer; 2015 [pristupljeno 11.02.2021.]. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500351/>
436. Radak Z, Chung HY, Koltai E, Taylor AW, Goto S. Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Res Rev*. 2008;7(1):34–42.
437. Plauth A, Geikowski A, Cichon S, Wowro SJ, Liedgens L, Rousseau M, i sur. Hormetic shifting of redox environment by pro-oxidative resveratrol protects cells against stress. *Free Radic Biol Med*. 2016;99:608–22.
438. Forman HJ, Davies KJA, Ursini F. How Do Nutritional Antioxidants Really Work: Nucleophilic Tone and Para-Hormesis Versus Free Radical Scavenging in vivo. *Free Radic Biol Med*. 2014;66:24-35.
439. Campbell JE, Drucker DJ. Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action. *Cell Metab*. 2013;17(6):819–37.
440. Andersen A, Lund A, Knop FK, Vilsbøll T. Glucagon-like peptide 1 in health and disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2018;14(7):390–403.
441. Tyurenkov IN, Bakulin DA, Kurkin DV, Volotova EV. Neuroprotective properties of incretin mimetics in brain ischemia and neurodegenerative diseases. *Problems of Endocrinology* [Internet]. 2017 [pristupljeno 02.01.2023.];63(1):58–67. Dostupno na: <https://www.probl-endojournals.ru/jour/article/view/8155>
442. Girges C, Vijiaratnam N, Athauda D, Auld G, Gandhi S, Foltynie T. The Future of Incretin-Based Approaches for Neurodegenerative Diseases in Older Adults: Which to Choose? A Review of their Potential Efficacy and Suitability. *Drugs Aging*. 2021;38(5):355–73.
443. Ferrari F, Moretti A, Villa RF. Incretin-based drugs as potential therapy for neurodegenerative diseases: current status and perspectives. *Pharmacol Ther*. 2022;239:108277.

444. Nowell J, Blunt E, Edison P. Incretin and insulin signaling as novel therapeutic targets for Alzheimer's and Parkinson's disease. *Mol Psychiatry*. 2023;28(1):217-229.
445. Grieco M, Giorgi A, Gentile MC, d'Erme M, Morano S, Maras B, i sur. Glucagon-Like Peptide-1: A Focus on Neurodegenerative Diseases. *Front Neurosci*. 2019;13:1112.
446. Tramutola A, Arena A, Cini C, Butterfield DA, Barone E. Modulation of GLP-1 signaling as a novel therapeutic approach in the treatment of Alzheimer's disease pathology. *Expert Rev Neurother*. 2017;17(1):59-75.
447. de Graaf C, Donnelly D, Wootten D, Lau J, Sexton PM, Miller LJ, i sur. Glucagon-Like Peptide-1 and Its Class B G Protein-Coupled Receptors: A Long March to Therapeutic Successes. *Pharmacol Rev*. 2016;68(4):954-1013.
448. Calsolaro V, Edison P. Novel GLP-1 (Glucagon-Like Peptide-1) Analogues and Insulin in the Treatment for Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Diseases. *CNS Drugs*. 2015;29(12):1023-39.
449. Hölscher C. Novel dual GLP-1/GIP receptor agonists show neuroprotective effects in Alzheimer's and Parkinson's disease models. *Neuropharmacology*. 2018;136(Pt B):251-9.
450. Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev*. 2007;87(4):1409-39.
451. McClean PL, Parthasarathy V, Faivre E, Hölscher C. The diabetes drug liraglutide prevents degenerative processes in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2011;31(17):6587-94.
452. McClean PL, Hölscher C. Liraglutide can reverse memory impairment, synaptic loss and reduce plaque load in aged APP/PS1 mice, a model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*. 2014;76 Pt A:57-67.
453. Hansen HH, Fabricius K, Barkholt P, Niehoff ML, Morley JE, Jelsing J, i sur. The GLP-1 Receptor Agonist Liraglutide Improves Memory Function and Increases Hippocampal CA1 Neuronal Numbers in a Senescence-Accelerated Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2015;46(4):877-88.
454. Duarte AI, Candeias E, Alves IN, Mena D, Silva DF, Machado NJ, i sur. Liraglutide Protects Against Brain Amyloid- $\beta$ 1-42 Accumulation in Female Mice with Early Alzheimer's Disease-Like Pathology by Partially Rescuing Oxidative/Nitrosative Stress and Inflammation. *Int J Mol Sci*. 2020;21(5):1746.
455. Xie Y, Zheng J, Li S, Li H, Zhou Y, Zheng W, i sur. GLP-1 improves the neuronal supportive ability of astrocytes in Alzheimer's disease by regulating mitochondrial dysfunction via the cAMP/PKA pathway. *Biochem Pharmacol*. 2021;188:114578.
456. Zheng J, Xie Y, Ren L, Qi L, Wu L, Pan X, i sur. GLP-1 improves the supportive ability of astrocytes to neurons by promoting aerobic glycolysis in Alzheimer's disease. *Mol Metab*. 2021;47:101180.

457. Paladugu L, Gharaibeh A, Kolli N, Learman C, Hall TC, Li L, i sur. Liraglutide Has Anti-Inflammatory and Anti-Amyloid Properties in Streptozotocin-Induced and 5x $FAD$  Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci*. 2021;22(2):860.
458. Chen S, Liu A ran, An F mao, Yao W bing, Gao X dong. Amelioration of neurodegenerative changes in cellular and rat models of diabetes-related Alzheimer's disease by exendin-4. *Age (Dordr)*. 2012;34(5):1211–24.
459. Zhou M, Chen S, Peng P, Gu Z, Yu J, Zhao G, i sur. Dulaglutide ameliorates STZ induced AD-like impairment of learning and memory ability by modulating hyperphosphorylation of tau and NFs through GSK3 $\beta$ . *Biochem Biophys Res Commun*. 2019;511(1):154–60.
460. Batista AF, Forny-Germano L, Clarke JR, Lyra E Silva NM, Brito-Moreira J, Boehnke SE, i sur. The diabetes drug liraglutide reverses cognitive impairment in mice and attenuates insulin receptor and synaptic pathology in a non-human primate model of Alzheimer's disease. *J Pathol*. 2018;245(1):85–100.
461. An J, Zhou Y, Zhang M, Xie Y, Ke S, Liu L, i sur. Exenatide alleviates mitochondrial dysfunction and cognitive impairment in the 5 $\times$  $FAD$  mouse model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res*. 2019;370:111932.
462. Zhang SX, Cai HY, Ma XW, Yuan L, Zhang J, Wang ZJ, i sur. GLP-1 analogue CJC-1131 prevents amyloid  $\beta$  protein-induced impairments of spatial memory and synaptic plasticity in rats. *Behav Brain Res*. 2017;326:237–43.
463. Tiessen RG, Castaigne JP, Dreyfus JF, Nemansky M, Kruizinga HH, van Vliet AA. Pharmacokinetics and tolerability of a novel long-acting glucagon-like peptide-1 analog, CJC-1131, in healthy and diabetic subjects. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2008;46(9):443–52.
464. Gejl M, Gjedde A, Egefjord L, Møller A, Hansen SB, Vang K, i sur. 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.
465. Watson KT, Wroolie TE, Tong G, Foland-Ross LC, Frangou S, Singh M, i sur. Neural correlates of liraglutide effects in persons at risk for Alzheimer's disease. *Behav Brain Res*. 2019;356:271–8.
466. Femminella GD, Frangou E, Love SB, Busza G, Holmes C, Ritchie C, i sur. Evaluating the effects of the novel GLP-1 analogue liraglutide in Alzheimer's disease: study protocol for a randomised controlled trial (ELAD study). *Trials*. 2019;20(1):191.
467. Athauda D, Foltynie T. Insulin resistance and Parkinson's disease: A new target for disease modification? *Prog Neurobiol*. 2016;145–146:98–120.
468. Dias V, Junn E, Mouradian MM. The Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis*. 2013;3(4):461-91.
469. Pajares M, I Rojo A, Manda G, Boscá L, Cuadrado A. Inflammation in Parkinson's Disease: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Cells*. 2020;9(7):1687.



470. Kim S, Moon M, Park S. Exendin-4 protects dopaminergic neurons by inhibition of microglial activation and matrix metalloproteinase-3 expression in an animal model of Parkinson's disease. *J Endocrinol.* 2009;202(3):431–9.
471. Li Y, Perry T, Kindy MS, Harvey BK, Tweedie D, Holloway HW, i sur. GLP-1 receptor stimulation preserves primary cortical and dopaminergic neurons in cellular and rodent models of stroke and Parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(4):1285-90.
472. Zhang L, Zhang L, Li L, Hölscher C. Semaglutide is Neuroprotective and Reduces  $\alpha$ -Synuclein Levels in the Chronic MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis.* 2019;9(1):157–71.
473. Liu W, Jalewa J, Sharma M, Li G, Li L, Hölscher C. Neuroprotective effects of lixisenatide and liraglutide in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Neuroscience.* 2015;303:42–50.
474. Bertilsson G, Patrone C, Zachrisson O, Andersson A, Dannaeus K, Heidrich J, i sur. Peptide hormone exendin-4 stimulates subventricular zone neurogenesis in the adult rodent brain and induces recovery in an animal model of Parkinson's disease. *J Neurosci Res.* 2008;86(2):326–38.
475. Harkavyi A, Abuirmeileh A, Lever R, Kingsbury AE, Biggs CS, Whitton PS. Glucagon-like peptide 1 receptor stimulation reverses key deficits in distinct rodent models of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation.* 2008;5:19.
476. Aviles-Olmos I, Dickson J, Kefalopoulou Z, Djamshidian A, Ell P, Soderlund T, i sur. Exenatide and the treatment of patients with Parkinson's disease. *J Clin Invest.* 2013;123(6):2730-6.
477. Aviles-Olmos I, Dickson J, Kefalopoulou Z, Djamshidian A, Kahan J, Ell P, i sur. Motor and cognitive advantages persist 12 months after exenatide exposure in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis.* 2014;4(3):337–44.
478. McFarthing K, Larson D, Simuni T. Clinical Trial Highlights – GLP-1 agonists. *J Parkinsons Dis.* 2020;10(2):355-368.
479. Duffy AM, Hölscher C. The incretin analogue D-Ala2GIP reduces plaque load, astrogliosis and oxidative stress in an APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 2013;228:294–300.
480. Li Y, Liu W, Li L, Hölscher C. D-Ala2-GIP-glu-PAL is neuroprotective in a chronic Parkinson's disease mouse model and increases BDNF expression while reducing neuroinflammation and lipid peroxidation. *Eur J Pharmacol.* 2017;797:162–72.
481. Maskery M, Goulding EM, Gengler S, Melchiorson JU, Rosenkilde MM, Hölscher C. The Dual GLP-1/GIP Receptor Agonist DA4-JC Shows Superior Protective Properties Compared to the GLP-1 Analogue Liraglutide in the APP/PS1 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen.* 2020;35:1533317520953041.
482. Cao Y, Hölscher C, Hu MM, Wang T, Zhao F, Bai Y, i sur. DA5-CH, a novel GLP-1/GIP dual agonist, effectively ameliorates the cognitive impairments and pathology in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol.* 2018;827:215–26.

483. Panagaki T, Gengler S, Hölscher C. The Novel DA-CH3 Dual Incretin Restores Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy Impairments to Attenuate Alzheimer-Like Pathology and Cognitive Decrements in the APPSWE/PS1 $\Delta$ E9 Mouse Model. *J Alzheimers Dis.* 2018;66(1):195–218.
484. Feng P, Zhang X, Li D, Ji C, Yuan Z, Wang R, i sur. Two novel dual GLP-1/GIP receptor agonists are neuroprotective in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology.* 2018;133:385–94.
485. Lv M, Xue G, Cheng H, Meng P, Lian X, Hölscher C, i sur. The GLP-1/GIP dual-receptor agonist DA5-CH inhibits the NF- $\kappa$ B inflammatory pathway in the MPTP mouse model of Parkinson's disease more effectively than the GLP-1 single-receptor agonist NLY01. *Brain Behav.* 2021;11(8):e2231.
486. Zhang L, Zhang L, Li Y, Li L, Melchiorson JU, Rosenkilde M, i sur. The Novel Dual GLP-1/GIP Receptor Agonist DA-CH5 Is Superior to Single GLP-1 Receptor Agonists in the MPTP Model of Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis.* 2020;10(2):523–42.
487. Yuan Z, Li D, Feng P, Xue G, Ji C, Li G, i sur. A novel GLP-1/GIP dual agonist is more effective than liraglutide in reducing inflammation and enhancing GDNF release in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Eur J Pharmacol.* 2017;812:82–90.
488. Glotfelty EJ, Olson L, Karlsson TE, Li Y, Greig NH. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1)-based receptor agonists as a treatment for Parkinson's disease. *Expert Opin Investig Drugs.* 2020;29(6):595–602.
489. Li Y, Glotfelty EJ, Namdar I, Tweedie D, Olson L, Hoffer BJ, i sur. Neurotrophic and neuroprotective effects of a monomeric GLP-1/GIP/Gcg receptor triagonist in cellular and rodent models of mild traumatic brain injury. *Exp Neurol.* 2020;324:113113.
490. Pasteur L. Note sur le sucre de lait. *Comptes rendus l'Académie des Sci.* 1856;42:347–51.
491. Coelho AI, Berry GT, Rubio-Gozalbo ME. Galactose metabolism and health. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2015;18(4):422–7.
492. Urashima T, Messer M, Oftedal OT. Comparative Biochemistry and Evolution of Milk Oligosaccharides of Monotremes, Marsupials, and Eutherians. In: Pontarotti P, editor. *Evolutionary Biology: Genome Evolution, Speciation, Coevolution and Origin of Life* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2014 [pristupljeno 11.02.2021.]; 3–33. Dostupno na: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-07623-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-07623-2_1)
493. Sasaoka N, Imamura H, Kakizuka A. A Trace Amount of Galactose, a Major Component of Milk Sugar, Allows Maturation of Glycoproteins during Sugar Starvation. *iScience.* 2018;10:211–21.
494. Schwartz NB, Domowicz MS. Proteoglycans in brain development and pathogenesis. *FEBS Lett.* 2018;592(23):3791–805.
495. K.Yu R, Schengrund CL. *Glycobiology of the Nervous System.* Vol. 9. New York: Springer International Publishing; 2014.

496. Sosicka P, Ng BG, Freeze HH. Therapeutic Monosaccharides: Looking Back, Moving Forward. *Biochemistry*. 2020;59(34):3064-3077.
497. Salkovic-Petrisic M, Osmanovic-Barilar J, Knezovic A, Hoyer S, Mosetter K, Reutter W. Long-term oral galactose treatment prevents cognitive deficits in male Wistar rats treated intracerebroventricularly with streptozotocin. *Neuropharmacology*. 2014;77:68–80.
498. Roser M, Josic D, Kontou M, Mosetter K, Maurer P, Reutter W. Metabolism of galactose in the brain and liver of rats and its conversion into glutamate and other amino acids. *J Neural Transm (Vienna)*. 2009;116(2):131-9.
499. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 2000;408(6809):239-47.
500. Lai K, Elsas L, Wierenga K. Galactose Toxicity in Animals. *IUBMB Life*. 2009;61(11):1063-74.
501. OMIM Entry - # 230200 - GALACTOSEMIA II; GALAC2. [Internet]. Dostupno na: <https://www.omim.org/entry/230200>.
502. OMIM Entry - # 230400 - GALACTOSEMIA I; GALAC1. [Internet]. Dostupno na: <https://www.omim.org/entry/230400>.
503. Lai K, Langley SD, Khwaja FW, Schmitt EW, Elsas LJ. GALT deficiency causes UDP-hexose deficit in human galactosemic cells. *Glycobiology*. 2003;13(4):285–94.
504. Knerr I, Coss KP, Kratzsch J, Crushell E, Clark A, Doran P, i sur. Effects of temporary low-dose galactose supplements in children aged 5–12 y with classical galactosemia: a pilot study. *Pediatr Res*. 2015;78(3):272-9.
505. Ho SC, Liu JH, Wu RY. Establishment of the mimetic aging effect in mice caused by D-galactose. *Biogerontology*. 2003;4(1):15-8. doi:
506. Azman KF, Zakaria R. D-Galactose-induced accelerated aging model: an overview. *Biogerontology*. 2019;20(6):763–82.
507. Shwe T, Pratchayasakul W, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. Role of D-galactose-induced brain aging and its potential used for therapeutic interventions. *Exp Gerontol*. 2018;101:13-36.
508. Kubo E, Urakami T, Fatma N, Akagi Y, Singh DP. Polyol pathway-dependent osmotic and oxidative stresses in aldose reductase-mediated apoptosis in human lens epithelial cells: role of AOP2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;314(4):1050–6.
509. Dvornik E, Simard-Duquesne N, Krami M, Sestanj K, Gabbay KH, Kinoshita JH, i sur. Polyol accumulation in galactosemic and diabetic rats: control by an aldose reductase inhibitor. *Science*. 1973;182(4117):1146–8.
510. Cui X, Wang L, Zuo P, Han Z, Fang Z, Li W, i sur. D-galactose-caused life shortening in *Drosophila melanogaster* and *Musca domestica* is associated with oxidative stress. *Biogerontology*. 2004;5(5):317–25.

511. Wu D mei, Lu J, Zheng Y lin, Zhou Z, Shan Q, Ma D fu. Purple sweet potato color repairs d-galactose-induced spatial learning and memory impairment by regulating the expression of synaptic proteins. *Neurobiol Learn Mem.* 2008;90(1):19–27.
512. Liu H, Zhang X, Xiao J, Song M, Cao Y, Xiao H, i sur. Astaxanthin attenuates D-galactose-induced brain aging in rats by ameliorating oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and regulating metabolic markers. *Food Funct.* 2020;11(5):4103-4113.
513. Oyebode OT, Giwa OD, Olorunsogo OO. Comparative effects of galactose-induced aging on mitochondrial permeability transition in rat liver and testis. *Toxicol Mech Methods.* 2020;30(5):388–96.
514. Mirshafa A, Mohammadi H, Shokrzadeh M, Mohammadi E, Talebpour Amiri F, Shaki F. Tropisetron protects against brain aging via attenuating oxidative stress, apoptosis and inflammation: The role of SIRT1 signaling. *Life Sci.* 2020;248:117452.
515. Guo B, Guo Q, Wang Z, Shao JB, Liu K, Du ZD, i sur. D-Galactose-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the cochlear basilar membrane: an in vitro aging model. *Biogerontology.* 2020;21(3):311–23.
516. Tavanai E, Mohammadkhani G, Farahani S, Jalaie S. Protective Effects of Silymarin Against Age-Related Hearing Loss in an Aging Rat Model. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2019;71(Suppl 2):1248–57.
517. Hadzi-Petrushev N, Stojkovski V, Mitrov D, Mladenov M. D-galactose induced changes in enzymatic antioxidant status in rats of different ages. *Physiol Res.* 2015;64(1):61–70.
518. Xiao P, Huang H, Li X, Chen J, Duan JA. Characterization, evaluation of nutritional parameters of Radix isatidis protein and its antioxidant activity in D-galactose induced ageing mice. *BMC Complement Altern Med.* 2019;19(1):297.
519. Liu X, Wu C, Han D, Liu J, Liu H, Jiang Z. Partially Hydrolyzed Guar Gum Attenuates d-Galactose-Induced Oxidative Stress and Restores Gut Microbiota in Rats. *Int J Mol Sci.* 2019;20(19).
520. Chen P, Chen F, Zhou B hong. Leonurine ameliorates D-galactose-induced aging in mice through activation of the Nrf2 signalling pathway. *Aging (Albany NY).* 2019;11(18):7339-7356.
521. Khan M, Ullah R, Rehman SU, Shah SA, Saeed K, Muhammad T, i sur. 17 $\beta$ -Estradiol Modulates SIRT1 and Halts Oxidative Stress-Mediated Cognitive Impairment in a Male Aging Mouse Model. *Cells.* 2019;8(8):928.
522. He S, Zhang Z, Sun H, Zhu Y, Cao X, Ye Y, i sur. Potential effects of rapeseed peptide Maillard reaction products on aging-related disorder attenuation and gut microbiota modulation in d-galactose induced aging mice. *Food Funct.* 2019;10(7):4291–303.
523. Liu CM, Ma JQ, Lou Y. Chronic administration of troxerutin protects mouse kidney against D-galactose-induced oxidative DNA damage. *Food Chem Toxicol.* 2010;48(10):2809–17.

524. Homolak J, Kodvanj I, Toljan K, Babic Perhoc A, Virag D, Osmanovic Barilar J, i sur. Separating science from science fiction: A non-existent enzyme is a primary driver of pathophysiological processes in galactose-induced rodent models of aging. ResearchGate [Internet] 2020 [pristupljeno 03.01.2021.] Dostupno na: [https://www.researchgate.net/publication/344322017\\_Separating\\_science\\_from\\_science\\_fiction\\_A\\_non-existent\\_enzyme\\_is\\_a\\_primary\\_driver\\_of\\_pathophysiological\\_processes\\_in\\_galactose-induced\\_rodent\\_models\\_of\\_aging](https://www.researchgate.net/publication/344322017_Separating_science_from_science_fiction_A_non-existent_enzyme_is_a_primary_driver_of_pathophysiological_processes_in_galactose-induced_rodent_models_of_aging)
525. Lu J, Wu D mei, Zheng Y lin, Hu B, Zhang Z feng, Ye Q, i sur. Ursolic acid attenuates D-galactose-induced inflammatory response in mouse prefrontal cortex through inhibiting AGEs/RAGE/NF- $\kappa$ B pathway activation. *Cereb Cortex*. 2010;20(11):2540–8.
526. Rehman SU, Shah SA, Ali T, Chung JI, Kim MO. Anthocyanins Reversed D-Galactose-Induced Oxidative Stress and Neuroinflammation Mediated Cognitive Impairment in Adult Rats. *Mol Neurobiol*. 2017;54(1):255–71.
527. Budni J, Pacheco R, da Silva S, Garcez ML, Mina F, Bellettini-Santos T, i sur. Oral administration of d-galactose induces cognitive impairments and oxidative damage in rats. *Behav Brain Res*. 2016;302:35–43.
528. Chogtu B, Arivazhahan A, Kunder SK, Tilak A, Sori R, Tripathy A. Evaluation of Acute and Chronic Effects of D-Galactose on Memory and Learning in Wistar Rats. *Clin Psychopharmacol Neurosci*. 2018;16(2):153-160.
529. Zhu T, Wang Z, He J, Zhang X, Zhu C, Zhang S, i sur. D-galactose protects the intestine from ionizing radiation-induced injury by altering the gut microbiome. *J Radiat Res*. 2022;rrac059.
530. Homolak J, Perhoc AB, Knezovic A, Osmanovic Barilar J, Salkovic-Petrisic M. Additional methodological considerations regarding optimization of the dose of intracerebroventricular streptozotocin A response to: “Optimization of intracerebroventricular streptozotocin dose for the induction of neuroinflammation and memory impairments in rats” by Ghosh i sur., *Metab Brain Dis* 2020 July 21. *Metab Brain Dis*. 2021;36(1):97–102.
531. Noble EP, Wurtman RJ, Axelrod J. A simple and rapid method for injecting H3-norepinephrine into the lateral ventricle of the rat brain. *Life Sci*. 1967;6(3):281–91.
532. Homolak J, Virag D, Kodvanj I, Matak I, Babic Perhoc A, Knezovic A, i sur. A hacked kitchen scale-based system for quantification of grip strength in rodents. *Comput Biol Med*. 2022;144:105391.
533. Homolak J, Joja M, Grabaric G, Schiatti E, Virag D, Perhoc AB, i sur. The absence of gastrointestinal redox dyshomeostasis in the brain-first rat model of Parkinson’s disease induced by bilateral intrastriatal 6-hydroxydopamine. *bioRxiv* [Internet]. 2022 [pristupljeno 06.09.2022.];2022.08.22.504759. Dostupno na: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.08.22.504759v1>
534. Homolak J, Babic Perhoc A, Knezovic A, Osmanovic Barilar J, Koc F, Stanton C, i sur. Disbalance of the duodenal epithelial cell turnover and apoptosis accompanies insensitivity

- of intestinal redox homeostasis to inhibition of the brain glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptors in a rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Neuroendocrinology*. 2022;112(8):744-762.
535. Homolak J, Babic Perhoc A, Knezovic A, Osmanovic Barilar J, Salkovic-Petrisic M. Failure of the Brain Glucagon-Like Peptide-1-Mediated Control of Intestinal Redox Homeostasis in a Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(7):1118.
536. Osmanovic Barilar J, Knezovic A, Homolak J, Babic Perhoc A, Salkovic-Petrisic M. Divergent Effect of Central Incretin Receptors Inhibition in a Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci*. 2022;23(1):548.
537. Knezovic A, Osmanovic Barilar J, Babic A, Bagaric R, Farkas V, Riederer P, i sur. Glucagon-like peptide-1 mediates effects of oral galactose in streptozotocin-induced rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*. 2018;135:48–62.
538. Hamm RJ, Pike BR, O'Dell DM, Lyeth BG, Jenkins LW. The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 1994;11(2):187–96.
539. Rustay NR, Wahlsten D, Crabbe JC. Influence of task parameters on rotarod performance and sensitivity to ethanol in mice. *Behav Brain Res*. 2003;141(2):237–49.
540. Rozas G, Guerra MJ, Labandeira-García JL. An automated rotarod method for quantitative drug-free evaluation of overall motor deficits in rat models of parkinsonism. *Brain Res Brain Res Protoc*. 1997;2(1):75–84.
541. Matsumoto J, Uehara T, Urakawa S, Takamura Y, Sumiyoshi T, Suzuki M, i sur. 3D video analysis of the novel object recognition test in rats. *Behav Brain Res*. 2014;272:16–24.
542. Lueptow LM. Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. *J Vis Exp*. 2017;(126):55718.
543. Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process*. 2012;13(2):93-110.
544. Denninger JK, Smith BM, Kirby ED. Novel Object Recognition and Object Location Behavioral Testing in Mice on a Budget. *J Vis Exp*. 2018;(141).
545. Rajagopal L, Massey BW, Huang M, Oyamada Y, Meltzer HY. The novel object recognition test in rodents in relation to cognitive impairment in schizophrenia. *Curr Pharm Des*. 2014;20(31):5104–14.
546. Mathiasen JR, DiCamillo A. Novel object recognition in the rat: a facile assay for cognitive function. *Curr Protoc Pharmacol*. 2010;Chapter 5:Unit 5.59.
547. Mathis A, Mamidanna P, Cury KM, Abe T, Murthy VN, Mathis MW, i sur. DeepLabCut: markerless pose estimation of user-defined body parts with deep learning. *Nat Neurosci*. 2018;21(9):1281–9.

548. Hackenberg TD, Vanderhooft L, Huang J, Wagar M, Alexander J, Tan L. Social preference in rats. *J Exp Anal Behav*. 2021;115(3):634–49.
549. Netser S, Haskal S, Magalnik H, Bizer A, Wagner S. A System for Tracking the Dynamics of Social Preference Behavior in Small Rodents. *J Vis Exp*. 2019;(153).
550. Rein B, Ma K, Yan Z. A standardized social preference protocol for measuring social deficits in mouse models of autism. *Nat Protoc*. 2020;15(10):3464–77.
551. Kim DG, Gonzales EL, Kim S, Kim Y, Adil KJ, Jeon SJ, i sur. Social Interaction Test in Home Cage as a Novel and Ethological Measure of Social Behavior in Mice. *Exp Neurobiol*. 2019;28(2):247–60.
552. Winslow JT. Mouse social recognition and preference. *Curr Protoc Neurosci*. 2003 May;Chapter 8:Unit 8.16.
553. Homolak J, Busscher JD, Lucio MZ, Joja M, Virag D, Perhoc AB, i sur. Altered secretion, constitution, and functional properties of the gastrointestinal mucus in a rat model of sporadic Alzheimer’s disease. *bioRxiv [Internet]*. 2022 [pristupljeno 06.10.2022.];2022.10.03.510623. Dostupno na: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.10.03.510623v1>
554. Homolak J, Babic Perhoc A, Knezovic A, Osmanovic Barilar J, Virag D, Joja M, i sur. The Effect of Acute Oral Galactose Administration on the Redox System of the Rat Small Intestine. *Antioxidants (Basel)*. 2021;11(1):37.
555. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265–75.
556. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248–54.
557. Kraus D, Yang Q, Kahn BB. Lipid Extraction from Mouse Feces. *Bio Protoc*. 2015;5(1):e1375.
558. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957;226(1):497–509.
559. Homolak J, Joja M, Markovic P, Salkovic-Petrisic M. Sudan black lipid blot – a rapid and simple method for quantification of lipids in biological samples. *bioRxiv [Internet]*. 2022 [pristupljeno 31.08.2022.];2022.07.27.501748. Dostupno na: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.07.27.501748v1>
560. Trinder P. Determination of blood glucose using 4-amino phenazone as oxygen acceptor. *J Clin Pathol*. 1969;22(2):246.
561. Homolak J, Babic Perhoc A, Knezovic A, Kodvanj I, Virag D, Barilar JO, i sur. Is Galactose a Hormetic sugar? An Exploratory Study of the Rat Hippocampal Redox Regulatory Network. *Mol Nutr Food Res*. 2021;e2100400.

562. Virag D, Homolak J, Kodvanj I, Babic Perhoc A, Knezovic A, Osmanovic Barilar J, i sur. Repurposing a digital kitchen scale for neuroscience research: a complete hardware and software cookbook for PASTA. *Sci Rep.* 2021;11(1):2963.
563. Homolak J. Proposal of a simple open-source quantitative tribometric assay and its implementation for the assessment of the effects of redox-related alterations on the lubrication capacity of a commercial water-based lubricant gel [Internet]. *bioRxiv*; 2022 [pristupljeno 28.08.2022.]; 2022.07.27.501731. Dostupno na: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.07.27.501731v3>
564. Byvaltsev VA, Bardonova LA, Onaka NR, Polkin RA, Ochkal SV, Shepelev VV, i sur. Acridine Orange: A Review of Novel Applications for Surgical Cancer Imaging and Therapy. *Front Oncol.* 2019;9:925.
565. Kronvall G, Myhre E. Differential staining of bacteria in clinical specimens using acridine orange buffered at low pH. *Acta Pathol Microbiol Scand B.* 1977;85(4):249–54.
566. Lauer BA, Reller LB, Mirrett S. Comparison of acridine orange and Gram stains for detection of microorganisms in cerebrospinal fluid and other clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 1981;14(2):201-5.
567. Homolak J, Kodvanj I, Perhoc AB, Virag D, Knezovic A, Barilar JO, i sur. Nitrocellulose redox permanganometry: a simple method for reductive capacity assessment. *MethodsX.* 2021;9:101611.
568. Zhou Y, Zhang M, Liu H. Total Antioxidant Capacity of Serum Determined Using the Potassium Permanganate Agar Method Based on Serum Diffusion in Agar. *Bioinorg Chem Appl.* 2015;2015:406071.
569. Cao T, He M, Bai T, Liu H. Establishment of a Method for Measuring Antioxidant Capacity in Urine, Based on Oxidation Reduction Potential and Redox Couple I<sub>2</sub>/KI. *Bioinorg Chem Appl.* 2016;2016:7054049.
570. Homolak J. The effect of a color tattoo on the local skin redox regulatory network: an N-of-1 study. *Free Radic Res.* 2021; 55(3):221-229
571. Ilyasov IR, Beloborodov VL, Selivanova IA, Terekhov RP. ABTS/PP Decolorization Assay of Antioxidant Capacity Reaction Pathways. *Int J Mol Sci.* 2020;21(3):1131.
572. Katalinic V, Modun D, Music I, Boban M. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2005;140(1):47–52.
573. Hrabárová E, Valachová K, Rapta P, Soltés L. An alternative standard for Trolox-equivalent antioxidant-capacity estimation based on thiol antioxidants. Comparative 2,2'-azinobis[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid] decolorization and rotational viscometry study regarding hyaluronan degradation. *Chem Biodivers.* 2010;7(9):2191–200.
574. Hadwan MH. Simple spectrophotometric assay for measuring catalase activity in biological tissues. *BMC Biochem.* 2018;19(1):7.



575. Homolak J. In vitro analysis of catalase and superoxide dismutase mimetic properties of blue tattoo ink. *Free Radic Res.* 2022; 56(5-6):343-357.
576. Homolak J, Perhoc AB, Joja M, Kodvanj I, Toljan K, Virag D. Non-alcoholic components of Pelinkovac, a Croatian wormwood-based strong liquor, counteract the inhibitory effect of high ethanol concentration on catalase in vitro. *bioRxiv* [Internet]. 2022 [pristupljeno 12.01.2022.];2022.01.07.475357. Dostupno na: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.01.07.475357v1>
577. Ma X, Deng D, Chen W. Inhibitors and Activators of SOD, GSH-Px, and CAT [Internet]. *Enzyme Inhibitors and Activators*. IntechOpen; 2017 [pristupljeno 26.09.2021.]. Dostupno na: <https://www.intechopen.com/chapters/52877>
578. Feissner R, Xiang Y, Kranz RG. Chemiluminescent-based methods to detect subpicomole levels of c-type cytochromes. *Anal Biochem.* 2003;315(1):90–4.
579. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem.* 1974;47(3):469–74.
580. Li X. Improved Pyrogallol Autoxidation Method: A Reliable and Cheap Superoxide-Scavenging Assay Suitable for All Antioxidants. *J Agric Food Chem.* 2012;60(25):6418–24.
581. Iqbal J, Whitney P. Use of cyanide and diethyldithiocarbamate in the assay of superoxide dismutases. *Free Radic Biol Med.* 1991;10(1):69–77.
582. Okado-Matsumoto A, Fridovich I. Subcellular Distribution of Superoxide Dismutases (SOD) in Rat Liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem.* 2001;276(42):38388–93.
583. Sun Y, Ip P, Chakrabarty A. Simple Elimination of Background Fluorescence in Formalin-Fixed Human Brain Tissue for Immunofluorescence Microscopy. *J Vis Exp.* 2017;(127).
584. Duong H, Han M. A multispectral LED array for the reduction of background autofluorescence in brain tissue. *J Neurosci Methods.* 2013;220(1):46–54.
585. Oliveira VC, Carrara RCV, Simoes DLC, Saggiaro FP, Carlotti CG, Covas DT, i sur. Sudan Black B treatment reduces autofluorescence and improves resolution of in situ hybridization specific fluorescent signals of brain sections. *Histol Histopathol.* 2010;25(8):1017–24.
586. Sun Y, Yu H, Zheng D, Cao Q, Wang Y, Harris D, i sur. Sudan black B reduces autofluorescence in murine renal tissue. *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135(10):1335–42.
587. Han S, Cui Y, Helbing DL. Inactivation of Horseradish Peroxidase by Acid for Sequential Chemiluminescent Western Blot. *Biotechnol J.* 2020;15(3):e1900397.
588. Yu Z, Morrison M. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *Biotechniques.* 2004;36(5):808–12.

589. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(1):e1.
590. Lynch KM, Strain CR, Johnson C, Patangia D, Stanton C, Koc F, et al. Extraction and characterisation of arabinoxylan from brewers spent grain and investigation of microbiome modulation potential. *Eur J Nutr.* 2021;60(8):4393–411.
591. Moniello G, Ariano A, Panettieri V, Tulli F, Olivotto I, Messina M, et al. Intestinal Morphometry, Enzymatic and Microbial Activity in Laying Hens Fed Different Levels of a *Hermetia illucens* Larvae Meal and Toxic Elements Content of the Insect Meal and Diets. *Animals (Basel).* 2019;9(3):86.
592. Khan J, Islam MN. Morphology of the Intestinal Barrier in Different Physiological and Pathological Conditions. *Histopathology - Reviews and Recent Advances* [Internet]. 2012 [pristupljeno 02.04.2021.]; Dostupno na: <https://www.intechopen.com/books/histopathology-reviews-and-recent-advances/morphology-of-the-intestinal-barrier-in-different-physiological-and-pathological-conditions>
593. Holt PR, Pascal RR, Kotler DP. Effect of aging upon small intestinal structure in the Fischer rat. *J Gerontol.* 1984;39(6):642–7.
594. Kapur JN, Sahoo PK, Wong AKC. A new method for gray-level picture thresholding using the entropy of the histogram. *Computer Vision, Graphics, and Image Processing* [Internet]. 1985 [pristupljeno 30.08.2022.];29(3):273–85. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0734189X85901252>
595. Arganda-Carreras I, Kaynig V, Rueden C, Eliceiri KW, Schindelin J, Cardona A, et al. Trainable Weka Segmentation: a machine learning tool for microscopy pixel classification. *Bioinformatics.* 2017;33(15):2424–6.
596. Callahan BJ, McMurdie PJ, Holmes SP. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME J.* 2017;11(12):2639–43.
597. Murali A, Bhargava A, Wright ES. IDTAXA: a novel approach for accurate taxonomic classification of microbiome sequences. *Microbiome.* 2018;6(1):140.
598. Chong J, Liu P, Zhou G, Xia J. Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data. *Nat Protoc.* 2020;15(3):799–821.
599. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12):550.
600. Percie du Sert N, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, et al. Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. *PLoS Biol.* 2020;18(7):e3000411.
601. Blastland M, Freeman ALJ, Linden S van der, Marteau TM, Spiegelhalter D. Five rules for evidence communication. *Nature.* 2020;587(7834):362–364.
602. Altman DG. Why we need confidence intervals. *World J Surg.* 2005;29(5):554–6.

603. Trkulja V, Hrabac P. Confidence intervals: what are they to us, medical doctors? *Croat Med J.* 2019;60(4):375-382.
604. Cichoń M. Reporting statistical methods and outcome of statistical analyses in research articles. *Pharmacol Rep.* 2020;72(3):481-485.
605. Greenland S, Senn SJ, Rothman KJ, Carlin JB, Poole C, Goodman SN, et al. Statistical tests, P values, confidence intervals, and power: a guide to misinterpretations. *Eur J Epidemiol.* 2016;31(4):337-50.
606. Lee DK. Data transformation: a focus on the interpretation. *Korean J Anesthesiol.* 2020;73(6):503-508.
607. Liu Q, Wang L. t-Test and ANOVA for data with ceiling and/or floor effects. *Behav Res Methods.* 2021;53(1):264-277.
608. Armstrong RA. When to use the Bonferroni correction. *Ophthalmic Physiol Opt.* 2014;34(5):502-8.
609. Brown BW, Russell K. Methods of correcting for multiple testing: operating characteristics. *Stat Med.* 1997;16(22):2511-28.
610. Neutra MR, Phillips TL, Phillips TE. Regulation of intestinal goblet cells in situ, in mucosal explants and in the isolated epithelium. *Ciba Found Symp.* 1984;109:20-39.
611. Sharma A, Kwak JG, Kolewe KW, Schiffman JD, Forbes NS, Lee J. In Vitro Reconstitution of an Intestinal Mucus Layer Shows That Cations and pH Control the Pore Structure That Regulates Its Permeability and Barrier Function. *ACS Appl Bio Mater.* 2020;3(5):2897-2909.
612. Salkovic-Petrisic M. Oral Galactose Provides a Different Approach to Incretin-Based Therapy of Alzheimer's Disease. *J Neurol Neuromed [Internet].* 2018 [pristupljeno 23.02.2021.];3(4):101-7. Dostupno na: <http://www.jneurology.com/articles/oral-galactose-provides-a-different-approach-to-incretinbased-therapy-of-alzheimers-disease.html>
613. Johnson WM, Wilson-Delfosse AL, Mielal JJ. Dysregulation of Glutathione Homeostasis in Neurodegenerative Diseases. *Nutrients.* 2012;4(10):1399-440.
614. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. *J Nutr.* 2004;134(3):489-92.
615. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:360438.
616. Gao YJ, Ji RR. c-Fos and pERK, which is a better marker for neuronal activation and central sensitization after noxious stimulation and tissue injury? *Open Pain J.* 2009;2:11-7.

617. Corradi L, Zaupa M, Sawamiphak S, Filosa A. Using pERK immunostaining to quantify neuronal activity induced by stress in zebrafish larvae. *STAR Protoc.* 2022;3(4):101731.
618. Kaelberer MM, Buchanan KL, Klein ME, Barth BB, Montoya MM, Shen X, i sur. A gut-brain neural circuit for nutrient sensory transduction. *Science.* 2018;361(6408):eaat5236.
619. Cabou C, Burcelin R. GLP-1, the Gut-Brain, and Brain-Periphery Axes. *Rev Diabet Stud.* 2011;8(3):418-31.
620. Kim DY, Jung DH, Song EJ, Jang AR, Park JY, Ahn JH, i sur. D-galactose Intake Alleviates Atopic Dermatitis in Mice by Modulating Intestinal Microbiota. *Front Nutr.* 2022;9:895837.
621. Pellegrini C, Antonioli L, Colucci R, Blandizzi C, Fornai M. Interplay among gut microbiota, intestinal mucosal barrier and enteric neuro-immune system: a common path to neurodegenerative diseases? *Acta Neuropathol.* 2018;136(3):345–61.
622. Rockenstein E, Mallory M, Mante M, Sisk A, Masliaha E. Early formation of mature amyloid-beta protein deposits in a mutant APP transgenic model depends on levels of A $\beta$ (1-42). *J Neurosci Res.* 2001;66(4):573–82.
623. Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, i sur. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(24):13287-92.
624. Van Vickle GD, Esh CL, Kalback WM, Patton RL, Luehrs DC, Kokjohn TA, i sur. TgCRND8 amyloid precursor protein transgenic mice exhibit an altered gamma-secretase processing and an aggressive, additive amyloid pathology subject to immunotherapeutic modulation. *Biochemistry.* 2007;46(36):10317–27.
625. Chen Y, Fang L, Chen S, Zhou H, Fan Y, Lin L, i sur. Gut Microbiome Alterations Precede Cerebral Amyloidosis and Microglial Pathology in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Biomed Res Int.* 2020;2020:8456596.
626. Souza LC, Jesse CR, Antunes MS, Ruff JR, de Oliveira Espinosa D, Gomes NS, i sur. Indoleamine-2,3-dioxygenase mediates neurobehavioral alterations induced by an intracerebroventricular injection of amyloid- $\beta$ 1-42 peptide in mice. *Brain Behav Immun.* 2016;56:363–77.
627. Jin S, Wang X, Xiang X, Wu Y, Hu J, Li Y, i sur. Inhibition of GPR17 with cangrelor improves cognitive impairment and synaptic deficits induced by A $\beta$ 1-42 through Nrf2/HO-1 and NF- $\kappa$ B signaling pathway in mice. *Int Immunopharmacol.* 2021;101(Pt B):108335.
628. Qian XH, Liu XL, Chen G, Chen S di, Tang HD. Injection of amyloid- $\beta$  to lateral ventricle induces gut microbiota dysbiosis in association with inhibition of cholinergic anti-inflammatory pathways in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation.* 2022;19(1):236.
629. Mikami Y, Tsunoda J, Kiyohara H, Taniki N, Teratani T, Kanai T. Vagus nerve-mediated intestinal immune regulation: therapeutic implications of inflammatory bowel diseases. *Int Immunol.* 2022;34(2):97–106.

630. Xu M, Mo X, Huang H, Chen X, Liu H, Peng Z, i sur. Yeast  $\beta$ -glucan alleviates cognitive deficit by regulating gut microbiota and metabolites in A $\beta$ 1-42-induced AD-like mice. *Int J Biol Macromol*. 2020;161:258–70.
631. Xu Q, Wen L, Wei G, Zhao X, Liu Y, Xiong W, i sur. Marked Response of Rat Ileal and Colonic Microbiota After the Establishment of Alzheimer's Disease Model With Bilateral Intraventricular Injection of A $\beta$  (1-42). *Front Microbiol*. 2022;13:819523.
632. Park S, Kang S, Sol Kim D. Folate and vitamin B-12 deficiencies additively impair memory function and disturb the gut microbiota in amyloid- $\beta$  infused rats. *Int J Vitam Nutr Res*. 2022;92(3-4):169-181.
633. Xu M, Huang H, Mo X, Zhu Y, Chen X, Li X, i sur. Quercetin-3-O-Glucuronide Alleviates Cognitive Deficit and Toxicity in A $\beta$ 1-42-Induced AD-Like Mice and SH-SY5Y Cells. *Mol Nutr Food Res*. 2021;65(6):e2000660.
634. Santos RR, Awati A, Hil PJR van den, Tersteeg-Zijderveld MHG, Koolmees PA, Fink-Gremmels J. Quantitative histo-morphometric analysis of heat-stress-related damage in the small intestines of broiler chickens. *Avian Pathol*. 2015;44(1):19-22.
635. Wang H, Li S, Fang S, Yang X, Feng J. Betaine Improves Intestinal Functions by Enhancing Digestive Enzymes, Ameliorating Intestinal Morphology, and Enriching Intestinal Microbiota in High-salt stressed Rats. *Nutrients*. 2018;10(7).
636. Tang Q, Tang J, Ren X, Li C. Glyphosate exposure induces inflammatory responses in the small intestine and alters gut microbial composition in rats. *Environ Pollut*. 2020;261:114129.
637. Moore R, Carlson S, Madara JL. Villus contraction aids repair of intestinal epithelium after injury. *Am J Physiol*. 1989;257(2 Pt 1):G274-283.
638. Williams JM, Duckworth CA, Burkitt MD, Watson AJM, Campbell BJ, Pritchard DM. Epithelial Cell Shedding and Barrier Function. *Vet Pathol*. 2015;52(3):445-55.
639. Stojanović O, Altirriba J, Rigo D, Spiljar M, Evrard E, Roska B, i sur. Dietary excess regulates absorption and surface of gut epithelium through intestinal PPAR $\alpha$ . *Nat Commun*. 2021;12(1):7031.
640. Patankar JV, Becker C. Cell death in the gut epithelium and implications for chronic inflammation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020;17(9):543-556.
641. Noda T, Iwakiri R, Fujimoto K, Yoshida T, Utsumi H, Sakata H, i sur. Suppression of apoptosis is responsible for increased thickness of intestinal mucosa in streptozotocin-induced diabetic rats. *Metabolism*. 2001;50(3):259–64.
642. Khansari N, Shakiba Y, Mahmoudi M. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*. 2009;3(1):73–80.
643. Hussain T, Tan B, Yin Y, F B, Mc T, N R. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:7432797.

644. Lugin J, Rosenblatt-Velin N, Parapanov R, Liaudet L. The role of oxidative stress during inflammatory processes. *Biol Chem.* 2014;395(2):203–30.
645. Herath M, Hosie S, Bornstein JC, Franks AE, Hill-Yardin EL. The Role of the Gastrointestinal Mucus System in Intestinal Homeostasis: Implications for Neurological Disorders. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:248.
646. Brenna O, Qvigstad G, Brenna E, Waldum HL. Cytotoxicity of streptozotocin on neuroendocrine cells of the pancreas and the gut. *Dig Dis Sci.* 2003;48(5):906–10.
647. Birchenough GMH, Johansson MEV, Gustafsson JK, Bergström JH, Hansson GC. New developments in goblet cell mucus secretion and function. *Mucosal Immunol.* 2015;8(4):712–9.
648. Pelaseyed T, Bergström JH, Gustafsson JK, Ermund A, Birchenough GMH, Schütte A, i sur. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol Rev.* 2014;260(1):8–20.
649. Baloni P, Funk CC, Yan J, Yurkovich JT, Kueider-Paisley A, Nho K, i sur. Metabolic Network Analysis Reveals Altered Bile Acid Synthesis and Metabolism in Alzheimer’s Disease. *Cell Rep Med.* 2020;1(8):100138.
650. Grant SM, DeMorrow S. Bile Acid Signaling in Neurodegenerative and Neurological Disorders. *Int J Mol Sci.* 2020;21(17):5982.
651. MahmoudianDehkordi S, Arnold M, Nho K, Ahmad S, Jia W, Xie G, i sur. Altered bile acid profile associates with cognitive impairment in Alzheimer’s disease-An emerging role for gut microbiome. *Alzheimers Dement.* 2019;15(1):76–92.
652. Varma VR, Wang Y, An Y, Varma S, Bilgel M, Doshi J, i sur. Bile acid synthesis, modulation, and dementia: A metabolomic, transcriptomic, and pharmacoepidemiologic study. *PLoS Med.* 2021;18(5):e1003615.
653. Atuma C, Strugala V, Allen A, Holm L. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001;280(5):G922-9.
654. Macierzanka A, Mackie AR, Krupa L. Permeability of the small intestinal mucus for physiologically relevant studies: Impact of mucus location and ex vivo treatment. *Sci Rep.* 2019;9(1):17516.
655. Miyazaki K, Kishimoto H, Muratani M, Kobayashi H, Shirasaka Y, Inoue K. Mucins are Involved in the Intestinal Permeation of Lipophilic Drugs in the Proximal Region of Rat Small Intestine. *Pharm Res.* 2019;36(11):162.
656. MacAdam A. The effect of gastro-intestinal mucus on drug absorption. *Advanced Drug Delivery Reviews [Internet].* 1993 [pristupljeno 19.09.2022.];11(3):201–20. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0169409X93900102>

657. Moraes RCM de, Lima GCA, Cardinali CAEF, Gonçalves AC, Portari GV, Guerra-Shinohara EM, i sur. Benfotiamine protects against hypothalamic dysfunction in a STZ-induced model of neurodegeneration in rats. *Life Sci.* 2022;306:120841.
658. Polakof S, Míguez JM, Soengas JL. Evidence for a gut-brain axis used by glucagon-like peptide-1 to elicit hyperglycaemia in fish. *J Neuroendocrinol.* 2011;23(6):508–18.
659. Katsurada K, Yada T. Neural effects of gut- and brain-derived glucagon-like peptide-1 and its receptor agonist. *J Diabetes Investig.* 2016;7 Suppl 1(Suppl 1):64–9.
660. Hayes MR, Mietlicki-Baase EG, Kanoski SE, De Jonghe BC. Incretins and amylin: neuroendocrine communication between the gut, pancreas, and brain in control of food intake and blood glucose. *Annu Rev Nutr.* 2014;34:237–60.
661. Cai HY, Yang D, Qiao J, Yang JT, Wang ZJ, Wu MN, i sur. A GLP-1/GIP Dual Receptor Agonist DA4-JC Effectively Attenuates Cognitive Impairment and Pathology in the APP/PS1/Tau Model of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2021;83(2):799–818.
662. Zhang M, Wu Y, Gao R, Chen X, Chen R, Chen Z. Glucagon-like peptide-1 analogs mitigate neuroinflammation in Alzheimer's disease by suppressing NLRP2 activation in astrocytes. *Mol Cell Endocrinol.* 2022;542:111529.
663. Li Z, Zhang Y, Meng X, Li M, Cao W, Yang J, i sur. A novel DPP-4 inhibitor Gramcyclin A attenuates cognitive deficits in APP/PS1/tau triple transgenic mice via enhancing brain GLP-1-dependent glucose uptake. *Phytother Res.* 2022;36(3):1297–309.
664. Kosaraju J, Madhunapantula SV, Chinni S, Khatwal RB, Dubala A, Muthureddy Nataraj SK, i sur. Dipeptidyl peptidase-4 inhibition by *Pterocarpus marsupium* and *Eugenia jambolana* ameliorates streptozotocin induced Alzheimer's disease. *Behav Brain Res.* 2014;267:55–65.
665. Solmaz V, Çınar BP, Yiğittürk G, Çavuşoğlu T, Taşkırın D, Erbaş O. Exenatide reduces TNF- $\alpha$  expression and improves hippocampal neuron numbers and memory in streptozotocin treated rats. *Eur J Pharmacol.* 2015;765:482–7.
666. Shi L, Zhang Z, Li L, Hölscher C. A novel dual GLP-1/GIP receptor agonist alleviates cognitive decline by re-sensitizing insulin signaling in the Alzheimer icv. STZ rat model. *Behav Brain Res.* 2017;327:65–74.
667. Kosaraju J, Murthy V, Khatwal RB, Dubala A, Chinni S, Muthureddy Nataraj SK, i sur. Vildagliptin: an anti-diabetes agent ameliorates cognitive deficits and pathology observed in streptozotocin-induced Alzheimer's disease. *J Pharm Pharmacol.* 2013;65(12):1773–84.
668. Vendrell J, El Bekay R, Peral B, García-Fuentes E, Megia A, Macias-Gonzalez M, i sur. Study of the Potential Association of Adipose Tissue GLP-1 Receptor with Obesity and Insulin Resistance. *Endocrinology.* 2011;152(11):4072-9.
669. McLean BA, Wong CK, Campbell JE, Hodson DJ, Trapp S, Drucker DJ. Revisiting the Complexity of GLP-1 Action from Sites of Synthesis to Receptor Activation. *Endocrine Reviews.* 2021;42(2):101-132.

670. Müller TD, Finan B, Bloom SR, D'Alessio D, Drucker DJ, Flatt PR, i sur. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1). *Mol Metab.* 2019;30:72-130.
671. Yan K, Gao LN, Cui YL, Zhang Y, Zhou X. The cyclic AMP signaling pathway: Exploring targets for successful drug discovery (Review). *Mol Med Rep.* 2016 May;13(5):3715–23.
672. Sassone-Corsi P. The Cyclic AMP Pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(12):a011148.
673. Serezani CH, Ballinger MN, Aronoff DM, Peters-Golden M. Cyclic AMP. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008;39(2):127-32.
674. Tengholm A. Cyclic AMP dynamics in the pancreatic  $\beta$ -cell. *Ups J Med Sci.* 2012;117(4):355–69.
675. Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-Hessling S, Palmethofer A, Serfling E, i sur. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med.* 2007;204(6):1303–10.
676. Jackson EK, Ren J, Gillespie DG, Dubey RK. Extracellular 2,3-cyclic adenosine monophosphate is a potent inhibitor of preglomerular vascular smooth muscle cell and mesangial cell growth [corrected]. *Hypertension.* 2010;56(1):151–8.
677. Arshad N, Visweswariah SS. Cyclic nucleotide signaling in intestinal epithelia: getting to the gut of the matter. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2013;5(4):409–24.
678. Zimmerman NP, Kumar SN, Turner JR, Dwinell MB. Cyclic AMP dysregulates intestinal epithelial cell restitution through PKA and RhoA. *Inflamm Bowel Dis.* 2012;18(6):1081-91.
679. Botsford JL, Harman JG. Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiol Rev.* 1992;56(1):100-22.
680. Greene JG. Animal models of gastrointestinal problems in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis.* 2011;1(2):137–49.
681. Pellegrini C, Colucci R, Antonioli L, Barocelli E, Ballabeni V, Bernardini N, i sur. Intestinal dysfunction in Parkinson's disease: Lessons learned from translational studies and experimental models. *Neurogastroenterol Motil.* 2016;28(12):1781-1791.
682. McQuade RM, Singleton LM, Wu H, Lee S, Constable R, Di Natale M, i sur. The association of enteric neuropathy with gut phenotypes in acute and progressive models of Parkinson's disease. *Sci Rep.* 2021;11(1):7934.
683. Wang L, Fleming SM, Chesselet MF, Taché Y. Abnormal colonic motility in mice overexpressing human wild-type alpha-synuclein. *Neuroreport.* 2008;19(8):873–6.
684. Kuo YM, Li Z, Jiao Y, Gaborit N, Pani AK, Orrison BM, i sur. Extensive enteric nervous system abnormalities in mice transgenic for artificial chromosomes containing Parkinson disease-associated alpha-synuclein gene mutations precede central nervous system changes. *Hum Mol Genet.* 2010;19(9):1633–50.



685. Han JY, Shin C, Choi YP. Preclinical Detection of Alpha-Synuclein Seeding Activity in the Colon of a Transgenic Mouse Model of Synucleinopathy by RT-QuIC. *Viruses*. 2021;13(5):759.
686. Liu Y, Wang W, Song N, Jiao L, Jia F, Du X, i sur. Ghrelin Bridges DMV Neuropathology and GI Dysfunction in the Early Stages of Parkinson's Disease. *Adv Sci (Weinh)*. 2022;9(30):e2203020.
687. Su Y, Liu N, Zhang Z, Li H, Ma J, Yuan Y, i sur. Cholecystokinin and glucagon-like peptide-1 analogues regulate intestinal tight junction, inflammation, dopaminergic neurons and  $\alpha$ -synuclein accumulation in the colon of two Parkinson's disease mouse models. *Eur J Pharmacol*. 2022;926:175029.
688. Gries M, Christmann A, Schulte S, Weyland M, Rommel S, Martin M, i sur. Parkinson mice show functional and molecular changes in the gut long before motoric disease onset. *Mol Neurodegener*. 2021;16(1):34.
689. Meredith GE, Rademacher DJ. MPTP mouse models of Parkinson's disease: an update. *J Parkinsons Dis*. 2011;1(1):19–33.
690. Przedborski S, Vila M. MPTP: a review of its mechanisms of neurotoxicity. *Clinical Neuroscience Research [Internet]*. 2001 [pristupljeno 27.11.2022.];1(6):407–18. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1566277201000196>
691. Bové J, Prou D, Perier C, Przedborski S. Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx*. 2005;2(3):484–94.
692. Heikkilä RE, Hess A, Duvoisin RC. Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine in mice. *Science*. 1984;224(4656):1451–3.
693. Jackson-Lewis V, Jakowec M, Burke RE, Przedborski S. Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neurodegeneration*. 1995;4(3):257–69.
694. Przedborski S, Vila M. The 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model: a tool to explore the pathogenesis of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;991:189–98.
695. Anderson G, Noorian AR, Taylor G, Anitha M, Bernhard D, Srinivasan S, i sur. Loss of enteric dopaminergic neurons and associated changes in colon motility in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Exp Neurol*. 2007;207(1):4–12.
696. Tian YM, Chen X, Luo DZ, Zhang XH, Xue H, Zheng LF, i sur. Alteration of dopaminergic markers in gastrointestinal tract of different rodent models of Parkinson's disease. *Neuroscience*. 2008;153(3):634–44.
697. Natale G, Kastsiushenka O, Fulceri F, Ruggieri S, Paparelli A, Fornai F. MPTP-induced parkinsonism extends to a subclass of TH-positive neurons in the gut. *Brain Res*. 2010;1355:195–206.

698. Soykan I, Sarosiek I, Shifflett J, Wooten GF, McCallum RW. Effect of chronic oral domperidone therapy on gastrointestinal symptoms and gastric emptying in patients with Parkinson's disease. *Mov Disord.* 1997;12(6):952–7.
699. Shindler JS, Finnerty GT, Towlson K, Dolan AL, Davies CL, Parkes JD. Domperidone and levodopa in Parkinson's disease. *Br J Clin Pharmacol.* 1984;18(6):959–62.
700. Taylor TN, Caudle WM, Shepherd KR, Noorian A, Jackson CR, Iuvone PM, i sur. Nonmotor Symptoms of Parkinson's Disease Revealed in an Animal Model with Reduced Monoamine Storage Capacity. *J Neurosci.* 2009;29(25):8103-13.
701. Li ZS, Schmauss C, Cuenca A, Ratcliffe E, Gershon MD. Physiological modulation of intestinal motility by enteric dopaminergic neurons and the D2 receptor: analysis of dopamine receptor expression, location, development, and function in wild-type and knock-out mice. *J Neurosci.* 2006;26(10):2798–807.
702. Vegezzi G, Al Harraq Z, Levandis G, Cerri S, Blandini F, Gnudi G, i sur. Radiological analysis of gastrointestinal dysmotility in a model of central nervous dopaminergic degeneration: comparative study with conventional in vivo techniques in the rat. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2014;70(2):163–9.
703. Colucci M, Cervio M, Faniglione M, De Angelis S, Pajoro M, Levandis G, i sur. Intestinal dysmotility and enteric neurochemical changes in a Parkinson's disease rat model. *Auton Neurosci.* 2012;169(2):77–86.
704. Zhu HC, Zhao J, Luo CY, Li QQ. Gastrointestinal dysfunction in a Parkinson's disease rat model and the changes of dopaminergic, nitric oxidergic, and cholinergic neurotransmitters in myenteric plexus. *J Mol Neurosci.* 2012;47(1):15–25.
705. Toti L, Travagli RA. Gastric dysregulation induced by microinjection of 6-OHDA in the substantia nigra pars compacta of rats is determined by alterations in the brain-gut axis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2014; 307(10): G1013–G1023.
706. Fornai M, Pellegrini C, Antonioli L, Segnani C, Ippolito C, Barocelli E, i sur. Enteric Dysfunctions in Experimental Parkinson's Disease: Alterations of Excitatory Cholinergic Neurotransmission Regulating Colonic Motility in Rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2016 ;356(2):434–44.
707. Blandini F, Balestra B, Levandis G, Cervio M, Greco R, C T, i sur. Functional and neurochemical changes of the gastrointestinal tract in a rodent model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 2009;467(3):203-7.
708. Zhang X, Li Y, Liu C, Fan R, Wang P, Zheng L, i sur. Alteration of enteric monoamines with monoamine receptors and colonic dysmotility in 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's disease rats. *Transl Res.* 2015;166(2):152–62.
709. Levandis G, Balestra B, Siani F, Rizzo V, Ghezzi C, Ambrosi G, i sur. Response of colonic motility to dopaminergic stimulation is subverted in rats with nigrostriatal lesion: relevance to gastrointestinal dysfunctions in Parkinson's disease. *Neurogastroenterol Motil.* 2015;27(12):1783–95.

710. Greene JG, Noorian AR, Srinivasan S. Delayed gastric emptying and enteric nervous system dysfunction in the rotenone model of Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 2009;218(1):154-61.
711. Murakami S, Miyazaki I, Miyoshi K, Asanuma M. Long-Term Systemic Exposure to Rotenone Induces Central and Peripheral Pathology of Parkinson's Disease in Mice. *Neurochem Res.* 2015;40(6):1165-78.
712. Yan Z, Li R, Shi W, Yao L. Role of the gut-microbiota-metabolite axis in the rotenone model of early-stage Parkinson's Disease. *Metab Brain Dis.* 2022;37(7):2511-20.
713. Riederer P, Monoranu C, Strobel S, Iordache T, Sian-Hülsmann J. Iron as the concert master in the pathogenic orchestra playing in sporadic Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna).* 2021;128(10):1577-98.
714. Blesa J, Trigo-Damas I, Quiroga-Varela A, Jackson-Lewis VR. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Front Neuroanat.* 2015;9:91.
715. Wei Z, Li X, Li X, Liu Q, Cheng Y. Oxidative Stress in Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Mol Neurosci.* 2018;11:236.
716. Dorszewska J, Kowalska M, Prendecki M, Piekut T, Kozłowska J, Kozubski W. Oxidative stress factors in Parkinson's disease. *Neural Regen Res.* 2021;16(7):1383-91.
717. Trist BG, Hare DJ, Double KL. Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. *Aging Cell.* 2019;18(6):e13031.
718. Circu ML, Aw TY. Intestinal redox biology and oxidative stress. *Semin Cell Dev Biol.* 2012;23(7):729-37.
719. Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S, Crowe SE. Oxidative Stress: An Essential Factor in the Pathogenesis of Gastrointestinal Mucosal Diseases. *Physiol Rev.* 2014;94(2):329-54.
720. McCord JM. Radical explanations for old observations. *Gastroenterology.* 1987;92(6):2026-8.
721. Dodiya HB, Forsyth CB, Voigt RM, Engen PA, Patel J, Shaikh M, et al. Chronic stress-induced gut dysfunction exacerbates Parkinson's disease phenotype and pathology in a rotenone-induced mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2020;135:104352.
722. Farombi EO, Awogbindin IO, Olorunkalu PD, Ogbuewu E, Oyetunde BF, Agedah AE, et al. Kolaviron protects against nigrostriatal degeneration and gut oxidative damage in a stereotaxic rotenone model of Parkinson's disease. *Psychopharmacology (Berl).* 2020;237(11):3225-36.
723. Ünal İ, Üstündağ ÜV, Ateş PS, Eğilmezer G, Alturfan AA, Yiğitbaşı T, et al. Rotenone impairs oxidant/antioxidant balance both in brain and intestines in zebrafish. *Int J Neurosci.* 2019;129(4):363-8.

724. Cansız D, Ünal İ, Üstündağ ÜV, Alturfan AA, Altinoz MA, Elmacı İ, i sur. Caprylic acid ameliorates rotenone induced inflammation and oxidative stress in the gut-brain axis in Zebrafish. *Mol Biol Rep.* 2021;48(6):5259–73.
725. Heng Y, Li YY, Wen L, Yan JQ, Chen NH, Yuan YH. Gastric Enteric Glial Cells: A New Contributor to the Synucleinopathies in the MPTP-Induced Parkinsonism Mouse. *Molecules.* 2022;27(21):7414.
726. Garrido-Gil P, Rodriguez-Perez AI, Dominguez-Mejjide A, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. Bidirectional Neural Interaction Between Central Dopaminergic and Gut Lesions in Parkinson's Disease Models. *Mol Neurobiol.* 2018;55(9):7297–316.
727. Pellegrini C, Fornai M, Colucci R, Tirotta E, Blandini F, Levandis G, i sur. Alteration of colonic excitatory tachykininergic motility and enteric inflammation following dopaminergic nigrostriatal neurodegeneration. *Journal of Neuroinflammation.* 2016;13(1):146.
728. Tieu K. A Guide to Neurotoxic Animal Models of Parkinson's Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2011;1(1):a009316.
729. Píknač M. Povezanost kognitivne sposobnosti s glutamatnom i inzulinskom signalizacijom u štakorskom modelu Parkinsonove bolesti. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno matematički fakultet; 2021.
730. Anselmi L, Toti L, Bove C, Hampton J, Travagli RA. A Nigro-Vagal Pathway Controls Gastric Motility and Is Affected in a Rat Model of Parkinsonism. *Gastroenterology.* 2017;153(6):1581–93.
731. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med.* 1990;9(6):515–40.
732. Morales M, Munné-Bosch S. Malondialdehyde: Facts and Artifacts. *Plant Physiol.* 2019;180(3):1246-1250.
733. Carty E, Nickols C, Feakins RM, Rampton DS. Thromboxane synthase immunohistochemistry in inflammatory bowel disease. *J Clin Pathol.* 2002;55(5):367-70.
734. Campbell EL, Colgan SP. Control and dysregulation of redox signalling in the gastrointestinal tract. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019;16(2):106-120.
735. Chang KH, Chen CM. The Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease. *Antioxidants (Basel).* 2020;9(7):597.
736. Liu W, Lim KL, Tan EK. Intestine-derived  $\alpha$ -synuclein initiates and aggravates pathogenesis of Parkinson's disease in *Drosophila*. *Transl Neurodegener.* 2022;11(1):44.
737. Chang FY, Lee SD, Yeh GH, Wang PS. Comparison of two orogastric feeding markers for measuring gastrointestinal motor functions in rats. *Pharmacology.* 1994;49(3):151–8.
738. Gromova LV, Fetissov SO, Gruzdkov AA. Mechanisms of Glucose Absorption in the Small Intestine in Health and Metabolic Diseases and Their Role in Appetite Regulation. *Nutrients.* 2021 Jul;13(7):2474.

739. Rudyk O, Eaton P. Biochemical methods for monitoring protein thiol redox states in biological systems. *Redox Biol.* 2014;2:803-13.
740. Sies H. Role of Metabolic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Generation. *J Biol Chem.* 2014;289(13):8735-41.
741. Szypowska AA, Burgering BMT. The peroxide dilemma: opposing and mediating insulin action. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15(1):219–32.
742. Indo HP, Yen HC, Nakanishi I, Matsumoto KI, Tamura M, Nagano Y, i sur. A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging. *J Clin Biochem Nutr.* 2015;56(1):1–7.
743. Jordan J, Saez-Atienzar S, Atienzar-Aroca S, Solesio ME, Galindo MF. Pharmacology and Pathology of Superoxide Dismutases (SOD). In: Laher I, editor. *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014 [pristupljeno 18.10.2021.] 457–74. Dostupno na: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-30018-9\\_29](https://doi.org/10.1007/978-3-642-30018-9_29)
744. Kohút A, Mojzís J. Effect of allopurinol and superoxide dismutase on indomethacin-induced gastric lesions in the rat. *Physiol Res.* 1993;42(4):273–6.
745. Naito Y, Yoshikawa T, Ando T, Kishi A, Ueda S, Oyamada H, i sur. Changes in superoxide dismutase activity in the gastric mucosa of peptic ulcer patients. *J Clin Gastroenterol.* 1992;14 Suppl 1:S131-134.
746. Wingler K, Müller C, Schmehl K, Florian S, Brigelius-Flohé R. Gastrointestinal glutathione peroxidase prevents transport of lipid hydroperoxides in CaCo-2 cells. *Gastroenterology.* 2000;119(2):420–30.
747. Brigelius-Flohé R, Müller C, Menard J, Florian S, Schmehl K, Wingler K. Functions of GI-GPx: lessons from selenium-dependent expression and intracellular localization. *Biofactors.* 2001;14(1–4):101–6.
748. Esworthy RS, Aranda R, Martín MG, Doroshov JH, Binder SW, Chu FF. Mice with combined disruption of Gpx1 and Gpx2 genes have colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001;281(3):G848-855.
749. Wang Y, Chen Y, Zhang X, Lu Y, Chen H. New insights in intestinal oxidative stress damage and the health intervention effects of nutrients: A review. *Journal of Functional Foods* [Internet]. 2020 [pristupljeno 20.10.2021.];75:104248. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464620304722>
750. Sochocka M, Donskow-Łysoniewska K, Diniz BS, Kurpas D, Brzozowska E, Leszek J. The Gut Microbiome Alterations and Inflammation-Driven Pathogenesis of Alzheimer's Disease-a Critical Review. *Mol Neurobiol.* 2019;56(3):1841–51.
751. Knezovic A, Osmanovic Barilar J, Babic A, Bagaric R, Farkas V, Riederer P, i sur. Glucagon-like peptide-1 mediates effects of oral galactose in streptozotocin-induced rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Neuropharmacology.* 2018;135:48–62.
752. Omar NAM, Frank J, Kruger J, Bello FD, Medana C, Collino M, i sur. Effects of High Intakes of Fructose and Galactose, with or without Added Fructooligosaccharides, on

- Metabolic Factors, Inflammation, and Gut Integrity in a Rat Model. *Mol Nutr Food Res*. 2021 Mar;65(6):e2001133.
753. Nutrition NRC (US) S on LA. Nutrient Requirements of the Laboratory Rat [Internet]. Nutrient Requirements of Laboratory Animals: Fourth Revised Edition, 1995. National Academies Press (US); 1995 [pristupljeno 20.10.2021.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK231925/>
754. Cornick S, Tawiah A, Chadee K. Roles and regulation of the mucus barrier in the gut. *Tissue Barriers*. 2015;3(1-2):e982426.
755. Paone P, Cani PD. Mucus barrier, mucins and gut microbiota: the expected slimy partners? *Gut*. 2020 Dec;69(12):2232-2243.
756. Sadigh-Eteghad S, Majdi A, McCann SK, Mahmoudi J, Vafaei MS, Macleod MR. D-galactose-induced brain ageing model: A systematic review and meta-analysis on cognitive outcomes and oxidative stress indices. *PLoS One*. 2017;12(8):e0184122.
757. Singh S, Brocker C, Koppaka V, Chen Y, Jackson BC, Matsumoto A, i sur. Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/electrophilic stress. *Free Radic Biol Med*. 2013;56:89–101.
758. Fatemi I, Khaluoi A, Kaeidi A, Shamsizadeh A, Heydari S, Allahtavakoli MA. Protective effect of metformin on D-galactose-induced aging model in mice. *Iran J Basic Med Sci*. 2018;21(1):19–25.
759. Kumar A, Dogra S, Prakash A. Effect of carvedilol on behavioral, mitochondrial dysfunction, and oxidative damage against D-galactose induced senescence in mice. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2009;380(5):431–41.
760. Calabrese EJ. Hormesis: improving predictions in the low-dose zone. *Exp Suppl*. 2012;101:551–64.
761. Chen YR, Deterding LJ, Sturgeon BE, Tomer KB, Mason RP. Protein oxidation of cytochrome C by reactive halogen species enhances its peroxidase activity. *J Biol Chem*. 2002;277(33):29781–91.
762. Costantini D. Oxidative Stress and Hormesis in Evolutionary Ecology and Physiology: A Marriage Between Mechanistic and Evolutionary Approaches [Internet]. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2014 [pristupljeno 11.02.2021.]. Dostupno na: <https://www.springer.com/gp/book/9783642546624>
763. Poljsak B, Šuput D, Milisav I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:956792.
764. Christodoulou D, Kuehne A, Estermann A, Fuhrer T, Lang P, Sauer U. Reserve Flux Capacity in the Pentose Phosphate Pathway by NADPH Binding Is Conserved across Kingdoms. *iScience*. 2019;19:1133–44.
765. Christodoulou D, Link H, Fuhrer T, Kochanowski K, Gerosa L, Sauer U. Reserve Flux Capacity in the Pentose Phosphate Pathway Enables *Escherichia coli*'s Rapid Response to Oxidative Stress. *Cell Syst*. 2018;6(5):569-578.e7.

766. Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol.* 2002;192(1):1–15.
767. Stincone A, Prigione A, Cramer T, Wamelink MMC, Campbell K, Cheung E, i sur. The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2015;90(3):927–63.
768. Kuehne A, Emmert H, Soehle J, Winnefeld M, Fischer F, Wenck H, i sur. Acute Activation of Oxidative Pentose Phosphate Pathway as First-Line Response to Oxidative Stress in Human Skin Cells. *Mol Cell.* 2015;59(3):359–71.
769. Scott MD, Zuo L, Lubin BH, Chiu DT. NADPH, not glutathione, status modulates oxidant sensitivity in normal and glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient erythrocytes. *Blood.* 1991;77(9):2059–64.
770. Brumaghim JL, Li Y, Henle E, Linn S. Effects of hydrogen peroxide upon nicotinamide nucleotide metabolism in *Escherichia coli*: changes in enzyme levels and nicotinamide nucleotide pools and studies of the oxidation of NAD(P)H by Fe(III). *J Biol Chem.* 2003;278(43):42495–504.
771. Grose JH, Joss L, Velick SF, Roth JR. Evidence that feedback inhibition of NAD kinase controls responses to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(20):7601–6.
772. Ying W. NAD<sup>+</sup>/NADH and NADP<sup>+</sup>/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10(2):179–206.
773. Kawai S, Murata K. Structure and function of NAD kinase and NADP phosphatase: key enzymes that regulate the intracellular balance of NAD(H) and NADP(H). *Biosci Biotechnol Biochem.* 2008;72(4):919–30.
774. Pollak N, Niere M, Ziegler M. NAD kinase levels control the NADPH concentration in human cells. *J Biol Chem.* 2007;282(46):33562–71.
775. Pollak N, Dölle C, Ziegler M. The power to reduce: pyridine nucleotides – small molecules with a multitude of functions. *Biochem J.* 2007;402(2):205–18.
776. Lerner F, Niere M, Ludwig A, Ziegler M. Structural and functional characterization of human NAD kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;288(1):69–74.
777. Zhang R. MNADK, a Long-Awaited Human Mitochondrion-Localized NAD Kinase. *J Cell Physiol.* 2015;230(8):1697–701.
778. Shianna KV, Marchuk DA, Strand MK. Genomic characterization of POS5, the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial NADH kinase. *Mitochondrion.* 2006;6(2):94–101.
779. Akella SS, Harris C. Developmental Ontogeny of NAD<sup>+</sup> Kinase in the Rat Conceptus. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2001;170(2):124–9.
780. Akinshola BE, Potter JJ, Mezey E. Ethanol increases the formation of NADP<sup>+</sup> in rat hepatocytes. *Hepatology.* 1991;13(3):509–14.

781. Cueno ME, Imai K, Tamura M, Ochiai K. Butyric acid-induced rat jugular blood cytosolic oxidative stress is associated with SIRT1 decrease. *Cell Stress Chaperones*. 2014;19(2):295–8.
782. Dragunow M, Faull R. The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J Neurosci Methods*. 1989;29(3):261–5.
783. Herrera DG, Robertson HA. Activation of c-fos in the brain. *Prog Neurobiol*. 1996;50(2–3):83–107.
784. Lewerenz J, Maher P. Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases—What is the Evidence? *Front Neurosci*. 2015;9:469.
785. Mason S. Lactate Shuttles in Neuroenergetics—Homeostasis, Allostasis and Beyond. *Front Neurosci*. 2017;11:43.
786. Takahashi M, Tsuda T, Ikeda Y, Honke K, Taniguchi N. Role of N-glycans in growth factor signaling. *Glycoconj J*. 2004;20(3):207–12.
787. Hoxhaj G, Ben-Sahra I, Lockwood SE, Timson RC, Byles V, Henning GT, et al. Direct stimulation of NADP<sup>+</sup> synthesis through Akt-mediated phosphorylation of NAD kinase. *Science*. 2019;363(6431):1088–1092.
788. Filomeni G, Desideri E, Cardaci S, Rotilio G, Ciriolo MR. Under the ROS...thiol network is the principal suspect for autophagy commitment. *Autophagy*. 2010;6(7):999–1005.
789. Chen Y, Azad MB, Gibson SB. Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell Death Differ*. 2009;16(7):1040–52.
790. Green DR, Rathmell J. Sweet Nothings: Sensing of Sugar Metabolites Controls T Cell Function. *Cell Metabolism Cell Metab*. 2013;18(1):7–8.
791. Chang CH, Curtis JD, Maggi LB, Faubert B, Villarino AV, O’Sullivan D, et al. Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. *Cell*. 2013;153(6):1239–51.
792. Jenkins CM, Yang J, Sims HF, Gross RW. Reversible high affinity inhibition of phosphofructokinase-1 by acyl-CoA: a mechanism integrating glycolytic flux with lipid metabolism. *J Biol Chem*. 2011;286(14):11937–50.
793. Li N, He Y, Wang L, Mo C, Zhang J, Zhang W, et al. D-galactose induces necroptotic cell death in neuroblastoma cell lines. *J Cell Biochem*. 2011;112(12):3834–44.
794. Robinson BH, Petrova-Benedict R, Buncic JR, Wallace DC. Nonviability of cells with oxidative defects in galactose medium: a screening test for affected patient fibroblasts. *Biochem Med Metab Biol*. 1992;48(2):122–6.
795. Aguer C, Gambarotta D, Mailloux RJ, Moffat C, Dent R, McPherson R, et al. Galactose enhances oxidative metabolism and reveals mitochondrial dysfunction in human primary muscle cells. *PLoS One*. 2011;6(12):e28536.



796. Bárcena C, Mayoral P, Quirós PM. Mitohormesis, an Antiaging Paradigm. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2018;340:35–77.
797. Salkovic-Petrisic M. Oral Galactose Provides a Different Approach to Incretin-Based Therapy of Alzheimer’s Disease. *Journal of Neurology & Neuromedicine* [Internet]. 2018 [pristupljeno 11.02.2021.];3(4). Dostupno na: <https://www.jneurology.com/articles/oral-galactose-provides-a-different-approach-to-incretinbased-therapy-of-alzheimers-disease.html>
798. Krzysztoforska K, Piechal A, Blecharz-Klin K, Pyrzanowska J, Joniec-Maciejak I, Mirowska-Guzel D, i sur. Administration of protocatechuic acid affects memory and restores hippocampal and cortical serotonin turnover in rat model of oral D-galactose-induced memory impairment. *Behav Brain Res*. 2019;368:111896.
799. Budni J, Garcez ML, Mina F, Bellettini-Santos T, da Silva S, Luz AP da, i sur. The oral administration of D-galactose induces abnormalities within the mitochondrial respiratory chain in the brain of rats. *Metab Brain Dis*. 2017;32(3):811–7.
800. Huang H, Wang L, Cao M, Marshall C, Gao J, Xiao N, i sur. Isolation Housing Exacerbates Alzheimer’s Disease-Like Pathophysiology in Aged APP/PS1 Mice. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2015;18(7):pyu116.
801. Lavenda-Grosberg D, Lalzar M, Leser N, Yaseen A, Malik A, Maroun M, i sur. Acute social isolation and regrouping cause short- and long-term molecular changes in the rat medial amygdala. *Mol Psychiatry*. 2022;27(2):886-895.
802. Drinkwater E, Davies C, Spires-Jones TL. Potential neurobiological links between social isolation and Alzheimer’s disease risk. *Eur J Neurosci*. 2022 Nov;56(9):5397-5412.
803. Peterman JL, White JD, Calcagno A, Hagen C, Quiring M, Paulhus K, i sur. Prolonged isolation stress accelerates the onset of Alzheimer’s disease-related pathology in 5xFAD mice despite running wheels and environmental enrichment. *Behav Brain Res*. 2020;379:112366.
804. Liang F, Yang S, Zhang Y, Hao T. Social housing promotes cognitive function through enhancing synaptic plasticity in APP/PS1 mice. *Behav Brain Res*. 2019;368:111910.
805. Šalković M, Sabolić I, Lacković Z. Striatal dopaminergic D1 and D2 receptors after intracerebroventricular application of alloxan and streptozocin in rat. *J Neural Transm Gen Sect*. 1995;100(2):137–45.
806. van der Hee B, Wells JM. Microbial Regulation of Host Physiology by Short-chain Fatty Acids. *Trends Microbiol*. 2021 Aug;29(8):700-712.
807. Portincasa P, Bonfrate L, Vacca M, De Angelis M, Farella I, Lanza E, i sur. Gut Microbiota and Short Chain Fatty Acids: Implications in Glucose Homeostasis. *Int J Mol Sci*. 2022;23(3):1105.
808. Silva YP, Bernardi A, Frozza RL. The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:25.

809. Marizzoni M, Cattaneo A, Mirabelli P, Festari C, Lopizzo N, Nicolosi V, i sur. Short-Chain Fatty Acids and Lipopolysaccharide as Mediators Between Gut Dysbiosis and Amyloid Pathology in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2020;78(2):683–97.
810. Qian XH, Xie RY, Liu XL, Chen S, Tang HD. Mechanisms of Short-Chain Fatty Acids Derived from Gut Microbiota in Alzheimer's Disease. *Aging Dis.* 2022;13(4):1252-1266.
811. Mirzaei R, Bouzari B, Hosseini-Fard SR, Mazaheri M, Ahmadyousefi Y, Abdi M, i sur. Role of microbiota-derived short-chain fatty acids in nervous system disorders. *Biomed Pharmacother.* 2021 Jul;139:111661.
812. Stahel P, Kim JJ, Xiao C, Cant JP. Of the milk sugars, galactose, but not prebiotic galacto-oligosaccharide, improves insulin sensitivity in male Sprague-Dawley rats. *PLoS One.* 2017;12(2):e0172260.
813. Magne F, Gotteland M, Gauthier L, Zazueta A, Pessoa S, Navarrete P, i sur. The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients? *Nutrients.* 2020;12(5):1474.
814. Bahar-Tokman H, Demirci M, Keskin FE, Cagatay P, Taner Z, Ozturk-Bakar Y, i sur. Firmicutes/Bacteroidetes Ratio in the Gut Microbiota and IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TLR2, TLR4, TLR5 Gene Expressions in Type 2 Diabetes. *Clin Lab.* 2022;68(9).
815. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature.* 2006;444(7122):1022–3.
816. Spychala MS, Venna VR, Jandzinski M, Doran SJ, Durgan DJ, Ganesh BP, i sur. Age-related changes in the gut microbiota influence systemic inflammation and stroke outcome. *Ann Neurol.* 2018;84(1):23–36.
817. Saji N, Niida S, Murotani K, Hisada T, Tsuduki T, Sugimoto T, i sur. Analysis of the relationship between the gut microbiome and dementia: a cross-sectional study conducted in Japan. *Sci Rep.* 2019;9(1):1008.
818. Vogt NM, Kerby RL, Dill-McFarland KA, Harding SJ, Merluzzi AP, Johnson SC, i sur. Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease. *Sci Rep.* 2017;7(1):13537.
819. van Olst L, Roks SJM, Kamermans A, Verhaar BJH, van der Geest AM, Muller M, i sur. Contribution of Gut Microbiota to Immunological Changes in Alzheimer's Disease. *Front Immunol.* 2021;12:683068.
820. Mariat D, Firmesse O, Levenez F, Guimarões V, Sokol H, Doré J, i sur. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol.* 2009;9:123.
821. Liu P, Wu L, Peng G, Han Y, Tang R, Ge J, i sur. Altered microbiomes distinguish Alzheimer's disease from amnesic mild cognitive impairment and health in a Chinese cohort. *Brain Behav Immun.* 2019 Aug;80:633-643.
822. Hung CC, Chang CC, Huang CW, Nouchi R, Cheng CH. Gut microbiota in patients with Alzheimer's disease spectrum: a systematic review and meta-analysis. *Aging (Albany NY).* 2022;14(1):477-496.

823. Bäuerl C, Collado MC, Diaz Cuevas A, Viña J, Pérez Martínez G. Shifts in gut microbiota composition in an APP/PSS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease during lifespan. *Lett Appl Microbiol*. 2018;66(6):464–71.
824. Lee DY, Shin YJ, Kim JK, Jang HM, Joo MK, Kim DH. Alleviation of cognitive impairment by gut microbiota lipopolysaccharide production-suppressing *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium longum* in mice. *Food Funct*. 2021;12(21):10750-10763.
825. Li Z, Zhu H, Zhang L, Qin C. The intestinal microbiome and Alzheimer's disease: A review. *Animal Model Exp Med*. 2018;1(3):180-188.
826. Gerhardt S, Mohajeri MH. Changes of Colonic Bacterial Composition in Parkinson's Disease and Other Neurodegenerative Diseases. *Nutrients*. 2018;10(6):708.
827. Grochowska M, Laskus T, Radkowski M. Gut Microbiota in Neurological Disorders. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2019 Dec;67(6):375-383.
828. Kaiyrykyzy A, Kozhakhmetov S, Babenko D, Zholdasbekova G, Alzhanova D, Olzhayev F, i sur. Study of gut microbiota alterations in Alzheimer's dementia patients from Kazakhstan. *Sci Rep*. 2022;12(1):15115.
829. Bader M, Li Y, Tweedie D, Shlobin NA, Bernstein A, Rubovitch V, i sur. Neuroprotective Effects and Treatment Potential of Incretin Mimetics in a Murine Model of Mild Traumatic Brain Injury. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7:356.
830. Ji C, Xue GF, Li G, Li D, Hölscher C. Neuroprotective effects of glucose-dependent insulinotropic polypeptide in Alzheimer's disease. *Rev Neurosci*. 2016;27(1):61–70.
831. Salles GN, Calió ML, Hölscher C, Pacheco-Soares C, Porcionatto M, Lobo AO. Neuroprotective and restorative properties of the GLP-1/GIP dual agonist DA-JC1 compared with a GLP-1 single agonist in Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*. 2020;162:107813.
832. Holscher C. Incretin analogues that have been developed to treat type 2 diabetes hold promise as a novel treatment strategy for Alzheimer's disease. *Recent Pat CNS Drug Discov*. 2010;5(2):109–17.
833. Hölscher C. The incretin hormones glucagonlike peptide 1 and glucose-dependent insulinotropic polypeptide are neuroprotective in mouse models of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2014;10(1 Suppl):S47-54.
834. Hölscher C. Central effects of GLP-1: new opportunities for treatments of neurodegenerative diseases. *J Endocrinol*. 2014;221(1):T31-41.
835. Hölscher C. Insulin Signaling Impairment in the Brain as a Risk Factor in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci*. 2019;11:88.
836. Bastías-Candia S, Zolezzi JM, Inestrosa NC. Revisiting the Paraquat-Induced Sporadic Parkinson's Disease-Like Model. *Mol Neurobiol*. 2019;56(2):1044–55.

837. Uversky VN. Neurotoxicant-induced animal models of Parkinson's disease: understanding the role of rotenone, maneb and paraquat in neurodegeneration. *Cell Tissue Res.* 2004;318(1):225–41.
838. Hölscher C. Insulin, incretins and other growth factors as potential novel treatments for Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Biochem Soc Trans.* 2014;42(2):593–9.
839. Cao L, Li D, Feng P, Li L, Xue GF, Li G, i sur. A novel dual GLP-1 and GIP incretin receptor agonist is neuroprotective in a mouse model of Parkinson's disease by reducing chronic inflammation in the brain. *Neuroreport.* 2016;27(6):384–91.
840. Mulvaney CA, Duarte GS, Handley J, Evans DJ, Menon S, Wyse R, i sur. GLP-1 receptor agonists for Parkinson's disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2020;7(7):CD012990.
841. Athauda D, Foltynie T. The glucagon-like peptide 1 (GLP) receptor as a therapeutic target in Parkinson's disease: mechanisms of action. *Drug Discov Today.* 2016;21(5):802–18.
842. Foltynie T, Athauda D. Glucagon-like Peptides (GLP-1) Perspectives in Synucleinopathies Treatment. *Mov Disord Clin Pract.* 2018;5(3):255-258.
843. Bayram E, Litvan I. Lowering the risk of Parkinson's disease with GLP-1 agonists and DPP4 inhibitors in type 2 diabetes. *Brain.* 2020;143(10):2868-2871.
844. Reich N, Hölscher C. The neuroprotective effects of glucagon-like peptide 1 in Alzheimer's and Parkinson's disease: An in-depth review. *Front Neurosci.* 2022;16:970925.
845. Manfready RA, Engen PA, Verhagen Metman L, Sanzo G, Goetz CG, Hall DA, i sur. Attenuated Postprandial GLP-1 Response in Parkinson's Disease. *Front Neurosci.* 2021;15:660942.
846. Yang X, Feng P, Ji R, Ren Y, Wei W, Hölscher C. Therapeutic application of GLP-1 and GIP receptor agonists in Parkinson's disease. *Expert Opin Ther Targets.* 2022 May;26(5):445-460.
847. Skjærbæk C, Knudsen K, Horsager J, Borghammer P. Gastrointestinal Dysfunction in Parkinson's Disease. *J Clin Med.* 2021;10(3):493.
848. Chai XY, Diwakarla S, Pustovit RV, McQuade RM, Di Natale M, Ermine CM, i sur. Investigation of nerve pathways mediating colorectal dysfunction in Parkinson's disease model produced by lesion of nigrostriatal dopaminergic neurons. *Neurogastroenterol Motil.* 2020;32(9):e13893.
849. Taguchi T, Ikuno M, Yamakado H, Takahashi R. Animal Model for Prodromal Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci.* 2020;21(6):1961.
850. Rota L, Pellegrini C, Benvenuti L, Antonioli L, Fornai M, Blandizzi C, i sur. Constipation, deficit in colon contractions and alpha-synuclein inclusions within the colon precede motor abnormalities and neurodegeneration in the central nervous system in a mouse model of alpha-synucleinopathy. *Transl Neurodegener.* 2019;8:5.

851. Travagli RA, Browning KN, Camilleri M. Parkinson disease and the gut: new insights into pathogenesis and clinical relevance. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020 Nov;17(11):673–85.
852. Darwish RS, Amiridze N, Aarabi B. Nitrotyrosine as an oxidative stress marker: evidence for involvement in neurologic outcome in human traumatic brain injury. *J Trauma*. 2007;63(2):439–42.
853. Murata M, Kawanishi S. Oxidative DNA damage induced by nitrotyrosine, a biomarker of inflammation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;316(1):123–8.
854. Ahsan H. 3-Nitrotyrosine: A biomarker of nitrogen free radical species modified proteins in systemic autoimmunogenic conditions. *Hum Immunol*. 2013;74(10):1392–9.
855. Cipak Gasparovic A, Zarkovic N, Zarkovic K, Semen K, Kaminsky D, Yelisyeyeva O, i sur. Biomarkers of oxidative and nitro-oxidative stress: conventional and novel approaches. *Br J Pharmacol*. 2017 Jun;174(12):1771-1783.
856. Li X, Feng X, Jiang Z, Jiang Z. Association of small intestinal bacterial overgrowth with Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Gut Pathog*. 2021;13(1):25.
857. Tan AH, Mahadeva S, Thalha AM, Gibson PR, Kiew CK, Yeat CM, i sur. Small intestinal bacterial overgrowth in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2014;20(5):535–40.
858. Hasuike Y, Endo T, Koroyasu M, Matsui M, Mori C, Yamadera M, i sur. Bile acid abnormality induced by intestinal dysbiosis might explain lipid metabolism in Parkinson's disease. *Med Hypotheses*. 2020;134:109436.
859. Scheperjans F, Aho V, Pereira PAB, Koskinen K, Paulin L, Pekkonen E, i sur. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Mov Disord*. 2015;30(3):350–8.
860. Petrov VA, Saltykova IV, Zhukova IA, Alifirova VM, Zhukova NG, Dorofeeva YB, i sur. Analysis of Gut Microbiota in Patients with Parkinson's Disease. *Bull Exp Biol Med*. 2017;162(6):734–7.
861. Heintz-Buschart A, Pandey U, Wicke T, Sixel-Döring F, Janzen A, Sittig-Wiegand E, i sur. The nasal and gut microbiome in Parkinson's disease and idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder. *Mov Disord*. 2018;33(1):88–98.
862. Keshavarzian A, Green SJ, Engen PA, Voigt RM, Naqib A, Forsyth CB, i sur. Colonic bacterial composition in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2015;30(10):1351–60.
863. Pu Y, Chang L, Qu Y, Wang S, Zhang K, Hashimoto K. Antibiotic-induced microbiome depletion protects against MPTP-induced dopaminergic neurotoxicity in the brain. *Aging (Albany NY)*. 2019;11(17):6915–29.
864. Liu J, Wang F, Liu S, Du J, Hu X, Xiong J, i sur. Sodium butyrate exerts protective effect against Parkinson's disease in mice via stimulation of glucagon like peptide-1. *J Neurol Sci*. 2017;381:176–81.

865. Sun J, Li H, Jin Y, Yu J, Mao S, Su KP, et al. Probiotic *Clostridium butyricum* ameliorated motor deficits in a mouse model of Parkinson's disease via gut microbiota-GLP-1 pathway. *Brain Behav Immun*. 2021;91:703–15.
866. Srivastav S, Neupane S, Bhurtel S, Katila N, Maharjan S, Choi H, et al. Probiotics mixture increases butyrate, and subsequently rescues the nigral dopaminergic neurons from MPTP and rotenone-induced neurotoxicity. *J Nutr Biochem*. 2019 Jul;69:73-86.



## 11. KRATKA BIOGRAFIJA

Jan Homolak rođen je 11.4.1993. godine u Zagrebu gdje je pohađao osnovnu školu *J.J.Strossmayer*, glazbenu školu *Blagoje Bersa* (klarinet) i Prvu gimnaziju. Aktivno se bavio plivanjem 16 godina. 2012. godine upisao je Medicinski fakultet u Zagrebu na kojem stječe diplomu doktora medicine 2018. godine s odličnim uspjehom. Kao student četvrte godine priključuje se radu Laboratorija za molekularnu neurofarmakologiju prof. dr. sc. Melite Šalković-Petrišić te u sklopu istraživanja 2016., 2017. i 2018. boravi u suradničkom laboratoriju na Julius Maximilians Sveučilištu u Würzburgu (Njemačka). Tijekom studija aktivno sudjeluje u radu Studentske sekcije za neuroznanost i časopisa *Gyrus* pri Medicinskom fakultetu te osniva Studentsku sekciju za sportsku fiziologiju pri Medicinskom i Kineziološkom fakultetu. Djeluje kao demonstrator na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga i na Zavodu za patofiziologiju. Nagrađen je dvjema Rektorovim nagradama za rad u Studentskoj sekciji za neuroznanost (2016.) i istraživanje biokemijskih promjena u dorzalnoj motoričkoj jezgri vagusa u štakorskom modelu Alzheimerove bolesti (2017.) te stipendijom za izvrsnost Grada Zagreba (2017.). Po završetku studija, obavlja liječnički staž u Kliničkom bolničkom centru Sestre milosrdnice. Od 2019. godine zaposlen je kao asistent/HRZZ doktorand na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu u sklopu istraživačkog projekta HRZZ-a „Mehanizmi nutrijentom posredovanih učinaka endogenog GLP-1 na kognitivne i metaboličke poremećaje u eksperimentalnim modelima neurodegenerativnih bolesti“ voditeljice prof. dr. sc. Melite Šalković-Petrišić. Objavio je 36 znanstvenih radova (16 vezanih uz temu disertacije), 5 poglavlja u stručnim knjigama i 1 patent (u procesu prijave). Nagrađen je Nagradom za najboljeg mladog istraživača Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju (2021.) i Državnom nagradom za znanost za najboljeg znanstvenog novaka (područje: biomedicina) (2021.). Osvojio je više nagrada i stipendija te je trenutno suradnik na 6 projekata. Tijekom 2022. godine boravio je u laboratoriju prof. Kristine Endres na Johannes Gutenberg Sveučilištu u Mainzu (Njemačka). Od 2019. radi kao dopinški kontrolor pri Službi za antidoping Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, a od 2022. godine djeluje kao izvršni urednik CMJ-a.