

Neuroprotektivni potencijal moždanog neurotrofnog čimbenika u modelu Alzheimerove bolesti in vitro

Štulić, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:520489>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Katarina Štulić

**Neuroprotektivni potencijal moždanog
neurotrofnog čimbenika u modelu
Alzheimerove bolesti *in vitro***

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Katarina Štulić

**The neuroprotective potential of brain-
derived neurotrophic factor in an *in vitro*
model of Alzheimer's disease**

Master thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj rad je izrađen Laboratoriju za molekularnu neuropsihijatriju na Zavodu za molekularnu medicinu, Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod voditeljstvom dr. sc. Gordane Nedić Erjavec, znanstvene suradnice IRB. Diplomski rad izrađen je u sklopu projekta 'Terapijski potencijal neurosteroida i neurotrofina u demenciji', financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Zahvale

Zahvaljujem mentorici dr. sc. Gordani Nedić Erjavec na pruženoj prilici, posvećenom vremenu i trudu te iskazanom strpljenju. Hvala na svim savjetima i kritikama prilikom izrade rada, omogućili su da u konačnici budem ponosna.

Zahvaljujem dr. Juliji Erhardt na stručnom suvoditeljstvu, angažiranosti i komentarima.

Zahvaljujem dr.sc. Dubravki Švob Štrac koja me uputila dr. sc. Gordani Nedić Erjavec i tako omogućila iskustvo rada pod stručnim mentorstvom, u divnom okruženju cijelog tima laboratorija za molekularnu neuropsihijatriju na IRB-u.

Veliko hvala mojim prijateljima i obitelji.

Hvala Mariji što je moj stup. Hvala što si sa mnom dijelila suze i smijeh.

Hvala Ani za podršku i suosjećanje u svakoj egzistencijalnoj krizi, hvala za svako 'proći ćeš'.

Hvala Andrijani za beskrajnu vjeru u mene, posebno u trenucima kad ni sama nisam vjerovala.

Hvala Srećku na bezuvjetnoj potpori i svakom skuhanom obroku.

Hvala Ivanu, Gusti, Kikiju, Sari i Andrei, hvala i svima koje nisam navela a bili su dio mog života tijekom školovanja i doprinijeli tome da sam tu gdje sam sad.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Neuroprotektivni potencijal moždanog neurotrofnog čimbenika u modelu

Alzheimerove bolesti *in vitro*

Katarina Štulić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Alzheimerova bolest (AB) je neurodegenerativna bolest koju karakterizira izvanstanično nakupljanje amiloidnih plakova i unutarstanično nakupljanje neurofibrilarnih snopića. Moždani neurotrofni čimbenik (BDNF) je najrašireniji neurotrofni čimbenik rasta u središnjem živčanom sustavu. Eksplicira se u hipokampusu, korteksu i bazalnom prednjem mozgu, područjima koja su vitalna za učenje, pamćenje i izvršnu funkciju. Primarna uloga BDNF-a u mozgu je promicanje preživljavanja postmitotskih neurona te rast i diferencijacija novih neurona i sinapsi. Dosadašnja istraživanja ukazuju na ulogu smanjene razine BDNF-a u AB-u gdje su gubitak sinapsi i neurona te oslabljeno pamćenje bitan dio patologije. Beta amiloid ($A\beta$) utječe na razine BDNF-a direktno, inhibicijom proteolitičke konverzije prekursora u konačnu formu te indirektno – interferencijom s aksonalnim transportom. S obzirom na zaštitne učinke BDNF-a na neurotoksičnost izazvanu $A\beta$ u uvjetima *in vitro* i *in vivo*, primjena BDNF-a predstavlja potencijalnu strategiju liječenja AB-a. Cilj ovog rada je ispitati potencijalni učinak BDNF-a u prevenciji stanične smrti, odnosno promicanju preživljenja neurona, primjenom primarne kulture mišjih neurona tretiranih oligomerima $A\beta$ kao *in vitro* modelom AB-a. Rezultati istraživanja potvrđuju neuroprotektivno djelovanje BDNF-a te upućuju na to da njegova primjena smanjuje apoptotsku aktivnost u modelu AB-a *in vitro*.

(74 stranica, 24 slika, 174 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: demencija, moždani neurotrofni čimbenik, oligomeri beta amiloida, primarna kultura kortikalnih neurona miša, vijabilnost, cistotoksičnost, kaspazna aktivnost

Voditelj: Dr. Sc. Gordana Nedić Erjavec, znanstveni suradnik

Suvoditelj: Dr. Sc. Julija Erhardt, viši pred.

Ocjenitelji:

Doc. dr. sc. Julija Erhardt, viši pred., PMF

Izv. prof. dr. sc. Maja Matulić

Prof. dr. sc. Nada Oršolić

Rad prihvaćen: 05.05.2022

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

The neuroprotective potential of brain-derived neurotrophic factor in an *in vitro*
model of Alzheimer's disease

Katarina Štulić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease characterized by extracellular accumulation of amyloid plaques and intracellular accumulation of neurofibrillary tangles. Brain derived neurotrophic factor (BDNF) is the most abundant neurotrophic growth factor in the central nervous system. It is expressed in the hippocampus, cortex and basal forebrain, areas vital for learning, memory and executive function. The primary role of BDNF in the brain is to promote the survival of postmitotic neurons and the growth and differentiation of new neurons and synapses. Previous studies suggest the role of decreased BDNF levels in AD, where synapse and neuron loss and impaired memory are an essential part of the pathology. Amyloid beta ($A\beta$) affects BDNF levels directly, by inhibiting the proteolytic conversion of precursors to the final form, and indirectly by interfering with axonal transport. Given the protective effects of BDNF on neuronal toxicity induced by $A\beta$ *in vitro* and *in vivo*, the use of BDNF represents a potential strategy for the treatment of AD. The aim of this study was to examine the potential effect of BDNF in the prevention of cell death, i.e. promoting the survival of neurons, using a primary culture of mouse cortical neurons treated with $A\beta$ oligomers as an *in vitro* model of AD. The results of the study confirm the neuroprotective effect of BDNF and suggest that its use reduces apoptotic activity in an *in vitro* model of AD.

(74 pages, 24 figures, 174 references, original in: croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: dementia, brain derived neurotrophic factor, amyloid beta oligomers, primary culture of mouse cortical neurons, viability, cytotoxicity, caspase activity

Supervisor: Dr. Sc. Gordana Nedić Erjavec, research associate

Co-supervisor: Dr. Sc. Julija Erhardt, sen.lec.

Reviewers:

Dr. Sc. Julija Erhardt, sen.lec., Faculty of Science

Dr. Sc. Maja Matulić, Assoc. Prof., Faculty of Science

Dr. Sc. Nada Oršolić, Prof., Faculty of Science

Thesis accepted: 05.05.2022

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 DEMENCIJA.....	1
1.1.1. <i>Dijagnostika</i>	2
1.1.2. <i>Blagi kognitivni poremećaj</i>	3
1.1.3. <i>Podjela demencije</i>	5
1.2. ALZHEIMEROVA BOLEST.....	8
1.2.1. <i>Genetska osnova Alzheimerove bolesti</i>	12
1.2.2. <i>Terapijski pristup</i>	14
1.3. MOŽDANI NEUROTROFNI ČIMBENIK.....	14
1.3.1. <i>Moždani neurotrofni čimbenik i Alzheimerova bolest</i>	15
1.3.2. <i>Moždani neurotrofni čimbenik kao tretman u Alzheimerovoj bolesti</i>	19
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	21
3. MATERIJALI I METODE	22
3.1. USPOSTAVLJANJE PRIMARNE KULTURE NEURONA.....	22
3.2. PRIPREMA BETA AMILOID 42 OLIGOMERA.....	25
3.2.1. <i>Mikroskopija atomske sile</i>	25
3.2.2. <i>Denaturirajuća poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE)</i>	26
3.3. USPOSTAVA I OPTIMIZACIJA <i>IN VITRO</i> MODELA ALZHEIMEROVE BOLESTI.....	27
3.3.1. <i>MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol bromid) test</i>	28
3.3.2. <i>ApoTox-Glo™ Triplex Assay</i>	28
3.3.3. <i>® Count & Viability test</i>	29
3.4. TRETMAN <i>IN VITRO</i> MODELA ALZHEIMEROVE BOLESTI MOŽDANIM NEUROTROFNIM ČIMBENIKOM U SVRHU ISPITIVANJA PROTEKTIVNOG UČINKA MOŽDANOG NEUROTROFNOG ČIMBENIKA 33	
3.4.1. <i>Muse® BCL-2 Activation Dual Detection test</i>	33
3.4.2. <i>Ispitivanje kaspazne aktivnosti</i>	35
3.5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	36
4. REZULTATI	37
4.1. PRISUTNOST BETA AMILOID 42 OLIGOMERA.....	37
4.2. UČINAK TRETMANA PRIMARNE KULTURE NEURONA OLIGOMERIMA BETA AMILOIDA 42.....	39

4.2.1.	<i>Vijabilnost stanica nakon tretmana beta amiloid 42 monomerima, oligomerima i polimerima</i>	40
4.2.2.	<i>Vijabilnost stanica nakon tretmana beta amiloid 42 oligomerima u različitim koncentracijama i vremenskim periodima.....</i>	41
4.2.3.	<i>Vijabilnost i citotoksičnost neurona određena ApoTox-Glo™ Triplex testom nakon tretmana beta amiloid 42 oligomerima</i>	43
4.2.4.	<i>Vijabilnost tretmana stanica s beta amiloid 42 oligomerima određena Muse® Count & Viability testom.....</i>	45
4.2.5.	<i>Aktivnost BCL-2 proteina nakon tretmana primarne kulture neurona beta amiloid 42 oligomerima</i>	46
4.3.	UČINAK KOTRETMANA PRIMARNE KULTURE NEURONA OLIGOMERIMA BETA AMILOID 42 I MOŽDANIM NEUROTROFNIM ČIMBENIKOM.....	47
4.3.1.	<i>Vijabilnost stanica nakon kotretmana beta amiloid 42 oligomerima i moždanim neurotrofnim čimbenikom.....</i>	47
4.3.2.	<i>Kaspazna aktivnost neurona uslijed tretmana oligomerima beta amiloida i moždanim neurotrofnim čimbenikom.....</i>	49
5.	RASPRAVA	51
6.	ZAKLJUČAK.....	56
7.	LITERATURA	56
8.	ŽIVOTOPIS.....	75

POPIS KRATICA:

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

APP – prekursor proteina amiloid- β (engl. *Amyloid-beta precursor protein*)

A β – Beta amiloid

BBB – Krvno-moždana barijera (engl. *Blood-Brain barrier*)

BDNF – moždani neurotrofni čimbenik (engl. *Brain derived neurotrophic factor*)

CREB – transkripcijski faktor ovisan o signalnom putu cAMP (engl. *cAMP-response element binding protein*)

DARPP-32 – fosfoprotein 32 reguliran dopaminom i cAMP-om (engl. *Dopamine- and cAMP-Regulated Phosphoprotein*)

DLB – Demencija s Lewyjevim tijelima (engl. *Lewy body dementia*)

FTD – Frontotemporalna demencija (engl. *Frontotemporal dementia*)

GAB1 – protein koj veže GRB2 1 (engl. *GRB2-associated-binding protein 1*)

GSK3 β – kinaza glikogen-sintaze-3 β (engl. *Glycogen synthase kinase-3 β*)

IRS-1 – Supstrat-1 inzulinskog receptora (engl. *Insulin receptor substrate 1*)

LTD – dugoročna depresija (engl. *Long-term depression*)

LTP – dugoročno potenciranje (engl. *Long-term potentiation*)

MCI – blagi kognitivni poremećaj (engl. *Mild cognitive impairment*)

MTT – (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol bromid) test (engl. *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*).

MRI – Strukturna magnetska rezonancija (engl. *Magnetic resonance imaging*)

NMDAR – N-metil-D-aspartat receptora (engl. *N-Methyl-D-Aspartate Receptor*)

PDD – Demencije kod Parkinsonove bolesti (engl. *Parkinson's disease dementia*)

PLC γ – Fosfolipaza C, gama (engl. *Phospholipase C Gamma*)

PP1 – Protein fosfataza 1 (engl. *Protein phosphatase 1*)

proNGF – Prekursor čimbenika rasta živaca (engl. *Pro-nerve growth factor*)

SDS-PAGE – elektroforeza u poliakrilamidnom gelu s natrij dodecil sulfatom (engl. *Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis*).

VaD – Vaskularna demencija (engl. *Vascular dementia*)

1. UVOD

1.1 Demencija

Demenciju kao klinički sindrom karakterizira globalno kognitivno oštećenje, koje predstavlja pad u odnosu na prijašnju razinu funkcioniranja, a povezano je s oštećenjem funkcionalnih sposobnosti te u mnogim slučajevima praćeno poremećajima u ponašanju i psihijatrijskim poremećajima (National Collaborating Centre for Mental Health, 2007). Prema Međunarodnoj klasifikaciji bolesti (ICD-10) (World Health Organization, 1992) demencija se definira kao sindrom razvijen zbog bolesti mozga, obično kronične ili progresivne prirode, u kojem postoji poremećaj višestrukih viših kortikalnih funkcija, uključujući pamćenje, mišljenje, orijentaciju, razumijevanje, proračun, sposobnost učenja, jezik i prosuđivanje. Svijest nije oštećena. Obično su popraćeni poremećaji kognitivnih funkcija, a povremeno im prethodi pogoršanje emocionalne kontrole, društvenog ponašanja ili motivacije (National Collaborating Centre for Mental Health, 2007).

Procjenjuje se da je trenutno u svijetu od demencije oboljelo oko 24 milijuna ljudi i predviđa se da će se broj oboljelih udvostručavati svakih 20 godina. U svijetu je prevalencija demencije u osoba starijih od 60 godina 3,9%, sa značajnim regionalnim varijacijama pri čemu je prevalencija niža u zemljama u razvoju (Calderon-Garciduenas i Duyckaerts, 2018).

Brojna su stanja koja uzrokuju simptome demencije. Alzheimerova bolest (AB) čini oko 60% svih slučajeva, dok drugi česti uzroci kod starijih ljudi uključuju cerebrovaskularnu bolest (vaskularna demencija (VaD) (15-20% slučajeva) i demenciju s Lewyjevim tijelima (DLB) (15-20% slučajeva). U slučajevima ranog početka razvoja demencije, frontotemporalna demencija (FTD) je, nakon AB-a, drugi najčešći uzrok. Postoje brojni drugi uzroci, uključujući druge degenerativne bolesti, kao primjerice Huntingtonova bolest, prionske bolesti (Creutzfeldt-Jakobova bolest), demencija uzrokovana HIV-om i nekoliko toksičnih i metaboličkih poremećaja (npr. demencija povezana s alkoholom) (National Collaborating Centre for Mental Health, 2007). Demencija se također razvija kod 30-70% osoba s Parkinsonovom bolešću, ovisno o trajanju i dobi (Aarsland i sur., 2003). Iako se većina demencija u odraslih pripisuje AB-u, uzrok temeljnih patoloških procesa i dalje je u mnogim slučajevima nepoznat (Sacuiu, 2016).

Demencija s početkom u mladosti se razvije prije 65. godine (presenilna demencija), dok se termin demencije s kasnim početkom odnosi na one slučajeve kada se bolest razvija nakon 65. godine (senilna demencija). Etiologija i karakteristike osoba s demencijom razlikuju se između mladih i kasno nastalih slučajeva pa tako navedena razlika ima kliničku važnost (Harvey i sur., 2003).

1.1.1. Dijagnostika

Dijagnoza demencije ovisi o ozbiljnosti funkcionalnog oštećenja na koju ukazuje povijest i stupanj kognitivnog oštećenja utvrđen ispitivanjem. Anamneza se treba usredotočiti na specifične kognitivne i bihevioralne promjene kod bolesnika, njihovu evoluciju tijekom vremena i sve simptome koji upućuju na postojeće medicinske, neurološke ili psihijatrijske bolesti (Geldmacher i Whitehouse, 1996). Potrebno je razmotriti receptne i bezreceptne lijekove, ako su kozumirani, kao potencijalne uzroke kognitivnog oštećenja. Često korišteni lijekovi koji mogu ometati kogniciju uključuju analgetike, antikolinergike, antihipertenzive, psihotropne i sedativno-hipnotičke agense (Geldmacher i Whitehouse, 1996).

Trenutni temeljni klinički kriteriji za demenciju, prema Dijagnostičkom i statističkom priručniku za mentalne poremećaje (DSM-5) (American Psychiatric Association, 2013) zahtijevaju značajan kognitivni pad najmanje jedne kognitivne domene. Kognitivni pad mora bitno utjecati na neovisnost u svakodnevnoj aktivnosti i ne smije biti uzrokovan drugim medicinskim stanjem koje se može identificirati (American Psychiatric Association, 2013). Druga stanja koja mogu izazvati kognitivna oštećenja isključuju se krvnim pretragama. (National Collaborating Centre for Mental Health, 2007). Klinički kriteriji za AB zahtijevaju karakterističan početak simptomatologije demencije predstavljene padom u najmanje dvije kognitivne domene, od kojih bi jedna trebala biti učenje i pamćenje, uz postupan razvoj simptoma i odsutnost drugih prepoznatljivih uzroka kognitivnog pada (McKhann i sur., 2011; American Psychiatric Association, 2013).

U dijagnostici se koriste kognitivni i neurološki testovi za procjenu razmišljanja i fizičkog funkcioniranja. To uključuje procjene pamćenja, rješavanje problema, jezične vještine i matematičke vještine, kao i ravnotežu, senzorni odgovor i reflekse (Feldman i sur., 2008).

Skeniranje mozga omogućuje identificiranje moždanih udara, tumora i drugih problema koji mogu uzrokovati demenciju. Skeniranje također identificira promjene u strukturi i funkciji mozga. Najčešća skeniranja su kompjuterizirana tomografija (CT), koja koristi X-zrake za proizvodnju

slika mozga i drugih organa, magnetska rezonancija (MRI), koja koristi magnetska polja i radio valove za proizvodnju detaljnih slika tjelesnih struktura, uključujući tkiva, organe, kosti i živce te pozitronska emisijska tomografija (PET), koja koristi zračenje za dobivanje slika moždane aktivnosti (Feldman i sur., 2008).

Psihijatrijska evaluacija bolesnika utvrđuje je li demencija uzrokovana ili pridonosi simptomima depresijom ili nekim drugim mentalnim poremećajem.

Dostupni su i genetski testovi, prikladni za slučajeve kada obiteljska anamneza sugerira AB a posebno rani početak bolesti. Testovi se usmjeravaju na specifične mutacije na kromosomima 1, 14 i 21 (Geldmacher i Whitehouse, 1996).

Uz nekoliko krvnih pretraga u razvoju, dostupan je krvni test za mjerenje razine beta amiloida (A β), proteina koji se prekomjerno nakuplja kod ljudi s AB-om. Međutim, dostupnost ovih dijagnostičkih testova za AB i srodne demencije još uvijek je ograničena (Feldman i sur., 2008).

1.1.2. Blagi kognitivni poremećaj

Većina ljudi tijekom životnog vijeka prolazi kroz postupni kognitivni pad, tipično vezan uz pamćenje. Iako može uzrokovati smetnje, pad je obično manji i ne utječe na sposobnost svakodnevnog funkcioniranja. Kad je kognitivni pad značajniji od razine uobičajene za starenje, radi se o blagom kognitivnom oštećenju (MCI) (Petersen i sur., 2009). MCI predstavlja srednje stanje kognitivne funkcije između promjena uočenih u starenju i onih koje ispunjavaju kriterije za demenciju i često AB (Petersen i sur., 1999).

MCI se klasificira u dvije podvrste, amnestički i neamnestički tip (Petersen, 2004). Amnestički MCI je klinički značajno oštećenje pamćenja koje ne zadovoljava kriterije za demenciju. Uz prisutnost sve većeg zaborava, drugi kognitivni kapaciteti, kao što su izvršna funkcija, korištenje jezika i vizualno-prostorne vještine, su relativno očuvane, a funkcionalne aktivnosti su netaknute. Neamnestički MCI karakterizira suptilni pad funkcija koje nisu povezane s pamćenjem, koje utječu na pozornost, korištenje jezika ili vizualno-prostorne vještine (Petersen, 2011).

Neamnestički tip MCI vjerojatno je rjeđi od amnestičkog tipa i može biti preteča demencija koje nisu povezane s AB-om (Molano i sur., 2010).

Procijenjena prevalencija MCI-a u populaciji kreće se od 10 do 20% kod osoba starijih od 65 godina (Lopez i sur., 2003; Busse i sur., 2006; Di Carlo i sur., 2007; Manly i sur., 2008; Plassman i sur., 2009). Nekoliko longitudinalnih studija je pokazalo da većina osoba s MCI-em ima povećani rizik za razvoj demencije (Lopez i sur., 2003; Busse i sur., 2006; Manly i sur., 2008; Plassman i sur., 2009), a opća stopa progresije se procjenjuje na 10% godišnje (Petersen, 2011). U kliničkim ispitivanjima koja uključuju bolesnike s amnestičnim MCI-em, više od 90% onih s progresijom u demenciju su imali kliničke znakove AB-a (Petersen i sur., 2005). Stupanj kognitivnog oštećenja pri prezentaciji je klinički prediktor progresije, koji će vjerojatno biti brži u bolesnika s većim oštećenjem na početku (Dickerson i sur., 2007; Visser i sur., 2009).

Najopsežnije proučavano sredstvo za predviđanje napredovanja MCI-a do demencije je MRI (Apostolova i sur., 2007; Jack i sur., 2008). Studija je pokazala da među osobama s amnestičkim MCI-em, pacijenti s volumetrijskim mjerenjem hipokampusa koji je pao na ili ispod 25. percentila za dob i spol, imaju dva do tri puta veći rizik od progresije demencije tijekom razdoblja od 2 godine od osoba čije su hipokampalne mjere bile na ili iznad 75. percentila (Slika 1.) (Jack i sur., 2010). Veći ventrikularni volumeni također sugeriraju progresiju demencije (McEvoy i sur., 2009).



Slika 1. Magnetska rezonancija mozga koja prikazuje razliku hipokampusa kod pacijenta s normalnom kognicijom (A), blagim kognitivnim poremećajem (B) i Alzheimerovom bolesti (C). (Preuzeto iz: Petersen, 2011).

Funkcionalne tehnike snimanja, kao što je pozitronska emisijska tomografija 18F-fluorodeoksiglukoze (18FDG-PET), koje daju indeks sinaptičkog integriteta, također su ocijenjeni kao zadovoljavajući prediktori progresije u demenciju (Petersen, 2011). Pacijenti s hipometabolizmom u temporalnim i parijetalnim regijama mozga na 18FDG-PET, imaju veći rizik za brzo napredovanje od blagog kognitivnog oštećenja do AB-a u usporedbi s pacijentima bez ovog obrasca (Chételat i sur., 2003; Drzezga i sur., 2005; Landau i sur., 2010).

Švedska studija pokazala je da ispitanici s MCI-em kod kojih je zabilježena niska razina beta amiloida (A β) 42 i povišena razina tau proteina u cerebrospinalnoj tekućini, imaju značajno veći rizik progresije u AB od ispitanika bez ovoga profila. Sličan relativni rizik progresije bio je povezan s niskim omjerom A β 42 prema tau proteinu u cerebrospinalnoj tekućini (Hansson i sur., 2010). Korištenje molekularnog snimanja, posebice amiloidnih plakova u mozgu, također se smatra mogućim pristupom procjeni rizika (Klunk i sur., 2004; Engler i sur., 2006; Forsberg i sur., 2008).

1.1.3. Podjela demencije

Budući da postoji više od 75 bolesti koje uzrokuju znakove i simptome demencije, diferencijalna dijagnoza može biti opsežna. Koristan način klasifikacije demencija je podjela na tri kategorije: reverzibilna, neprogresivna ili progresivna (Rabins, 2008).

Postoji niz potencijalno reverzibilnih uzroka demencije. Najčešće su to lijekovi, lezije koje zauzimaju prostor, toksična stanja, metaboličke i endokrine abnormalnosti (vitamin B12, nedostatak folata i hipotireoza) te psihijatrijski poremećaji, a osobito depresija. Razlikovanje između depresije i demencije može biti izazovno i ima važne implikacije za liječenje. Ostala navedena stanja nisu uobičajeni uzroci demencije (National Collaborating Centre for Mental Health, 2007). Reverzibilni uzroci čine oko 1–2% slučajeva koji se prikazuju radi evaluacije. Međutim, mnogi potencijalno reverzibilni uzroci ne poboljšavaju se nakon liječenja. Neprogresivne demencije uključuju one koje prate traumu glave i moždani udar, dok progresivno demencije uključuju one sa čestim uzrocima (npr. AB) i onih s rjeđim (na primjer, Creutzfeldt-Jakobova bolest) (Yadav, 2012).

1.1.3.1. *Vaskularna demencija*

Vaskularna demencija (VaD) je trajno kognitivno oštećenje nastalo kao posljedica cerebrovaskularne bolesti. Uzrokovana je nedostatnom količinom kisika koji dopire do stanica u mozgu što dovodi do oštećenja stanica i smanjene moždane aktivnosti. Najčešći simptom VaD-a je značajna sporost misli uzrokovana degenerativnim stanjem koje se pogoršava kako vrijeme prolazi. Iz tog razloga, mnogi ljudi s vaskularnom demencijom zahtijevaju 24-satnu njegu. Prevalencija vaskularne demencije varira među populacijama, ali čini između 10-20% svih slučajeva demencije (Geldmacher i Whitehouse, 1996).

VaD se dijeli na kortikalni i subkortikalni (ili frontalno-subkortikalni) sindrom (Stuss i Cummings 1990; Wolfe i sur., 1990). Kortikalnu VaD karakteriziraju ponovljeni aterotrombotski ili kardioembolijski moždani udari, očiti senzomotori deficiti, teški afazni poremećaji kada su prisutni i nagli početak kognitivnog pada (Erkininutii, 1987). Subkortikalna VaD povezana je s izoliranim piramidalnim nedostacima, depresijom ili emocionalnom nestabilnošću i frontalnim bihevioralnim sindromom čiji simptomi uključuju blago oštećenje pamćenja, dezorijentaciju, loš odgovor na nova iskustva, ograničene interese, smanjenu sposobnost stvaranja asocijacija, nepažnju, poteškoće u prelasku s jedne ideje na drugu i ustrajnost (Morris, 1996).

1.1.3.2. *Frontotemporalna demencija*

Frontotemporalna demencija je vrsta demencije povezana s degenreacijom frontalnih i temporalnih režnjeva mozga (National Collaborating Centre for Mental Health, 2007). Klasificirana je u tri kliničke varijante. Jedna je bihevioralna varijanta FTD-a, povezana s ranim bihevioralnim i izvršnim deficitima, a druga primarna progresivna afazija koja može biti manifestirana kao nefluentna varijanta s progresivnim nedostacima u govoru, gramatici i izgovoru riječi ili kao semantička varijanta koja je progresivni poremećaj semantičkog znanja i imenovanja (Bang i Spina, 2015). Prostorne vještine i pamćenje u FTD-u ostaju netaknuti. Postoji jaka genetska komponenta bolesti i često se proteže u obiteljima (National Collaborating Centre for Mental Health, 2007). Poremećaj je treći oblik demencije po učestalosti u svim dobnim skupinama, poslije AB-a i demencija Lewyjevih tjelešaca (DLB), i vodeći je tip rane demencije (Vieira i sur., 2013).

Kako FTD napreduje i početno žarišna degeneracija postaje više difuzna i širi se zahvaćajući velike regije u frontalnim i temporalnim režnjevima, simptomi triju kliničkih varijanti mogu konvergirati. S vremenom oboljeli razvijaju globalno kognitivno oštećenje i motoričke nedostatke, uključujući parkinsonizam i, u nekim slučajevima, bolest motornih neurona. Bolesnici u završnoj fazi bolesti otežano jedu, gutaju i kreću se. Smrt obično nastupa oko 8 godina nakon pojave simptoma i obično je uzrokovana upalom pluća ili drugim sekundarnim infekcijama (Bang i Spina, 2015).

1.1.3.3. *Demencija Lewyjevih tjelešaca*

Središnja karakteristika DLB-a je progresivnost demencije s izraženim oštećenjima vida, funkcija pažnje i izvršnim funkcijama kao odraz kombinacije kortikalnih i subkortikalnih oštećenja. Kod DLB-a poremećaji u bolesnikovoj razini budnosti i pažnje su obično očiti i često ozbiljni, a kognitivni deficiti ne uključuju uvijek ozbiljan gubitak pamćenja (McKeith i sur., 1996). Fluktuacije u kognitivnim funkcijama, mogu varirati tijekom minuta, sati ili dana, a javljaju se u 50–75% slučajeva bolesnika (McKeith, 2007). Fluktuirajuća spoznaja, ponavljajuće vizualne halucinacije i ekstrapiramidni motorički simptomi su osnovne značajke po kojem se DLB klinički prepoznaje (McKeith i sur., 1996). Teška autonomna disfunkcija može se javiti u ranoj fazi kliničkog tijeka, izazivajući ortostatsku hipotenziju, neurokardiovaskularnu nestabilnost, urinarnu inkontinenciju, zatvor i impotenciju kao i poteškoće s jelom i gutanjem (Kuzuhara i Yoshimura, 1993; Del-Ser i sur., 1996; Horimoto i sur., 2003; McKeith, 2003).

Profil neuropsiholoških oštećenja u bolesnika s DLB-om razlikuje se od AB-a i drugih sindroma demencije zbog zahvaćenosti kortikalnih i subkortikalnih putova i relativne poštode hipokampusa (Collerton i sur., 2003). Epizodično prisjećanje i prepoznavanje mogu se relativno sačuvati u ranim stadijima, za razliku od AB-a (Calderon i sur., 2001; Colerton i sur., 2003). Bolesnici s DLB-om imaju bolje rezultate od onih s AB-om na testovima verbalnog pamćenja (McKeith i sur., 1992), ali lošije na vizualno-prostornim zadacima (Walker i sur., 1997) i testovima pozornosti (Sahgal i sur., 1992).

VaD i DLB često se javljaju kod osoba s drugim teškim bolestima (kao što su moždani udar i Parkinsonova bolest). Također, obdukcijom mozga starijih ljudi utvrđeni su i mješoviti slučajevi demencije (na primjer, AB i VaD, te AB i DLB). U navedenim situacijama svaka od različitih patologija može pridonijeti kliničkom izražavanju demencije (Snowdon i sur., 1997).

1.1.3.4. Demencija uzrokovana Alzheimerovom bolešću

Demencija zbog AB-a obično se predstavlja kao pad kognitivnog funkcioniranja. Početni deficiti pamćenja ograničeni su na kratkoročno pamćenje i otežano učenje novih informacija. Navedene promjene se isprva mogu pojaviti kao benigni zaborav, uobičajeno stanje sa starenjem (Scaie i Willis, 1993; Gazzaley i sur., 2005), međutim, pad pamćenja zbog AB-a je progresivan i nepovratan (American Psychiatric Association, 2013). Napredovanje je sporo i postupno zahvaća druga područja kognicije kao što su jezična, vizualno-prostorna i izvršna sposobnost. Dijagnoza demencije potrebna je kao prvi korak u dijagnozi demencije povezane s AB-om (Sacuiu, 2016).

Gubitak pamćenja i otežano učenje novih informacija odražavaju poremećaj funkcije medijalnog temporalnog režnja i hipokampusa koji su primarno žarište patoloških promjena. Kasnije u bolesti postaju zahvaćene druge, više, kortikalne funkcije te se uočavaju poremećaji ponašanja i psihijatrijski poremećaji. Takvi simptomi obično uključuju depresiju, apatiju, agitaciju, dezinhibiciju, psihozu, agresiju, inkontinenciju i promijenjene prehrambene navike. Tijekom bolesti mogu postojati kratki platoi, ali pad je prilično dosljedan, s tendencijom povećanja ili ubrzavanja (National Collaborating Centre for Mental Health, 2007).

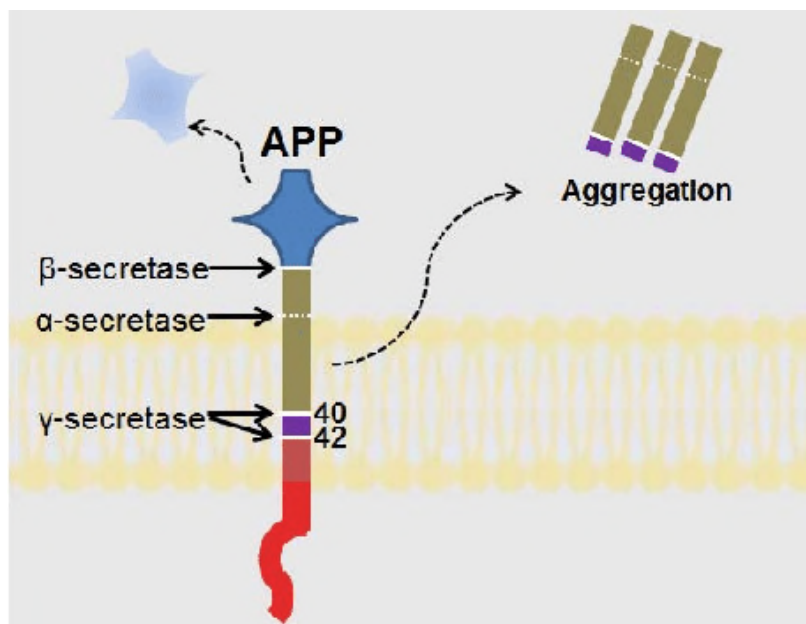
1.2. Alzheimerova bolest

Neuropatološka obilježja AB-a su izvanstanični amiloidni plakovi u mozgu, često okruženi distrofičnim živčanim vlaknima, i unutarstanični neurofibrilarni snopići. Navedena patologija često je popraćena prisutnošću reaktivne mikroglije i gubitkom neurona, bijele tvari i sinapsi. Etiološki mehanizmi koji su u osnovi neuropatoloških promjena u AB-u ostaju nejasni, ali vjerojatno su pod utjecajem i okolišnih i genetskih faktora (Reitz i sur., 2011).

Plakovi su sferne mikroskopske lezije koje imaju jezgru izvanstaničnog beta amiloida ($A\beta$) okruženu povećanim aksonalnim završecima (Slika 3.). Peptid $A\beta$ potječe iz transmembranskog proteina poznatog kao prekursor proteina amiloid- β (APP). APP je uključen u rast neurona, preživljavanje i popravak nakon ozljede (Priller i sur., 2006). U stanici može biti procesiran kroz dva kompetitivna puta, α -sekretaznim ili β -sekretaznim. Cijepanjem APP-a pomoću enzima α -sekretaza nastaje velika topljiva α -APP domena ($sAPP\alpha$) i C-terminalni fragment koji sadrži P3 s 83 ostatka. Njegovim daljnjim cijepanjem pomoću enzima γ -sekretaza oslobađa se fragment P3

koji je netoksičan (Nunan i Small, 2000). S druge strane, cijepanje APP-a β -sekretazom na N kraju daje topljivi oblik APP-a (sAPP β) i C-terminalni fragment APP-a s 99 ostataka (C99) kojeg dalje može cijepati γ -sekretaza pri čemu nastaje beta amiloid s 42 (A β 42) i/ili 40 (A β 40) ostataka (Haass i Selkoe, 2007) (Slika 2.).

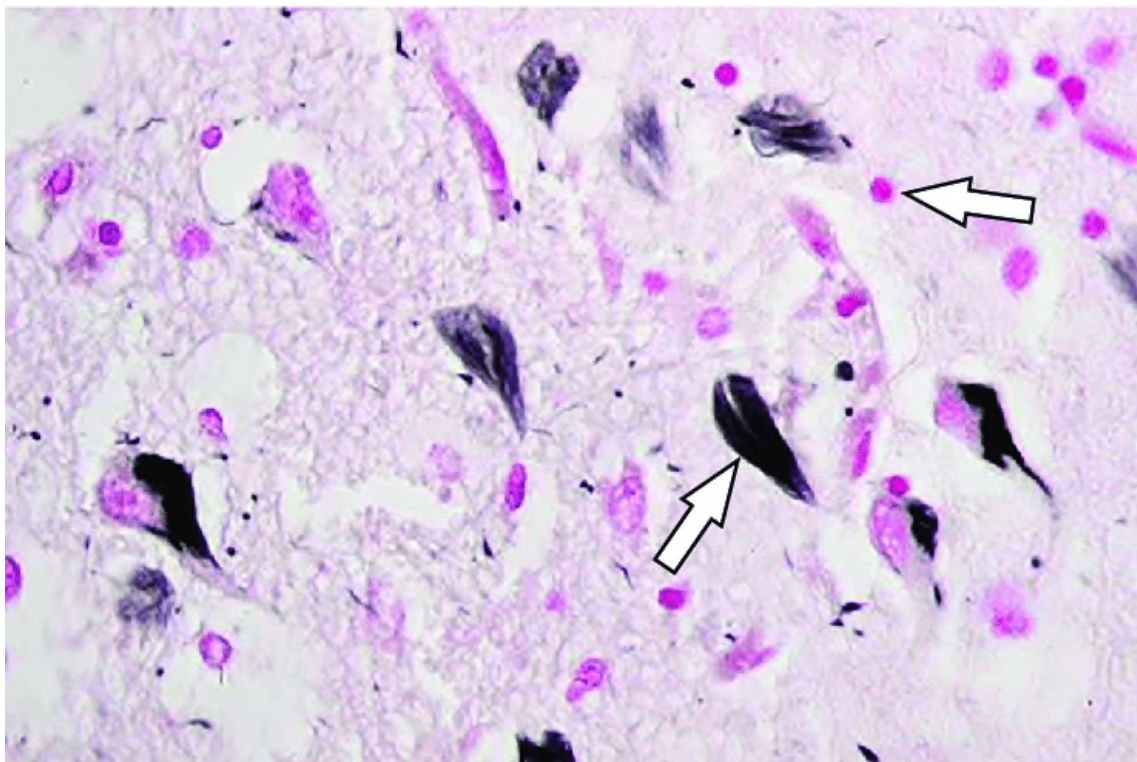
A β 42 je manje topiv u odnosu na A β 40 i spontano se agregira (Calderon-Garciduenas i Duyckaerts, 2018). Agregati uzrokuju neuronsku toksičnost. Do taloženja amiloida dolazi oko meningealnih i cerebralnih žila i sive tvari kod AB-a. Naslage sive tvari su multifokalne i spajaju se u strukture koje se nazivaju plakovi (Kumar i sur., 2021). Neka istraživanja pokazuju da A β doprinosi ranoj dendritskoj i sinaptičkoj ozljedi, a time i neuronskoj disfunkciji. Osim izravnog utjecaja, agregati A β aktiviraju mikrogliju i potiču proizvodnju upalnih medijatora kao što su dušikov oksid (NO), reaktivne kisikove vrste (ROS), faktor tumorske nekroze (TNF)- α , interleukine (IL-1 β , IL6, IL-18) i prostaglandine (npr. prostaglandin E2), koji potiču smrt neurona (Kitazawa i sur., 2004).



Slika 2. Obrada prekursorskog proteina amiloid- β (APP). Cijepanjem β -sekretazom i naknadnim cijepanjem γ -sekretazom nastaju peptidi A β , duljine 40 do 42 aminokiseline. A β 42 je skloniji agregaciji i stvaranju plaka. (Preuzeto iz: Davis i Couch, 2014).

Neurofibrilarni snopići su fibrilarne intracitoplazmatske strukture u neuronima koje formira protein tau (Slika 3.). Tau je fosfoprotein kodiran genom *MAPT*, smještenim na kromosomu 17q21 (Calderon-Garciduenas i Duyckaerts, 2018), a primarna funkcija mu je stabilizacija aksonskih mikrotubula. Mikrotubuli prolaze duž neuronskih aksona i bitni su za unutarstanični transport. Kod

AB-a, zbog agregacije izvanstaničnog A β , dolazi do hiperfosforilacije proteina tau koji je u toj formi netopljiv. Navedeno uzrokuje stvaranje agregata proteina tau koji tvore upletene uparene spiralne filamente, neurofibrilarne snopiće, koji se talože unutar neurona. Prvo se javljaju u hipokampusu, a zatim u cijeloj moždanoj kori (Kumar i sur., 2021).



Slika 3. Amiloidni plakovi (ružičasto) i neurofibrilarni snopići (crno) u moždanom tkivu Alzheimerove bolesti. (preuzeto iz: Zafeiris i sur., 2018).

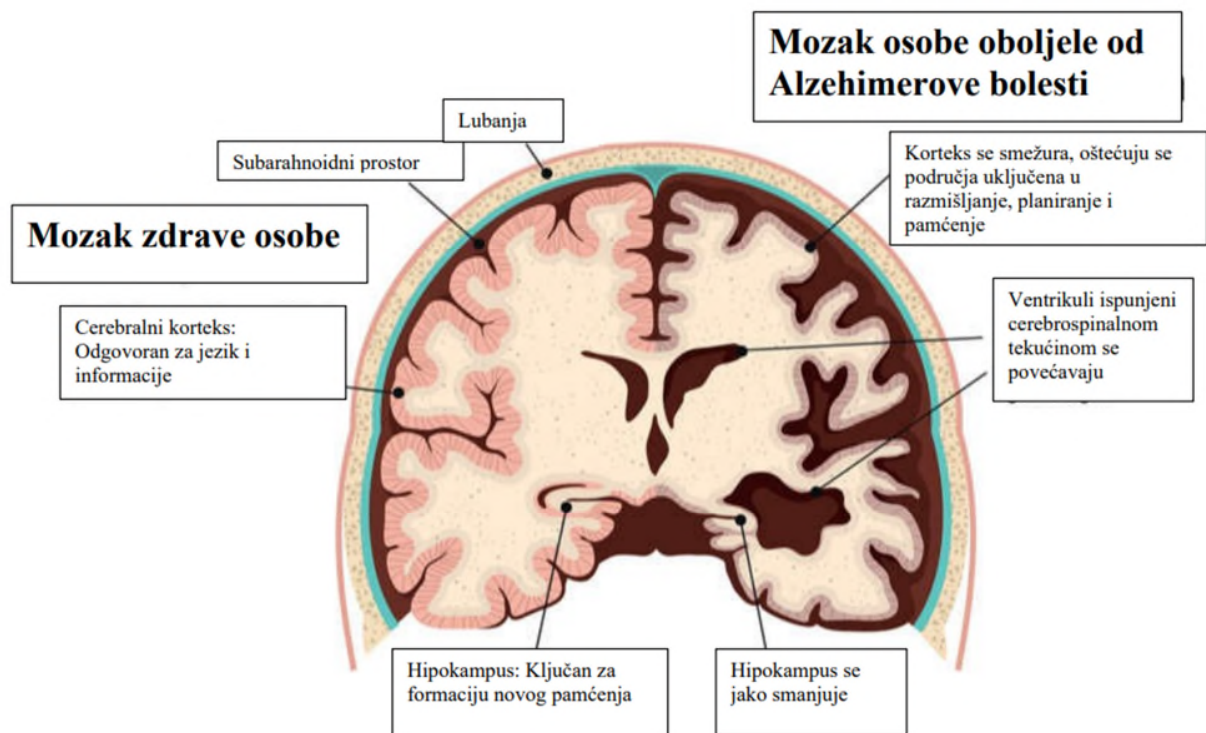
Gubitak stabilizacije mikrotubula dovodi do patološkog poremećaja strukturne i regulacijske funkcije citoskeleta, što ugrožava transport aksonom i time doprinosi sinaptičkoj disfunkciji i neurodegeneraciji (Roy i sur., 2005; Trojanowski i sur., 2005).

Prisutnost A β plakova i neurofibrilarnih snopića u mozgu aktivira upalne stanice (astrocite i mikrogliju) i utječe na razine pro- i protuupalnih medijatora uključujući citokine i kemokine. Aktivacija mikroglije, astrocita, makrofaga i limfocita rezultira oslobađanjem upalnih medijatora kao što su citokini, kemokini, neurotransmiteri i ROS (Tansey i sur., 2007), što dovodi do novačenja monocita i limfocita kroz krvno-moždanu barijeru (BBB) (Lossinsky i Shivers, 2004;

Taupin, 2008) kao i aktivacije dodatne mikroglije te promicanja njihove proliferacije, što rezultira daljnjim oslobađanjem više upalnih čimbenika (Das i Basu, 2008). Neuroinflamacija doprinosi napretku AB-a ubrzavajući tijek bolesti (Young-Jung, 2010).

Akumulacija A β u korteksu ili neurofibrilarnim snopićima može godinama prethoditi inicijalnim simptomima AB-a. Nakon te pretkliničke faze AB-a, klinički se znakovi mogu podijeliti na dvije skupine: amnestički sindrom (vezano za hipokampalne lezije) i tzv. žarišne znakove (uzrokovane ograničenim lezijama u neokorteksu, odgovorne za vizualnu agnoziju ili progresivnu afaziju). Razlika je napravljena prema neuropatologiji, između slučajeva s velikom akumulacijom proteina tau u hipokampusu u odnosu na akumulaciju u neokorteksu (limbički-predominantni tip) i slučajeva kod kojih je akumulacija tau u hipokampusu blaža u odnosu na tau patologiju u neokorteksu (Murray i sur., 2011). Najčešće, neuropatološki tip ovisi o dobi početka razvoja bolesti (Janocko i sur., 2012). Limbički predominantni tip češći je u starijih osoba, dok se hipokampalni tip uglavnom vidi kod mladih bolesnika sa žarišnim početkom (Calderon-Garciduenas i Duyckaerts, 2018).

Atrofija uključuje područja zahvaćena tau patologijom i potrebne su godine za njezin razvoj. Većina atrofija su regije koje su prvo zahvaćene tau patologijom, kao što je entorinalni korteks, hipokampus i amigdala (Slika 4.). Postoji jaka korelacija između gubitka neurona i atrofije u hipokampusu i smanjenja debljine i duljine kortikalne vrpce (Calderon-Garciduenas i Duyckaerts, 2018). Studije MRI-em pokazuju da je forniks, eferentni put hipokampusa, rano zahvaćen. U obiteljskim slučajevima postoji i atrofija cingulumata što je jedan od najranijih znakova (Cash i sur., 2013). Promjene koje zahvaćaju *corpus callosum* su manje izražene. Bazalni gangliji i mali mozak su makroskopski normalni, dok je u moždanom deblu prisutna depigmentacija *locus coeruleus*-a (Calderon-Garciduenas i Duyckaerts, 2018).



Slika 4. Razlika između zdravog mozga i mozga zahvaćenog promjenama uslijed Alzheimerove bolesti (Preuzeto i prilagođeno iz: Dan i sur., 2021).

1.2.1. Genetska osnova Alzheimerove bolesti

Alzheimerova bolest je obično sporadična i javlja se u starijih osoba (AB s kasnim početkom). Rijetko je genetski naslijeđen i tada se javlja rano (AB s ranim početkom), prije 60 godina starosti (Calderon-Garciduenas i Duyckaerts, 2018).

U slučaju kad se nasljeđuje kao autosomalno dominantni poremećaj, oblik bolesti je povezan s mutacijama u 3 gena: gen za AAP na kromosomu 21q21.3, gen za presenilin1 (PSEN1) na kromosomu 14q24.3 i presenilin 2 (PSEN2) na kromosomu 1q31-q42. Mutacije gena *APP* mogu dovesti do povećanog stvaranja i agregacije A β (Kumar i sur., 2021). Alzheimerova bolest u trisomiji 21. kromosoma se objašnjava prisutnošću tri gena *APP* (Calderon-Garciduenas i Duyckaerts, 2018). Mutacije gena *APP* čine manje od 0,1% slučajeva AB-a. Većina dominantno nasljedivih pogrešnih (engl. *missense*) mutacija gena *APP* u AB-u utječe na procesiranje kodiranog proteina, budući da su smještene u ili blizu egzona koji kodiraju A β (egzoni 16 i 17) (Alzheimer

Disease Mutation Database). Osim dominantnih mutacija, spektar mutacija gena *APP* proteže se na još dvije recesivne mutacije, kao i duplikacije lokusa *APP*, što ukazuje na važnost doze gena *APP* u AB-u (Alzheimer Disease Mutation Database).

Mutacije *PSEN1* i *PSEN2* dovode do agregacije A β ometajući procesiranje γ -sekretaze, budući da su presenilini funkcionalno uključeni u proteolitičko cijepanje APP-a posredovano γ -sekretazom (De Strooper i sur., 1998.). Većinom se radi o supstitucijama, iako su prisutne i male delecije i insercije. Mutacije u *PSEN1* i *PSEN2* utječu na cijepanje i uzrokuju povećanje omjera A β 42 : A β 40 (Reitz i sur., 2011). Mutacije u navedena 3 gena odgovorne su za oko 5% do 10% svih i većinu slučajeva ranog AB-a (Kumar i sur., 2021).

Sva tri navedena gena podržavaju amiloidnu teoriju prema kojoj su neurodegenerativni procesi u AB-u posljedica neravnoteže između proizvodnje peptida A β i njegovog uklanjanja što sugerira da su i drugi geni uključeni u navedene puteve također potencijalni čimbenici rizika za ovu bolest (Reitz i sur., 2011).

Lipidni transporter apolipoprotein E (ApoE) ima tri izoforme, APOE2, APOE3, APOE4, kodirane odgovarajućim alelima (*APOE* ϵ 2, *APOE* ϵ 3, *APOE* ϵ 4). Pritom je alel *APOE* ϵ 4 vrlo značajan čimbenik rizika za razvoj AB-a (Calderon-Garciduenas i Duyckaerts, 2018). Prisutnost jednog alela *APOE* ϵ 4 ne dovodi uvijek do AB-a, ali među nosiocima jednog alela *APOE* ϵ 4, oko 50% ima AB. U slučaju prisutnosti dva alela, 90% razvije AB. Također, svaki alel *APOE* ϵ 4 snizuje dob početka bolesti (Kumar i sur., 2021).

Osim *APOE* ϵ 4, cjelogenomske studije povezanosti su identificirale genetske varijacije na više od 20 lokusa povezanih s AB-om s kasnim razvojem, međutim s malim učinkom na rizik od AB-a (Chouraki i Seshadri, 2014). Somatske mutacije koje se javljaju u normalnom starenju potencijalno također doprinose neurodegeneraciji (Calero et al., 2015). U obiteljskim i sporadičnim oblicima AB-a pronađene su varijante gena za sortilinski receptor (SORT1) koji je neophodan za prijenos APP-a s površine stanice u kompleks golgi-endoplazmatski retikulum (Nicolas i sur., 2018). Također, obiteljska anamneza demencije znatno pospješuje rizik. Srodnost u prvom koljenu s osobom oboljelom od AB-a povećava rizik od razvoja bolesti za 10% do 30%. Pojedinci s 2 ili više braće i sestara s kasnom pojavom AB-a imaju 3 puta povećan rizik od obolijevanja u usporedbi s općom populacijom (Tong i sur., 1865; Nicolas i sur., 2018; Liljegen i sur., 2018).

Uz starost, kao najvažniji negenetski čimbenik rizika, povećanom riziku doprinose i traumatske ozljede glave, depresija, kardiovaskularne i cerebrovaskularne bolesti, viša dob roditelja, pušenje, povećane razine homocisteina. Suprotno tome, visoko obrazovanje, korištenje estrogena kod žena, korištenje protuupalnih sredstava, slobodne aktivnosti poput čitanja ili sviranja glazbenih instrumenata, zdrava prehrana i redovita aerobna tjelovježba smanjuju rizik od AB-a (Kumar i sur., 2021).

1.2.2. Terapijski pristup

Za liječenje AB-a su odobrene dvije klase lijekova, inhibitori acetilkolinesteraze (AChEI) te memantin, antagonist receptora N-metil-D-aspartata (NMDA). Njihovi terapijski kognitivni i funkcionalni učinci su simptomatski, a izazivaju gastrointestinalne nuspojave te postoji rizik bradikardije i srčanog zastoja. Memantin je antagonist NMDA receptora niskog do umjerenog afiniteta koji se koristi kao dodatak tekućoj terapiji pomoću AChEI, a glavne nuspojave su zbuñjenost i vrtoglavica (Apostolova, 2016).

Većina trenutnih kliničkih ispitivanja fokusirana je na izravno djelovanje na patološku kaskadu u AB-u. Trenutni glavni naponi usmjereni su na pasivnu imunizaciju, tj. infuziju antitijela, kao i na ometanje proizvodnje i polimerizacije peptida A β i tau (Apostolova, 2016).

1.3. Moždani neurotrofni čimbenik

Moždani neurotrofni čimbenik (BDNF), kodiran genom *BDNF*, kod ljudi je smješten na 11. kromosomu i član je obitelji neurotrofinskih čimbenika rasta (Maisonpierre, 1991). Neurotrofini dijele prepoznatljivu trodimenzionalnu strukturu koja sadrži dva para antiparalelnih b-lanaca i cisteinske ostatke u motivu cistinskog čvora (Binder i Schafman, 2004). Sintetiziraju se kao pro-neurotrofini, a prohormon konvertaza cijepa pro-neurotrofine do zrelog neurotrofina (Chao i Bothwell, 2002). Pro-neurotrofini često imaju biološke učinke koji su suprotni onima zrelih neurotrofina. Stoga, proteolitičko cijepanje pro-neurotrofina predstavlja mehanizam koji kontrolira smjer djelovanja neurotrofina (Lu, 2005). Neurotrofini se vežu na dva tipa receptora: porodicu tropomiozin-receptora (Trk) i pan neurotrofinski receptor (p75NTR). Pro-neurotrofini se na p75NTR vežu s visokim afinitetom. Nasuprot tome, zreli neurotrofini preferiraju vezanje na Trk

receptore. Međureakcija zrelih neurotrofina s receptorima Trk potiče preživljavanje stanica, dok vezanje prekursora čimbenika rasta živaca (engl. *pro-nerve growth factor*) proNGF-a na p75NTR potiče apoptozu (Lu, 2005). Receptori Trk mogu biti prisutni u punoj duljini (trkB.FL) i kao skraćeni oblici (trkB.T1, trkB.T2) kojima nedostaje domena kinaze (Eide i sur., 1996; Fryer i sur., 1997). Iako je većina funkcija koje se pripisuju BDNF-u povezano s receptorom TrkB u punoj duljini, nekoliko uloga je predloženo za skraćene receptore, uključujući rast i razvoj (Fryer i sur., 1997; Yacoubian i Lo, 2000; Luikart i sur., 2003) te negativnu modulaciju trkB ekspresije i funkcije receptora (Eide i sur., 1996; Haapasalo i sur., 2001; Haapasalo i sur., 2002).

Ljudski gen *BDNF* sastoji se od 11 egzona i veličine je približno 70 kb. BDNF je rezultat prijevoda najmanje 34 transkripta mRNA proizvedena alternativnim spajanjem 11 uzvodnih egzona, od kojih svaki kodira za 5'UTR, spojenih na zajednički nizvodni egzon 9 koji kodira protein i dvije različite 3'UTR sekvence (Pruunsild i sur., 2007). Sintetizira se u endoplazmatskom retikulumu (ER) kao pre-pro-BDNF sa signalnim slijedom koji se odcjepljuje. Kao pro-BDNF transportira se u Golgijev aparat (GA) zbog dorade i sortiranja u vezikule te se otpušta prema staničnim odjeljcima. ProBDNF se može pretvoriti u zreli BDNF (mBDNF) unutarstanično u trans-Golgiju putem endoproteaza članova obitelji subtilizin-keksin, kao što je furin, ili u nezrelim sekretornim granulama pomoću proprotein konvertaza (Mowla i sur., 1999). Iz presinaptičkih i postinaptičkih struktura se otpušta konstitutivnim ili reguliranim sekrecijskim putem (Lu, 2005). BDNF regulira sinaptičku transmisiju presinaptičkim i postsinaptičkim djelovanjem. Presinaptički BDNF jača ekscitatorne (glutamatergične) sinapse i slabi inhibitorne (GABAergične) sinapse. Postsinaptički djeluje regulacijom fosforilacije receptora neurotransmitora (Binder i Scharfman, 2004). BDNF je prisutan u središnjem živčanom sustavu i na periferiji. Ekspirira se u hipokampusu, korteksu i bazalnom prednjem mozgu, područjima koja su vitalna za učenje, pamćenje i izvršnu funkciju. Primarna uloga BDNF-a u mozgu je promicanje preživljavanja postmitotskih neurona te rast i diferencijacija novih neurona i sinapsi (Beeri i sur., 2016).

1.3.1. Moždani neurotrofni čimbenik i Alzheimerova bolest

BDNF regulira preživljavanje, diferencijaciju i plastičnost neurona aktivacijom receptorske tirozin kinaze TrkB i receptora neurotrofina niskog afiniteta p75 (Huang i Reichardt, 2001; Poo, 2001). Smanjena signalizacija putem BDNF i TrkB dovodi do oštećenja prostorne memorije (Minichiello

i sur., 1999; Saarelainen i sur., 2000b; Minichiello, 2009), dok prekomjerna ekspresija TrkB poboljšava pamćenje (Koponen i sur., 2004). Signalnim putem preko TrkB, BDNF poboljšava dugoročno potenciranje sinapsi (LTP) hipokampusa, proces postepenog jačanja sinapsi uslijed dugoročnog prijenosa signala između neurona (Minichiello, 2009), dok kroz p75 potiče proces suprotan LTP-u, dugotrajnu depresiju (LTD) (Rosch i sur., 2005). Ova svojstva BDNF-a sugeriraju ulogu u AB-u gdje gubitak sinapsi i neurona i oštećeno pamćenje čine bitan dio patologije (Tanila, 2017). U uzorcima mozga bolesnika s AB-om *postmortem* pronađene su smanjene razine BDNF mRNA i proteina (Phillips i sur., 1991; Connor i sur., 1997; Ferrer i sur., 1999). Smanjene razine su zabilježene već u fazi MCI-a te je uvrđeno da koreliraju s kognitivnom funkcijom (Peng i sur., 2005). Neka izvješća su pokazala da je, osim smanjenih razina liganda, također smanjena i razina mRNA i proteina TrkB pune duljine (Connor i sur., 1996; Ferrer i sur., 1999). Suprotno tome, otkriveno je da su razine TrkB.T1 receptora povećane (Connor i sur., 1996; Ferrer i sur., 1999), što je značajno jer TrkB.T1 receptor ima dominantno negativno djelovanje na oba signalna puta, TrkB (Eide i sur., 1996) i p75 (Michaelsen i sur., 2010), te sprječava i LTP i LTD u eksperimentalnim modelima (Michaelsen i sur., 2010).

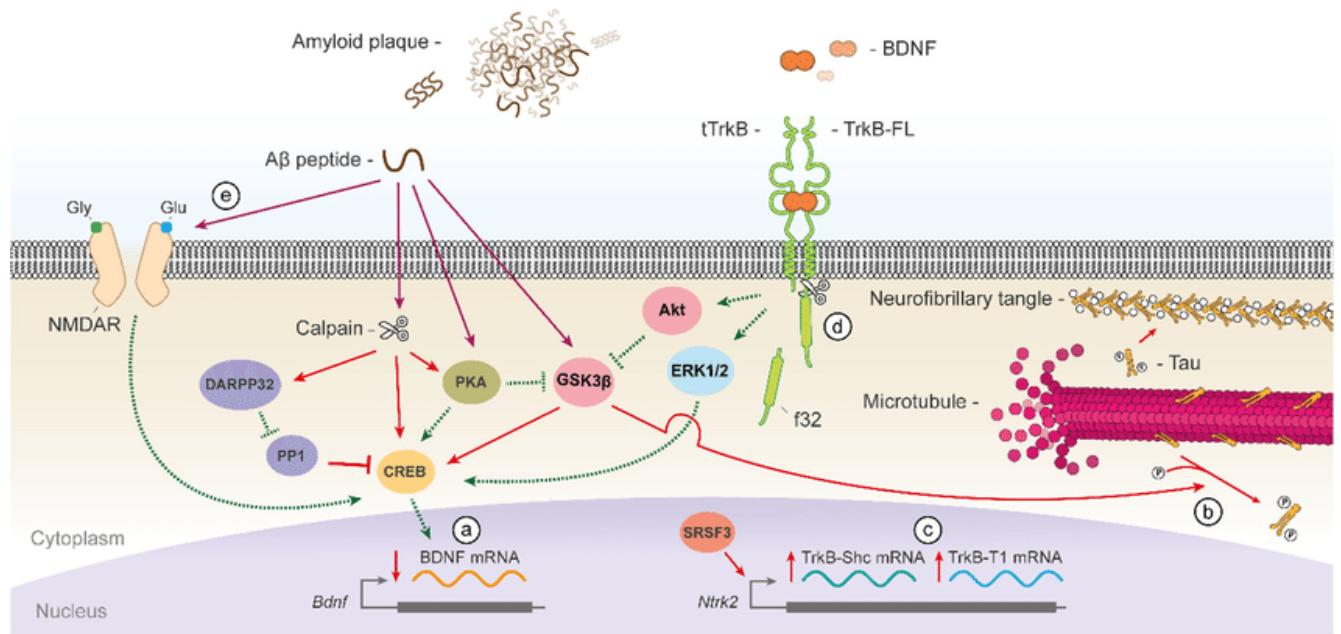
Postoje dokazi da A β može izravno inhibirati proteolitičku konverziju BDNF-a iz pro-BDNF-a čime se smanjuje njegova razina (Zheng i sur., 2010). Također, A β neizravno utječe na razine BDNF-a u sinapsama gdje ometa njegov aksonski transport. Čini se da je ovaj proces neovisan o hiperfosforilaciji proteina tau induciranoj s A β (Ramser, 2013). A β također inhibira retrogradni aksonski transport kompleksa BDNF-TrkB putem mehanizma koji uključuje deubikvitinirajući enzim, ubikvitin C-terminalnu hidrolazu L1 (Poon i sur., 2013). Također, postoje izravni dokazi da primjena oligomernog A β značajno smanjuje ekspresiju BDNF *in vitro* (Peng i sur., 2009).

Nekoliko mehanizama aktiviranih peptidom A β , djelujući na različitim razinama signalnog puta BDNF/TrkB, rezultira neurotrofičnim nedostatkom u AB-u (Slika 5.). Jedan istaknuti efektor ove aktivnosti A β je kalpain za kojeg je pronađena prekomjerna stimulacija u mozgu osoba oboljelih od AB-a *postmortem* (Saito, 1993). Aktivacija ove proteaze pomoću A β u kulturama neurona inducira smanjenje TrkB-FL (Kempainen, 2012), cijepanjem blizu mjesta pristajanja receptora Shc (Jeronimo-Santos i sur., 2015). Ova obrada daje skraćeni TrkB-FL, koji može djelovati kao ponor neurotrofina ili dominantni negativni receptor i unutarstanični fragment s kompletnom

domenom tirozin kinaze (Tejeda i Díaz-Guerra, 2017). Pretpostavlja se da proteolitički fragmenti generirani iz receptorskih tirozin kinaza mogu regulirati stanične procese kao što su transkripcija ili ravnoteža preživljavanja/apoptoze (Ancot, 2009). S druge strane, smanjenje razine BDNF-a u osnovi je posljedica njegove aberantne transkripcije, uglavnom zbog oštećenja transkripcijskog faktora ovisnog o signalnom putu cAMP (CREB) u hipokampusu i frontalnom korteksu bolesnika s AB-om (Yamamoto-Sasaki i sur., 1999; Pugazhenti i sur., 2011; Jin i sur., 2013). Dolazi do proteolize CREB-a tako što kalpain stvara skraćeni protein smanjene aktivnosti (Jin i sur., 2013). Dodatno, protein kinaza A (PKA), glavni regulator CREB-a, inaktivira se u temporalnom korteksu pacijenata s AB-om (Kim i sur., 2001; Liang i sur., 2007) djelovanjem A β (Vitolo i sur., 2002). A β također smanjuje aktivnost CREB-a prekomjernom stimulacijom glikogen-sintaza-kinaze 3 β (GSK3 β) (DaRocha-Souto i sur., 2012), do koje dolazi kroz dva mehanizma. Jedan podrazumijeva fosforilaciju GSK3 β na Ser9 pomoću PKA (Devi, 2015; Guo i sur., 2017), dok drugi uključuje proteolizu kalpaina uslijed koje nastaje skraćena GSK3 β s povećanom kinaznom aktivnošću (Goni-Oliver i sur., 2007; Jin i sur., 2015). Konačno, A β također smanjuje aktivnost CREB-a smanjenjem razine N-metil-D-aspartat receptora (NMDAR) (Mishizen-Eberz i sur., 2004) i cijepanjem fosfoproteina-32 reguliranog dopaminom i cAMP-om (DARPP-32), posredovanom kalpainom, ključnog inhibitora protein fosfataze 1 (PP1), fosfataze koja regulira defosforilaciju i inaktivaciju CREB-a (Cho i sur., 2015).

Vežanje BDNF-a na receptor TrkB aktivira tri unutarstanične signalizacijske kaskade: put protein kinaze aktivirane Ras–mitogenom ((MAPK) odgovoran za proliferaciju, diferencijaciju i preživljavanje) (Bonni i sur., 1999), put fosfatidilinozitol 3-kinaza (PI3K)–Akt (preživljavanje i rast aksona i dendrita) (Brunet i sur., 2001) i put fosfolipaza C gama (PLC γ)–Ca $^{2+}$ (odgovoran za preživljavanje neurona i sinaptičku plastičnost) (Minichiello i sur., 2002) (Slika 5.). Fosforilacija u tirozinu 515 receptora TrkB dovodi do aktivacije specifičnih adaptorskih molekula, Shc za put Ras-MAPK, i protein koji veže GRB2 (engl. *GRB2-associated-binding protein 1*) (GAB1) i supstrat-1 inzulinskog receptora (engl. *Insulin receptor substrate 1*) (IRS-1) za put PI3K-Akt (Brunet i sur., 2001), dok fosforilacija tirozina 816 izravno fosforilira i aktivira PLC γ (Minichiello i sur., 2002). U primarnim kortikalnim neuronima, primjena oligomernog A β ometa aktivaciju Ras-MAPK i PI3K-Akt puteva induciranu s BDNF ali ne PLC γ aktivaciju (Tong i sur., 2004). Međureakcija se odvija na adaptorskim proteinima Shc i IRS-1. A β tako može narušiti signalizaciju posredovanu s TrkB na više razina (Tanila, 2017). Suprotno tome, čini se da BDNF ima zaštitne

učinke na neuronsku toksičnost izazvanu A β u uvjetima *in vitro* i *in vivo* (Arancibia i sur., 2008; Kitiyanant i sur., 2012).



Slika 5. Poremećaj signalnog puta moždani neurotrofni čimbenik/tropomiozin receptor kinaza B (BDNF/TrkB) u Alzheimerovoj bolesti (AB). Pacijenti s AB-om pokazuju smanjenje razine BDNF-a u nekoliko područja mozga zbog smanjene ekspresije gena (a); Posljedično smanjenje neurotrofne signalizacije rezultira aktivacijom kinaze glikogen-sintaze-3 β (GSK3 β) što doprinosi hiperfosforilaciji tau (b); Ekspresija skraćenih izoforma TrkB je favorizirana u mozgu zahvaćenom AB-om pod djelovanjem faktora prekranja 3 bogatog serinom/argininom (SRSF3) (c); Peptid beta amiloid dodatno pospješuje aktivnosti GSK3 β i kalpaina, koji cijepa tropomiozin receptor kinazu B pune duljine (TrkB-FL) blizu mjesta pristajanja receptora Shc (d); Beta amiloid smanjuje aktivnost transkripcijskog faktora ovisnog o signalnom putu cAMP (CREB) pomoću nekoliko mehanizama uključujući smanjenje razine N-metil-D-aspartat receptora (NMDAR) (e) i pojačano djelovanje protein fosfataze 1 (PP1). f32, TrkB-FL = fragment kalpaina od 32 kDa; P = fosforilacija tau ostataka; tTrkB = kalpainom skraćeni TrkB-FL. (Preuzeto iz: Tejeda i Díaz-Guerra, 2017).

Nekoliko studija (Burbach i sur., 2004; Szapacs i sur., 2004; Peng i sur., 2009; Rantamäki i sur., 2013; Tanila, 2017) bavilo se mogućim promjenama razine BDNF-a u amiloidnim plakovima stvaranjem transgene linije miševa s mješovitim rezultatima što je pokazalo da razine BDNF-a ne ovise o tome nose li miševi samo APP mutaciju ili APP i presenilin-1 (PS1) mutacije.

1.3.2. Moždani neurotrofni čimbenik kao tretman u Alzheimerovoj bolesti

S obzirom da se razine BDNF-a u mozgu smanjuju već u ranoj fazi AB-a, primjena BDNF-a predstavlja potencijalnu strategiju liječenja. Problem predstavlja što BDNF nema farmakokinetiku prikladnu za sustavnu primjenu zbog svoje kratkotrajnosti poluživota u plazmi i slabe penetracije kroz BBB. Nekoliko pristupa za povećanje razine BDNF-a u mozgu na eksperimentalnim životinjskim modelima je dalo ohrabrujuće rezultate, ali još uvijek postoje brojne prepreke prije primjene tretmana (Tanila, 2017).

Jedna studija (Nagahara i sur., 2009) je primjenila unos gena *BDNF* pomoću lentiviralnog vektora u entorinalni korteks. Prijenos gena doveo je do povećanja razine BDNF-a u hipokampusu i poboljšanog pamćenja ovisnom o hipokampusu kod miševa s povećanom ekspresijom APP i ostarjelih štakora. Također je poništio smanjenje broja entorinskih neurona i sinaptofizinsku imunoreaktivnost kod APP transgenih miševa, ali nije bilo utjecaja na razinu A β u mozgu (Nagahara i sur., 2013). Jedna studija (Blurton-Jones i sur., 2009) je opisala transplantaciju neuronskih matičnih stanica u hipokampus ostarjelih miševa s povećanom ekspresijom APP, PS1 i tau, što je rezultiralo poboljšanjem prostornog učenja kod tih miševa. Transplantirane neuralne matične stanice s inaktiviranom ekspresijom BDNF-a bile su neučinkovite što sugerira da je povoljan učinak presađivanja stanica bio posredovan njihovom proizvodnjom BDNF-a (Blurton-Jones i sur., 2009).

Intranazalna primjena mimetika BDNF (LM22A) kod miševa je rezultirala njegovim selektivnim vezanjem na TrkB receptor i aktivaciju puteva PI3K-Akt i Ras-MAPK. Pritom je spoj također poboljšao motoričko učenje nakon traumatske ozljede mozga u štakora (Massa i sur., 2010).

Nadalje, jedan od pristupa je vezivanje peptida BDNF na vektor kao što je peptidomimetsko monoklonsko antitijelo, koje za prijenos iz krvi u mozak koristi endogeni transportni sustav krvno-moždane barijere (Boado i sur., 2007). Još jedan pristup za povećanje razine BDNF-a u mozgu baziran na peptidima koji moduliraju BDNF je tripeptid neuro pep-1. Nakon intraperitonealne injekcije tripeptida zabilježena je povećana razina BDNF-a u mozgu miševa s povećanom ekspresijom APP, PS1 i tau, poboljšano prostorno učenje i pamćenje, a također i smanjeno opterećenje amiloidnim plakom u mozgu (Shin i sur., 2014). Osim toga, zabilježeno je da mnogi nespecifični tretmani povećavaju razinu BDNF-a (Tanila, 2017). Primjerice, studija na APP/PS1

miševima je pokazala da društvena međureakcija povećava razine mRNA BDNF-a u hipokampusu (Hsiao i sur., 2014). Nadalje, studijom na zdravim starijim osobama je uočeno da aerobno vježbanje povećava razinu BDNF-a u serumu (Erickson i sur., 2011), a studijom na pacijentima s AB-om povišene razine su uočene u plazmi (Coelho i sur., 2014). Također, rezultati studije provedene na uzorku od 36 starijih pasa pokazuju da režim prehrane, obogaćen antioksidansima, uzrokuje značajno povećanje razine BDNF-a u serumu nakon šest mjeseci (Sechi i sur., 2015).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog rada je ispitati potencijalni učinak moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF) u prevenciji stanične smrti, odnosno promicanju preživljenja neurona. U tu svrhu koristila sam primarnu kulturu mišjih neurona tretiranih oligomerima beta amiloida ($A\beta$) kao model Alzheimerove bolesti *in vitro*.

Specifični ciljevi istraživanja su:

1. Uspostaviti primarnu kulturu kortikalnih neurona miša soja C57BL/6.
2. Uspostaviti i optimizirati model Alzheimerove bolesti *in vitro* tretiranjem primarne kulture kortikalnih neurona miša soja C57BL/6 peptidom $A\beta_{42}$.
3. Ispitati potencijalno neuroprotektivno djelovanje moždanog neurotrofnog čimbenika u modelu Alzheimerove bolesti *in vitro*.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uspostavljanje primarne kulture neurona

Kao model AB-a *in vitro*, koristila sam primarnu kulturu kortikalnih neurona miša soja C57BL/6. Neurone sam izolirala iz embrija u gestacijskoj dobi od 15 dana prema modificiranom postojećem protokolu (Hilgenberg i Smith, 2007). U skladu s Direktivom 2010/63/EU Eur. parlamenta i Vijeća o zaštiti životinja koje se koriste za znan. svrhe, Zakonom o zaštiti životinja NN 102/17, 32/19, i Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u znan. svrhe NN 55/13, te njegovim izmjenama NN 39/17, postupci na žrtvovanim životinjama u svrhu izolacije organa radi dobivanja primarnih staničnih kultura ne smatraju se pokusom i za njih nije potrebna dozvola Etičkog povjerenstva.

Kemikalije:

- Poli-D-lizin (Sigma)
 - otopina poli-D-lizina u boratnom puferu u koncentraciji 4 mg/mL
 - steriliziran filtriranjem kroz filter s porama veličine 0,2 µm
- 0,1 M boratni pufer
 - 40 mM borna kiselina
 - 8 mM natrijev borat
 - pH 8,5
 - steriliziran filtriranjem kroz filter s porama veličine 0,2 µm
- Medij za uzgoj stanica DMEM (engl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Gibco):
 - glukoza (4500 mg/L)
 - 10% fetalni goveđi serum (Gibco) inaktiviran 60 minuta na 56 °C
 - 2 mM L-glutamin (Sigma)
 - 100 U/mL penicilin (Sigma)
 - 100 µg/mL streptomycin (Sigma)
 - 2,5 ug/mL amfotericin B (Sigma)
 - pH 7,4; sterilan

- Hankova izbalansirana otopina soli (HBSS, od engl. Hanks balanced saline solution) (Lonza)
 - sterilna
- 2,5% tripsin (Invitrogen)
- DNAza (Sigma)
 - otopina DNAze u HBSS-u u koncentraciji 10 µg/mL
 - sterilizirana filtriranjem kroz filter s porama veličine 0,2 µm
- Trituracijska otopina:
 - otopina inhibitora tripsina (Sigma T9003) u koncentraciji 0,5 mg/mL, Albumaxa (Gibco) u koncentraciji 10 mg/mL i DNAze u koncentraciji 10 µg/mL u HBSS-u
 - sterilizirana filtriranjem kroz filter s porama veličine 0,2 µm
- Neurobazalni medij (Gibco):
 - 0,5 mM L-glutamina (Sigma)
 - 100 U/mL penicilina (Sigma)
 - 100 µg/mL streptomicina (Sigma)
 - Supstanca B27 (Gibco)
 - pH 7,4; sterilan
- Otopina tripanskog modrila (Trypan blue):
 - 0,4% tripansko modriilo
 - 0,81% NaCl
 - 0,06% K₂HPO₄

Priprema ploča za uzgoj stanica

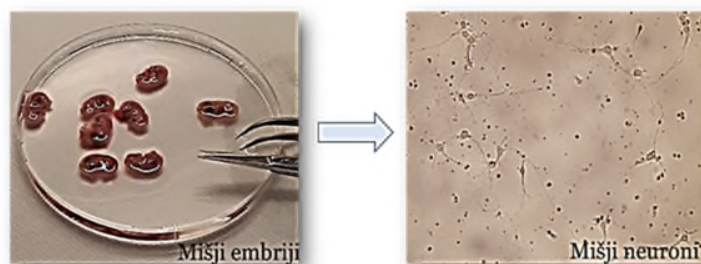
Dan uoči izolacije neurona razrijedila sam otopinu poli-D-lizina boratnim puferom do koncentracije 0,02 mg/mL te sterilizirala filtriranjem kroz filter s porama veličine 0,2 µm. U svaku jažicu ploče za uzgoj stanica dodala sam odgovarajući volumen radne otopine poli-D-lizina, ovisno o veličini jažica. Tako sam u jažice ploča s 96 jažica dodala po 200 µL, a u jažice ploča s 24 jažica 500 µL dobivene otopine poli-D-lizina. Potom sam ploče prekrila aluminijskom folijom i pohranila ih u inkubator preko noći (37 °C, 5% CO₂). Prije nasađivanja neurona odisala sam poli-D-lizin iz

jažica te ih isprala sterilnom vodom tri puta. U jažice sam potom dodala odgovarajući volumen DMEM-a i vratila ploče u inkubator.

Nakon što je gravidna mišica eutanizirana, izvadila sam iz maternice embrije kojima sam odvojila glave te izdvojila mozgove i prebacila ih u sterilnu petrijevku posudu ispunjenu HBSS-om (Slika 6.). Pod lupom sam pažljivo odvojila korteks i uklonila moždane ovojnice. Izolirani korteks sam prebacila u plastičnu epruvetu. Nakon ispiranja s 10 mL HBSS-a dodala sam 5 mL sterilnog HBSS-a i 100 μ L 2,5% tripsina, te inkubirala 20 minuta na 37 °C uz lagano miješanje sadržaja svakih 5 minuta. Zatim sam dodala 5 mL 10 μ g/mL DNAze (Sigma), okrenula epruvetu dva puta te uklonila supernatant odsisavanjem. Triturirala sam 10 puta uz dodatak 1 mL otopine za trituiranje, korištenjem staklene Pasteur pipete. Na trituirano tkivo sam dodala DMEM (1 mL po izoliranom mozgu) te sam otopinu profiltrirala kroz cjedilo s porama od 70 μ m u plastičnu epruvetu od 50 mL. Otopinu sam centrifugirala 5 minuta na 300 x g, a talog stanica resuspendirala u 1 mL DMEM-a po mozgu. Zatim sam odredila koncentraciju neurona u dobivenoj suspenziji. Pomiješala sam 40 μ L suspenzije, 60 μ L DMEM-a i 100 μ L tripanskog modrila te nanijela na Bürker-Türkovu komoricu. Pod invertnim mikroskopom brojala sam samo žive, bezbojne, stanice, s obzirom da tripansko modriilo trajno oboji samo mrtve stanice koje ga nemaju mogućnost izbaciti. Žive stanice brojala sam u 4 puta po 16 polja, a broj stanica u mililitru dobila sam prema formuli:

$$\text{Broj stanica u ml} = \frac{\text{izbrojen broj stanica}}{64} \times 5 \times 250 \times 10^3$$

Iz ploča prevučениh poli-D-lizinom sam odsisala DMEM te nasadila neurone. Pritom sam u ploče s 96 jažica nasadila 4×10^4 stanica po jažici u ukupnom volumenu od 200 μ L, a na ploče s 24 jažice $1,6 \times 10^5$ stanica u ukupnom volumenu od 500 μ L. Nakon 2 sata DMEM sam zamijenila kompletiranim neurobazalnim medijem i stanice kultivirala u inkubatoru, na 37 °C i 5% CO₂, uz izmjenu neurobazalnog medija svaka 3 dana.



Slika 6. Prikaz izdvojenih embrija i neurona tijekom postupka uspostave primarne kulture neurona iz embrija miša soja C57/BL6 u Laboratoriju za molekularnu neuropsihijatriju Instituta Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska.

3.2. Priprema beta amiloid 42 oligomera

Oligomere A β 42 sam pripremila iz komercijalno dostupnog liofiliziranog pripravka A β 42 peptida u obliku monomera prema protokolu Stine i sur. (2011).

Pripremila sam otopinu od 1 mM A β dodavanjem heksafluorizopropanola (HFIP) izravno u bočicu koja sadrži liofilizirani peptid kroz gumeni septum pomoću staklene Hamilton štrcaljke s teflonskim klipom i oštrom iglom. Dodala sam 222 μ L otapala na 1 mg peptida. Inkubirala sam otopinu A β – HFIP na sobnoj temperaturi 30 minuta te raspodijelila otopinu u alikvote od 10 μ L u sterilne Eppendorf epruvete. Epruvete sam ostavila otvorene preko noći kako bi otapalo isparilo. Tragove otapala sam potpuno uklonila isušivanjem u uređaju SpeedVac evaporator kroz 10 min. Na dnu epruveta rezultirajući A β 42 peptid bio je vidljiv kao tanak prozirni film. Osušene peptidne filmove pohranila sam na -20 °C do upotrebe.

Dan prije tretmana neurona tanki sloj A β 42 peptida sam otopila u 2 μ L dimetil sulfoksida (DMSO), vorteksirala kroz 30 sekundi, prikupila sadržaj epruvete na dno kraćim centrifugiranjem i sonicirala otopinu 10 min. Iz ovakvih uzoraka sam pripremila 10 μ M A β 42 oligomere dodavanjem 98 μ L hladnog medija DMEM/F12, vorteksiranjem i inkubacijom na 4 °C kroz 24 h. Polimere A β 42 u koncentraciji 10 μ M sam pripremila dodavanjem 98 μ L 10 mM klorovodične kiseline, vorteksiranjem i inkubacijom na 37 °C kroz 24 h, a 10 μ M A β 42 monomere dodatkom 98 μ L ledene destilirane vode i vorteksiranjem.

Prisutnost oligomera dokazana je primjenom mikroskopije atomskih sila (AFM) i denaturirajućom paliakrilamidnom gel elektroforezom (SDS-PAGE) (engl. *Sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis*).

3.2.1. Mikroskopija atomske sile

Mikroskop atomskih sila (AFM, od engl. *Atomic Force Microscope*) je uređaj čiji se rad zasniva na mjerenju međumolekulskih sila koje djeluju između atoma mjerne sonde i atoma ispitivanog

uzorka (udaljenost 0,1 do 10 nm). Intenzitet nepolarnih međumolekulskih sila ovisi o udaljenosti na kojoj se nalaze čestice čija međureakcija se određuje. Tri osnovna dijela AFM uređaja su piezoelektrično pretraživalo, pretražna proba i sustav za detekciju pomaka poluge. Senzor se sastoji od opruge i poluge sa šiljkom čija osnova su SiN₃, SiO₂, C-nanotubice. Uređaj omogućuje mjerenje među- i unutar-molekularne sile, adhezijske sile, elasticitet uzorka te tvrdoću površine, a sama metoda je pogodna za ispitivanje makromolekula, polimera, vezikula, tekućih kristala, koloida, stanica i staničnih organela kao i abiotskih čestica u prirodnim uvjetima. Na temelju izmjerenih vrijednosti rekonstruira se udaljenost od uzorka i to je osnova za izradu 3D topografska slika površine. Dokazivanje prisutnosti monomera, oligomera i polimera A β 42 provedeno je u Laboratoriju za biogeokemiju mora i atmosfere Zavoda za istraživanje mora i okoliša Instituta Ruđer Bošković korištenjem uređaja Multimode Scanning Probe Microscope (MM-SPM) s Nanoscope IIIa kontrolnom jedinicom (Veeco Instruments, Santa Barbara, CA). Za procesiranje i analizu slika korišten je programski paket NanoScopeTM (Digital Instruments, verzija V6.14r1).

3.2.2. Denaturirajuća poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE)

Natrij dodecil sulfat poliakrilamidna gel elektroforeza proces je razdvajanja proteina na temelju razlike u njihovoj masi. SDS (anionski detergent) daje negativan naboj svim proteinima u smjesi. Pokretljivost proteina je obrnuto proporcionalna relativnoj molekularnoj masi.

Kemikalije:

- Pufer za uzorke:
 - 3,55 mL destilirane H₂O
 - 1,25 mL 0,5M Tris-HCl
 - 2,5 mL glicerol
 - 2 mL 10% SDS
 - 0,2 mL 0,5% bromfenol plave

- Pufer za elektroforezu:
 - 30,3 g Tris-base
 - 144,0 g Glicin
 - 10,0 g SDS

- destilirana H₂O do volumena 1 L
- Pre-obojan proteinski standard Novex™ Sharp (Invitrogen)
- Coomassie Brilliant Blue boja
 - 0,1% Coomassie® R-250
 - 40% etanol
 - 10% octena kiselina
- Otopina za odbojavanje
 - 10% etanol
 - 7,5% octena kiselina

Uzorke A β 42 oligomera razdvojila sam vertikalnom denaturirajućom elektroforezom u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE) na 4-20% Mini Protean TGX Precast gelu (Biorad) primjenom Mini-PROTEAN® 3 Cell sustava. Nakon sklapanja sustava i umetanja gela, prvo sam napunila unutarnju komoru sa 140 mL pufera za elektroforezu koji je do upotrebe bio pohranjen na 4 °C. Potom sam u vanjsku komoru dodala 200 mL pufera za elektroforezu. Pripremila sam uzorke razrijedivši ih u omjeru 1:1 tako što sam pomiješala 15 μ L A β 42 oligomera i 15 μ L pufera za uzorke te ih nanjela na gel. Osim uzoraka, na gel sam nanjela i 5 μ L proteinskog molekularnog biljega. Elektroforezu sam provela pri uvjetima 100 V/80 mA, otprilike 90 minuta.

Po završetku elektroforeze koristila sam Coomassie Brilliant Blue (CBB) boju za vizualizaciju proteinskih pruga u gelu. Gel sam inkubirala u pripremljenoj otopini boje 10 min pri 50 °C uz konstantno miješanje. Odbojavanje gela sam provela inkubacijom gela o otopini za odbojavanje tri puta po 5 min pri 50 °C uz konstantno miješanje. Nakon odbojavanja proteini su bili vidljivi kao tamnoplave pruge na bezbojnoj pozadini.

3.3. Uspostava i optimizacija *in vitro* modela Alzheimerove bolesti

Neurone u kulturi sam prvo tretirala različitim oblicima peptida A β 42 (monomeri, oligomeri, polimeri) u različitim koncentracijama (100 nM, 1 μ M, 10 μ M). Nakon odabira oblika peptida A β 42 čijim tretmanom se postiže optimalno oštećenje neurona, dodatno sam testirala pri kojoj njegovoj koncentraciji (100 nM, 1 μ M, 10 μ M) i kroz koje vrijeme trajanja tretmana (24, 48, 72

sata) se postiže optimalno oštećenje neurona. Kao kontrola su poslužili neuroni koje sam paralelno tretirala samo odgovarajućim otapalom u kojem je bio otopljen peptid A β 42. Pritom sam zaključke donosila na temelju praćenja stanične vijabilnosti te citotoksičnog učinka tretmana, uspoređujući ga s odgovarajućom kontrolom.

3.3.1. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol bromid) test

Za ispitivanje vijabilnosti stanica koristila sam test MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol bromid). Test se koristi za ispitivanje vijabilnosti stanica kao funkcije redoks potencijala. Stanice koje aktivno vrše respiraciju prevode u vodi topljive žute MTT tetrazolijeve soli u netopljivi ljubičasti formazan čija se koncentracija može odrediti nakon otapanja spektrofotometrijski. Apsorbancija se očitava na 570 nm i vrijednost je proporcionalna broju živih stanica.

Kemikalije:

- MTT
- DMSO (dimetil sulfoksid)

Matičnu otopinu MTT-a sam otopila u neurobazalnom mediju i tako pripremila radnu otopinu MTT-a (0,5 mg/mL). Tretiranim stanicama koje su rasle u ploči za uzgoj stanica s 96 jažica sam uklonila medij, a zatim dodala 40 μ L radne otopine MTT-a na svaku jažicu i inkubirala 4 sata na 37 °C, 5% CO₂. Nakon inkubacije sam dodala 160 μ L DMSO-a (Sigma) po svakoj jažici i stavila ploču na orbitalnu miješalicu 10 minuta kako bi se sadržaj jažica promiješao. U zadnjem koraku sam pomoću čitača mikrotitarskih ploča (Thermo Labsystems Multiskan EX Microplate Reader) izmjerila apsorbancija pri 570 nm. Test sam radila 24, 48 i 72 sata nakon tretmana neurona.

3.3.2. ApoTox-Glo™ Triplex Assay

Ovaj test, proizvođača Promega, SAD, omogućuje ispitivanje vijabilnosti, citotoksičnosti i kaspazne aktivnosti u stanicama u kulturi. Naime, u prvom koraku, peptidni supstrat glicil-fenilalanil-aminofluorokumarin (GF-AFC) ulazi u žive stanice gdje ga cijepaju proteaze pri čemu nastaje fluorescentni signal proporcionalan broju živih stanica. U drugom koraku se koristi supstrat bis-AAF-R110 i njegovom razgradnjom proteazama oslobođenim iz oštećenih mrtvih stanica,

oslobađa se fluorescentni signal proporcionalan broju oštećenih stanica. Treći dio testa koristi Caspase-Glo® tehnologiju za detekciju aktivnosti kaspaza u reagensu optimiziranom za kaspaznu i luciferaznu aktivnost te lizu stanica. Izlaganjem stanica luminogenom supstratu (tetrapeptid DEVD) za kaspaze 3 i 7 dolazi do njegovog cijepanja kaspazama i stvaranja supstrata za luciferazu prisutnu u reagensu. Luciferazna aktivnost dovodi do nastajanja luminiscentnog signala koji je proporcionalan razini kaspazne aktivnosti, a koja je proporcionalna intenzitetu apoptoze uzrokovane tretmanom neurona.

Kemikalije:

- Pufer za ispitivanje
- GF-AFC supstrat
- bis-AAF-R110 supstrat

Testiranje sam provela na stanicama nasadenim u pločama za uzgoj stanica s 96 jažica. Ukupan volumen sadržaja svake jažice prilikom tretmana različitim koncentracijama oligomerima A β 42 je bio podešen na 100 μ L.

Odmrznula sam pufer za ispitivanje, GF-AFC supstrat i bis-AAF-R110 supstrat u vodenoj kupelji na 37 °C. Prenijela sam 10 μ L GF-AFC supstrata i 10 μ L bis-AAF-R110 supstrata u 2,0 mL pufera za ispitivanje. Pomiješala sam pufer za ispitivanje koji sadrži supstrate vorteksiranjem sadržaja dok se supstrati potpuno ne otope. Nastala mješavina je reagens za testiranje vijabilnosti/citotoksičnosti. Dodala sam 20 μ L reagensa za vijabilnost/citotoksičnost koji sadrži i GF-AFC supstrat i bis-AAF-R110 supstrat na odabrane jažice i kratko promiješala orbitalnom trešnjom (300–500 okretaja u minuti za ~30 sekundi) te potom inkubirala 30 minuta na 37 °C. Izmjerila sam fluorescenciju na sljedeća dva skupa valnih duljina: 400Ex/505Em (vijabilnost) i 485Ex/520Em (citotoksičnost) korištenjem uređaja Tecan Infinite M200.

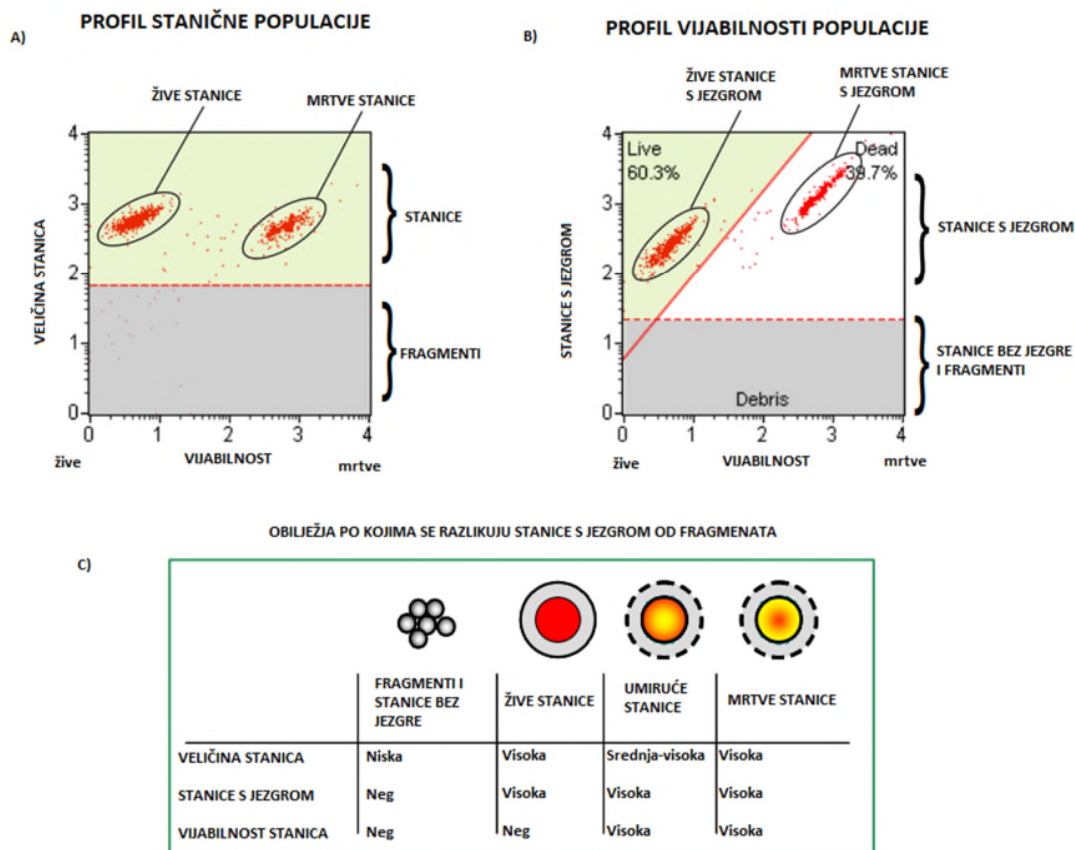
3.3.3. Muse® Count & Viability test

MUSE je mini protočni citometar kojim se može ispitati niz parametara staničnog zdravlja, apoptoze, oksidativnog stresa, stanične signalizacije te imunološkog odgovora. Testovi se provode na uređaju Guava® Muse® Cell Analyzer (Slika 8.) (Luminex, SAD).

Muse® Count & Viability komercijalni kit (Luminex, SAD) omogućuje kvantitativnu analizu broja i vijabilnosti stanica u staničnim suspenzijama iz različitih uzgajanih staničnih linija sisavaca. Muse® Count & Viability reagens sadrži dvije boje koje vežu DNA i diferencirano bojaju žive i nežive stanice na temelju njihove membranske propusnosti. Test se provodi na navedenom uređaju a podaci se obrađuju pomoću Muse® Count & Viability softverskog modula i daju sljedeće informacije:

- broj živih stanica (stanica/mL)
- ukupan broj stanica (stanice/mL)
- postotak vijabilnosti uzorka

Uređaj podatke automatski prikazuje kao 'Profil stanične populacije' i 'Profil vijabilnosti populacije' (Slika 7.). Profil stanične populacije se koristi za razlikovanje živih stanica od mrtvih, a temelji se na bojanju jezgre mrtvih i umirućih stanica koje zbog gubitka integriteta membrane propuštaju boju iz reagensa koja veže DNA. Druga boja iz reagensa je membranski propusna i boja sve stanice s jezgrom što omogućuje razlikovanje stanica s jezgrom od fragmenata i stanica bez jezgre a prikazuje se kao Profil vijabilnosti populacije. Muse® sustav broji obojene stanice s jezgrom, a potom prema svojstvima stanične veličine razlikuje slobodne jezgre i stanične ostatke od stanica da bi u konačnici odredio točan ukupan broj stanica.



Slika 7. Ilustracija podataka dobivenih korištenjem komercijalnog kompleta Muse® Count & Viability. Razlikujemo: (A) Profil stanične populacije: prikaz razlikovanja živih stanica od mrtvih; (B) Profil vijabilnosti populacije: prikaz razlikovanja živih stanica s jezgrom od mrtvih stanica s jezgrom te staničnih fragmenata; (C) Svojstva stanične veličine: omogućuju razlikovanje slobodnih jezgri i staničnih ostataka od stanica.

Kemikalije:

- Fosfatni pufer (PBS)
 - 136 mM NaCl
 - 2,6 mM KCl
 - 10 mM Na₂HPO₄
 - 1,7 mM KH₂PO₄
 - pH 7,4
- 0,05% tripsin

- Kompletirani neurobazalni medij
- Muse® Count & Viability Reagens

Test sam provela na tretiranim neuronima nasadenim na ploče za uzgoj stanica s 24 jažica. Prvo sam neuronima odsisala medij, a zatim isprala dva puta s 500 µl PBS. Poslije ispiranja sam dodala 200 µL 0,05% tripsina po jažici. Nakon 2 minute u jažicu sam dodala 500 µL neurobazalnog medija. Sav odsisan medij, PBS te tripsin sam prebacila u odgovarajuće plastične epruvete te centrifugirala staničnu suspenziju 5 minuta na 300 x g. Nakon centrifugiranja, odlila sam supernatant i resuspendirala talog u 200 µL neurobazalnog medija. U 450 µL reagensa Muse® Count & Viability sam dodala 50 µL stanične suspenzije, prema preporukama proizvođača, s obzirom da je gustoća nasadenih stanica bila između 1×10^5 i 1×10^6 stanica/mL. Inkubirala sam epruvete 5 minuta pri sobnoj temperaturi i potom ispitala uzorke koristeći Muse™ Cell Analyzer prema uputama proizvođača. Sažetak testa je shematski prikazan Slikom 8.



Slika 8. Prikaz sažetka postupka testa Muse® Count & Viability. Preuzeto iz uputa proizvođača (<https://www.luminexcorp.com/muse-count-viability-kit-200x/#documentation>). Test Muse® Count & Viability omogućuje kvantitativnu analizu broja i vijabilnosti stanica u staničnim suspenzijama

3.4. Tretman *in vitro* modela Alzheimerove bolesti moždanim neurotrofnim čimbenikom u svrhu ispitivanja protektivnog učinka moždanog neurotrofnog čimbenika

Nakon određivanje koncentracije oligomera A β 42 čijim tretmanom se izaziva optimalan učinak, ispitala sam i optimizirala paralelni tretman primarne kulture neurona oligomerima A β 42 u koncentraciji 10 μ M i BDNF-om različite koncentracije (0,1 ng/mL, 1 ng/mL i 100 ng/mL). Za testiranje učinka paralelnog tretmana primarne kulture neurona koristila sam prethodno opisan test MTT te u nastavku opisane testove. Paralelni tretman oligomerima A β 42 i BDNF-om je proveden 24 sata prije testiranja njegovog učinka na neuronima nasadenim na ploče za uzgoj stanica s 96 jažica (MTT test) i 24 jažice (Muse® testovi). Kao kontrola su poslužili neuroni koje sam paralelno tretirala samo odgovarajućim otapalom koji je bio mješavina otapala oligomera A β 42 i otapala BDNF-a (sterilna destilirana voda). Pritom sam zaključke donosila na temelju praćenja stanične vijabilnosti te kaspazne aktivnosti (proapoptotskog učinka) utjecanih tretmanom, uspoređujući ih s odgovarajućom kontrolom.

3.4.1. Muse® BCL-2 Activation Dual Detection test

Za mjerenje ukupne razine ekspresije proteina BCL-2 (od engl. *B-cell lymphoma 2*) koristila sam Muse® BCL-2 Activation Dual Detection test (Luminex, SAD). BCL-2 je važan regulator stanične smrti, odnosno apoptoze. Pripada proteinskoj obitelji BCL-2 na čije se pro-apoptotske članove (kao što je protein Bax) veže kao anti-apoptotski član te sprječava njihovu međureakciju s mitohondrijskom membranom (Hardwick i Soane, 2013). U slučaju pro-apoptotskog signala dolazi do višestruke fosforilacije proteina BCL-2 (uključujući i na aminokiselinskom ostatku Ser70). Pri tome prestaje međureakcija proteina BCL-2 i pro-apoptotskog proteina BAX (od engl. *Bcl-2-associated X*) protein, a BAX se zatim veže na mitohondrijsku membranu, uzrokuje otpuštanje citokroma C u citoplazmu te aktivaciju kaspaza i naposljetku, staničnu smrt (Hardwick i Soane, 2013). Komplet Muse® BCL-2 Activation Dual Detection kit sadrži dva konjugirana protutijela, jedno koje se specifično veže na fosforilirani Ser70 u proteinu BCL-2 konjugiran bojom Alexa Fluor®555 i drugo koje prepoznaje općenito protein BCL-2 konjugirano bojom PECy5. Navedeno omogućuje razlikovanje tri stanične populacije:

- Neaktivirane stanice (stanice s neaktiviranim BCL-2)
- Aktivirane stanice (stanice s fosforiliranim BCL-2)
- Stanice koje ne eksprimiraju BCL-2

Kemikalije:

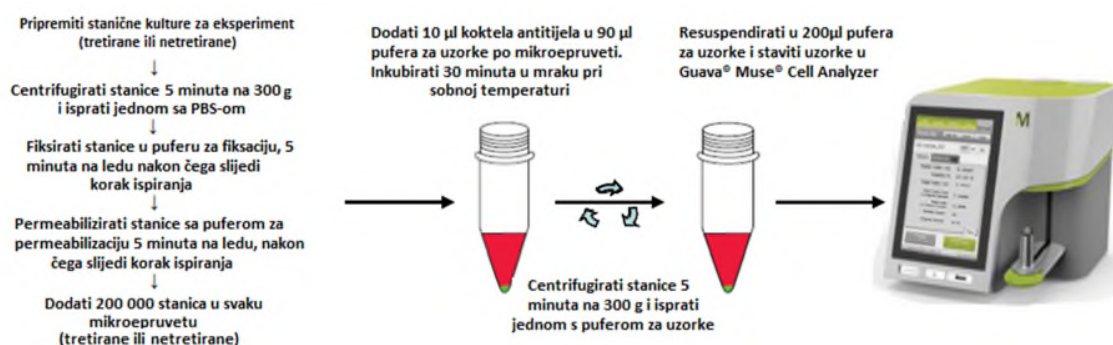
- Fosfatni pufer (PBS)
 - 136 mM NaCl
 - 2,6 mM KCl
 - 10 mM Na₂HPO₄
 - 1,7 mM KH₂PO₄
 - pH 7,4
- 0,05% tripsin
- Kompletirani neurobazalni medij
- Antitijelo Anti-phospho-BCL-2 (Ser70)-Alexa Fluor®555
- Antitijelo Anti-BCL-2-PECy5
- Pufer za analizu
- Pufer za fiksiranje
- Pufer za permeabilizaciju

Test sam provela na tretiranim neuronima nasađenim na ploče za uzgoj stanica s 24 jažica.

Prije početka postupka pripremila sam otopinu koktela za rad s antitijelima miješanjem 50 µL anti phospho-BCL-2 (Ser70)-Alexa Fluor® 555 i 50 µL anti-BCL-2-PECy5 antitijela.

Bilo je potrebno prvo pripremiti željene stanične suspenzije. Svim jažicama u koje su nasađeni neuroni odsisala sam medij i isprala ih dva puta s 500 µL PBS. Zatim sam dodala 200 µL 0,05% tripsina po jažici. Nakon dvije minute u jažice sam dodala 500 µL neurobazalnog medija kako bih inaktivirala tripsin. Sav odsisani medij, PBS te tripsin prebacila sam u odgovarajuće plastične epruvete. Zatim sam centrifugirala stanične suspenzije 5 minuta na 300 x g. Nakon što sam uklonila supernatant odlijevanjem, još jednom sam isprala talog s 1 mL PBS i ponovno centrifugirala 5 min

na 300 x g. Na talog sam zatim dodala po 100 μ L pufera koji je sastavni dio kompleta Muse® BCL-2 Activation Dual Detection te 100 μ L tzv. fiksacijskog pufera koji je također dio komercijalnog kompleta. Uzorke sam lagano promiješala pipetiranjem, prebacila u mikroepruvetu, inkubirala 5 min na ledu te centrifugirala 5 min na 300 x g. Supernatant sam pažljivo odpipetirala i na njega dodala 200 μ L permeabilizacijskog pufera. Uzorke sam zatim ponovo inkubirala na ledu 5 min i centrifugirala 5 min na 300 x g. Dobiveni talog sam resuspendirala u 90 μ L pufera za analizu i na to dodala 10 μ L mješavine dva protutijela u omjeru 1:1. Uzorke sam inkubirala u mraku 30 min, na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije u svaku mikroepruvetu dodala sam po 100 μ L pufera za analizu i uzorke centrifugirala 5 min na 300 x g. Nakon što sam pažljivo otklonila supernatant, talog sam resuspendirala u 200 μ L pufera i potom stavila uzorke u uređaj Guava® Muse® Cell Analyzer (Luminex) te izmjerila i očitala rezultate. Sažetak testa je shematski prikazan Slikom 9.



Slika 9. Prikaz testa Muse® BCL-2 Activation Dual Detection. Preuzeto iz uputa proizvođača (<https://www.luminexcorp.com/muse-bcl-2-activation-dual-detection-kit/#documentation>). Antitijela Anti phospho-BCL-2 (Ser70)-Alexa Fluor® 555 i 50 μ L anti-BCL-2-PECy5 omogućuju mjerenje ukupne razine BCL-2 ekspresije korištenjem uređaja Guava® Muse® Cell Analyzer

3.4.2. Ispitivanje kaspazne aktivnosti

Za ispitivanje kaspazne aktivnosti koristila sam treću komponentu ApoTox-Glo™ Triplex Assay (Promega) opisanog u poglavlju 3.3.2.

Kemikalije:

- Caspase-Glo® 3/7 pufer (Promega)
- Caspase-Glo® 3/7 supstrat (liofilizirani) (Promega)

Prije početka analize pripremila sam reagens Caspase-Glo® 3/7 miješajući pufer Caspase-Glo® 3/7 i liofilizirani Caspase-Glo® 3/7 supstrat na sobnoj temperaturi, te potom dodala sadržaj boce s puferom Caspase-Glo® 3/7 u jantarnu bocu sa supstratom Caspase-Glo® 3/7. Miješala sam sadržaj vrteći i obrćući dok se supstrat nije potpuno otopio i tako formirao Caspase-Glo® 3/7 reagens.

Ploče s 96 jažica koje sadrže tretirane stanice uklonila sam iz inkubatora. Nakon što su dosegnule sobnu temperaturu, dodala sam 100 µL reagensa Caspase-Glo® 3/7 u svaku jažicu koja sadrži netretirane neurone (negativna kontrola) ili neurone tretirane oligomerima Aβ42 i BDNF-om u optimalnoj koncentraciji i konačnom volumenu od 100 µL. Ploču sam prekrila poklopcem i zatim lagano miješala sadržaj jažica pomoću orbitalne miješalice za ploče na 300–500 okretaja po minuti tijekom 30 sekundi. Nakon inkubacije pri sobnoj temperaturi 30 minuta, izmjerila sam luminescenciju svakog uzorka pomoću uređaja Tecan Infinite M200.

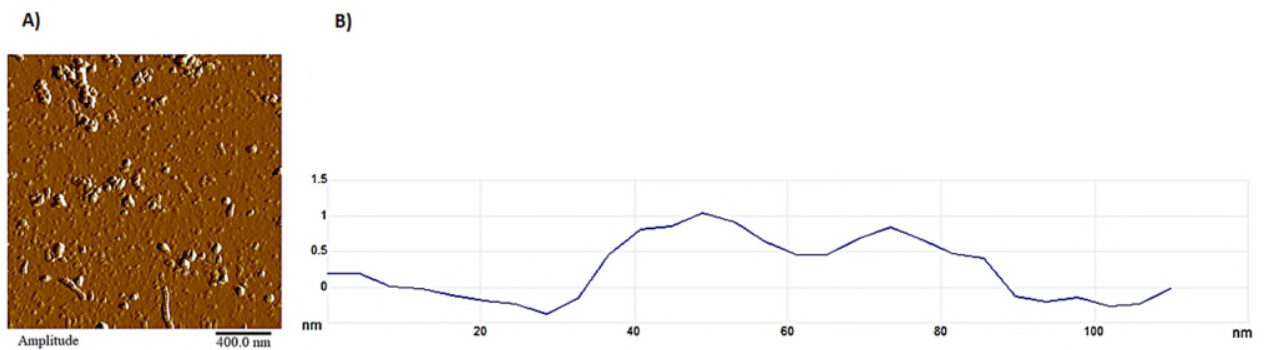
3.5. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka sam koristila program Sigma Stat (Jandell Scientific Corp., SAD). Rezultate provedenih testova sam između skupina uspoređivala jednostrukom analizom varijance (ANOVA) popraćenom post-hoc Dunnettovim testom kako bih usporedila sve skupine međusobno i utvrdila postojanje pojedinačnih razlika. Za svaki od tretmana sam napravila 6 mjerenja te sam brojčane rezultate izrazila kao srednju vrijednost i standardnu devijaciju, a grafičke prikaze sam izradila u programu Microsoft Excel. Razinu značajnosti α za sve analize sam postavila na 0,05, a korišteni testovi su bili dvosmjerni.

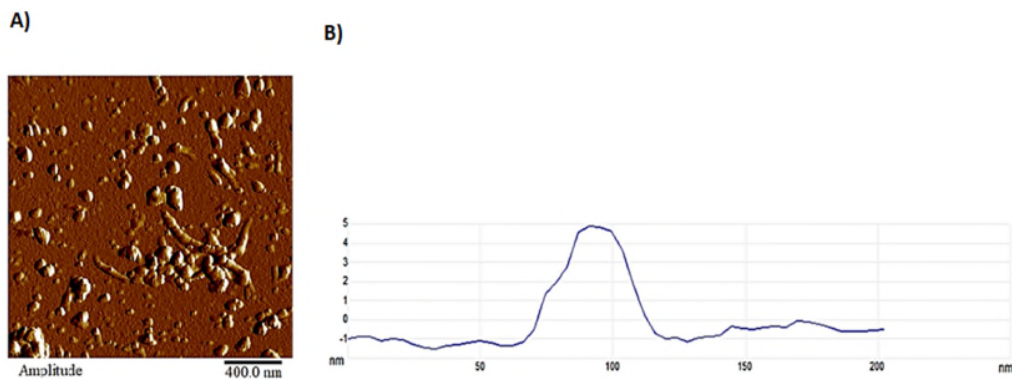
4. REZULTATI

4.1. Prisutnost beta amiloid 42 oligomera

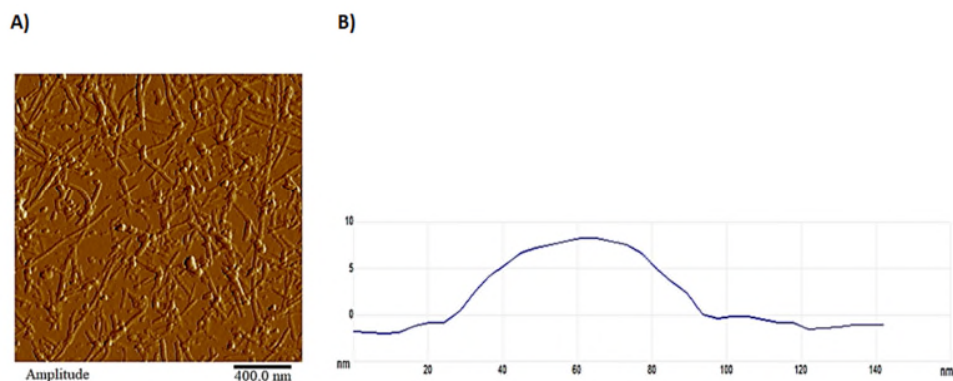
Mikroskopijom atomskih sila je u uzorcima u preparaciji iz komercijalno dostupnog liofiliziranog pripravka A β 42 peptida u obliku monomera, koncentracije 10 μ M, dokazana prisutnost monomera, oligomera i polimera kako je prikazano Slikama 10, 11 i 12.



Slika 10. Rezultati analize mikroskopije atomskih sila (AFM) prilikom dokazivanja prisutnosti monomera A β 42 u preparativnom uzorku. A) Tipičan AFM prikaz površine adsorbiranih čestica monomera. B) Profil presjeka odgovarajućeg odabranog područja iz prikaza A

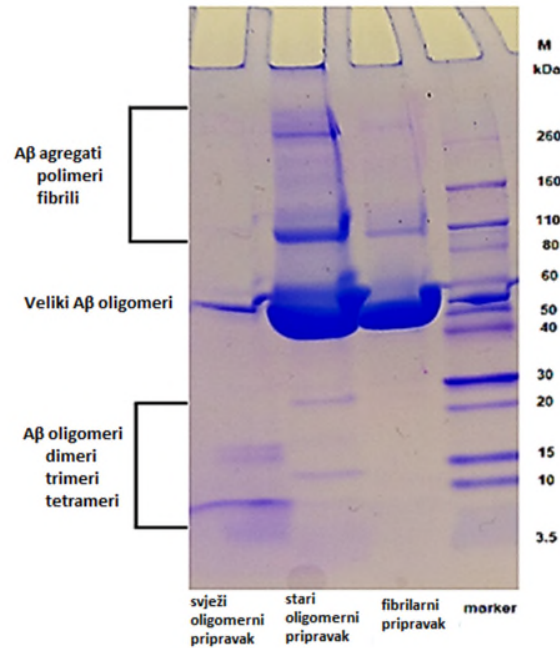


Slika 11. Rezultati analize mikroskopije atomskih sila (AFM) prilikom dokazivanja prisutnosti oligomera A β 42 u preparativnom uzorku. A) Tipičan AFM prikaz površine adsorbiranih čestica oligomera. B) Profil presjeka odgovarajućeg odabranog područja iz prikaza A



Slika 12. Rezultati analize mikroskopije atomskih sila (AFM) prilikom dokazivanja prisutnosti oligomera A β 42 u preparativnom uzorku. A) Tipičan AFM prikaz površine adsorbiranih čestica polimera. B) Profil presjeka odgovarajućeg odabranog područja iz prikaza A

Rezultati denaturirajuće poliakrilamidne gel elektroforeze (SDS-PAGE), korištene u svrhu dokazivanja prisutnosti A β 42 oligomera u preparaciji iz komercijalno dostupnog liofiliziranog pripravka A β 42 peptida u obliku monomera, prikazani su na Slici 13. Iz gela je vidljivo, prema usporedbi s biljegom, da su u svježem oligomernom pripravku najprisutniji veliki A β oligomeri veličine oko 50 kDa. Uz velike A β oligomere, vidljivi su i dimeri, trimeri i tetrameri u rasponu veličina oko 5 kDa te 16-17 kDa. U starom (pripremljenom unazad 7 dana) oligomernom pripravku, uz dimere, trimere, tetramere i velike A β oligomere, uočena je i prisutnost A β agregata, polimera i fibrila u rasponu veličine od 110 do 260 kDa. Kod fibrilarnog, polimernog, pripravka prisutni su veliki A β oligomeri te agregati, polimeri veličine 110 kDa i fibrili veličine 260 kDa. Dobiveni rezultati potvrđuju prisutnost A β oligomera u pripravku.



Slika 13. Prisutnost oligomera peptida beta amiloid utvrđena denaturirajućom poliakrilamidnom gel elektroforezom (SDS-PAGE)

4.2. Učinak tretmana primarne kulture neurona oligomerima beta amiloida 42

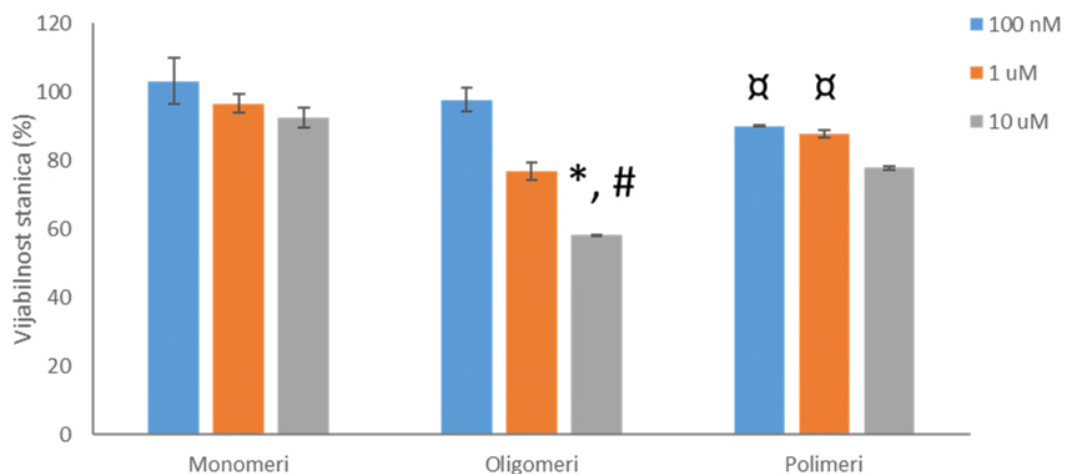
Primarna kultura mišjih neurona je tretirana različitim koncentracijama (100 nM, 1 μ M, 10 μ M) različitih formi beta amiloida 42 (monomeri, oligomeri, polimeri) u trajanju 24, 48 i 72 sata. Rezultati su prikazani kao postotak vijabilnih stanica ili postotak promjene u slučaju oštećenja stanica tretiranih različitim koncentracijama beta amiloida u odnosu na kontrolu koja je bila izložena tretmanu samo odgovarajućim otapalom i to prema sljedećim formulama:

$$\% \text{ vijabilnih stanica} = \frac{\text{vrijednost testa (tretman)}}{\text{vrijednost testa (kontrola)}} \times 100$$

$$\% \text{ oštećenih stanica} = \frac{\text{vrijednost testa (tretman)} - \text{vrijednost testa (kontrola)}}{\text{vrijednost testa (kontrola)}} \times 100$$

4.2.1. Vijabilnost stanica nakon tretmana beta amiloid 42 monomerima, oligomerima i polimerima

Rezultati testa MTT, provedenog na neuronima izoliranim iz embrija C57BL/6 miševa, nakon tretmana različitim koncentracijama (100 nM, 1 μ M, 10 μ M) A β 42 monomera, A β 42 oligomera i A β 42 polimera prikazani su na Slici 14. Kao kontrola su poslužili neuroni koji su pareleno tretirani samo otapalom koje je odgovaralo otapalu pojedinog oblika peptida A β 42, a vrijednosti su iskazane kao postotak u odnosu na vrijednosti dobivene za kontrolni tretman. Iz podataka je vidljivo da su A β 42 monomeri najmanje toksični u svim koncentracijama bez statistički značajne promjene vijabilnosti u odnosu na kontrolu ($F=1,44$; $p=0,324$; ANOVA). Tretman A β 42 oligomerima i A β 42 polimerima je pokazao smanjenje vijabilnosti stanica u odnosu na kontrolu. Kod tretmana A β 42 oligomerima ($F=184,5$; $p<0,001$; ANOVA) i polimerima ($F=111,90$; $p<0,001$; ANOVA) zabilježen je značajan pad vijabilnosti neurona (Slika 14.). Pritom je najznačajniji pad vijabilnosti neurona postignut kod tretmana A β 42 oligomerima u koncentraciji 10 μ M gdje je vijabilnost neurona iznosila oko 60% u odnosu na kontrolne, netretirane stanice. Stoga je taj oblik peptida A β 42 korištena u daljnjim tretmanima neurona kako bi se uspostavio optimalni *in vitro* model Alzheimerove bolesti (AB). Tretman A β 42 polimerima je također doveo do značajnog pada vijabilnosti, a najveća toksičnost postignuta je pri koncentraciji od 10 μ M (Slika 14.).

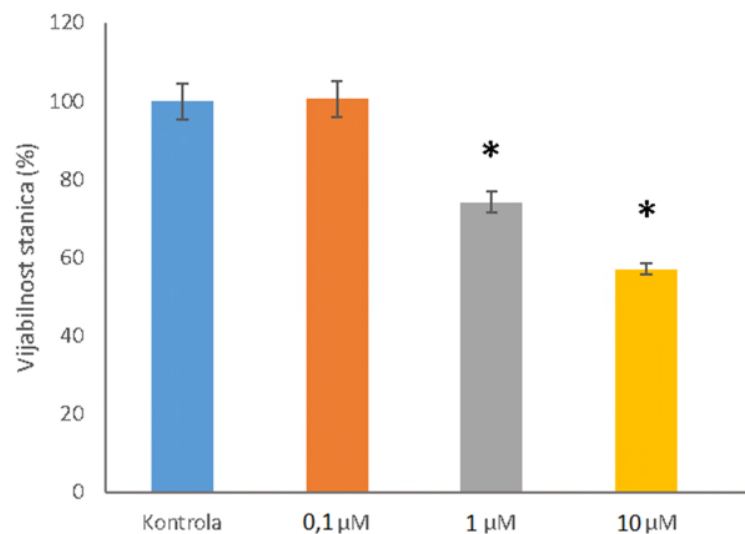


Slika 14. Vijabilnost neurona izoliranih iz embrija C57BL/6 miševa nakon tretmana različitim koncentracijama beta amiloid 42 monomera, oligomera i polimera. Vrijednosti su prikazane kao postotak u odnosu na netretirane stanice i to kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. ($n=6$) * $p<0,001$ prema oligomerima koncentracije 1 μ M, post-hoc Dunett test; # $p<0,001$ prema oligomerima koncentracije 100 nM, post-hoc Dunett test; $^{\#}p<0,001$ prema polimerima koncentracije 10 μ M, post-hoc Dunett test.

4.2.2. Vijabilnost stanica nakon tretmana beta amiloid 42 oligomerima u različitim koncentracijama i vremenskim periodima

U svrhu daljnje optimizacije modela AB-a *in vitro*, testom MTT je ispitan učinak A β 42 oligomera na vijabilnost stanica pri različitim koncentracijama (0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M), primijenjenim tijekom 24, 48 i 72 sata. Kao kontrola su poslužili neuroni koji su paralelno tretirani samo otapalom A β 42 oligomera, a vrijednosti su iskazane kao postotak u odnosu na vrijednosti dobivene za kontrolni tretman.

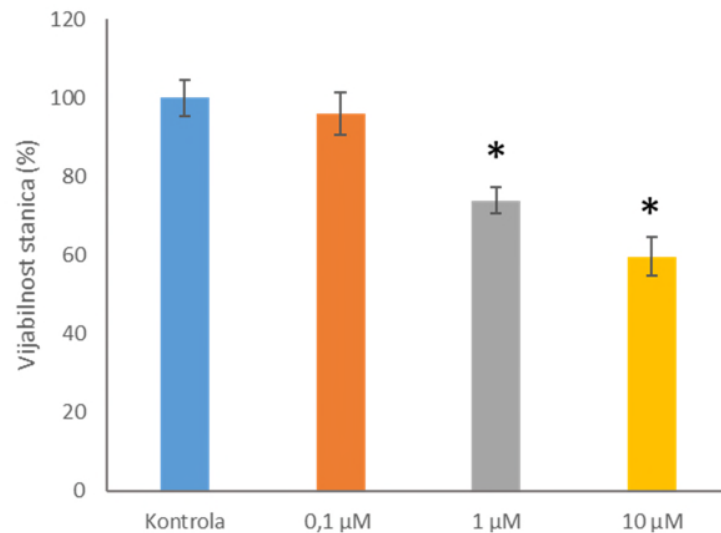
Rezultati testa MTT nakon tretmana neurona A β 42 oligomerima u trajanju 24 sata, pri različitim koncentracijama prikazani su na Slici 15. Rezultati pokazuju da tretman uzrokuje značajno smanjenje vijabilnosti neurona ($F=38,57$; $p<0,001$; ANOVA). Pritom je kod tretmana A β 42 oligomerima u koncentraciji 1 μ M vijabilnost neurona iznosila oko 75%, a s povećanjem koncentracije A β 42 oligomera na 10 μ M vijabilnost se dodatno snizila na oko 60% (Slika 15.).



Slika 15. Vijabilnost neurona izoliranih iz embrija C57BL/6 miševa, tretiranih beta amiloid 42 oligomerima tijekom 24 sata. Vrijednosti su prikazane kao postotak u odnosu na netretirane stanice (Kontrola) i to kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. ($n=6$) * $p<0,001$ prema Kontrolni, post-hoc Dunett test

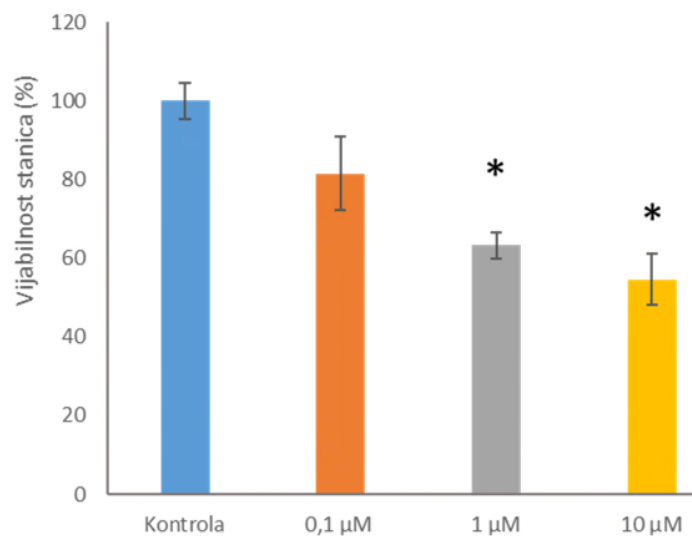
Rezultati testa MTT nakon tretmana neurona A β 42 oligomerima pri različitim koncentracijama, u trajanju 48 sati, prikazani su na Slici 16. Iz rezultata je vidljivo da je tretman uzrokovao statistički značajne ($F=21,47$; $p<0,001$; ANOVA) razlike u vijabilnosti različito tretiranih neurona. Pritom je

vidljiv je trend smanjenja vijabilnosti s povećanjem koncentracije tretmana. Vijabilnost neurona je uz tretman sa 1 μM A β 42 oligomerima iznosila oko 75% a kod primjene 10 μM A β 42 oligomera, vijabilnost je iznosila oko 60% u odnosu na kontrolu.



Slika 16. Vijabilnost neurona izoliranih iz embrija C57BL/6 miševa, tretiranih beta amiloid 42 oligomerima tijekom 48h. Vrijednosti su prikazane kao postotak u odnosu na netretirane stanice (Kontrola) i to kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. (n=6) * p <0,001 prema Kontrolu, post-hoc Dunett test

Rezultati testa MTT nakon tretmana neurona A β 42 oligomerima u trajanju 72 sata, pri različitim koncentracijama prikazani su na Slici 17. Iz rezultata je vidljivo da je tretman uzrokovao značajne razlike ($F=9,32$, $p=0,0002$; ANOVA) u vijabilnosti neurona tretiranih različitim koncentracijama A β 42 oligomera. Vijabilnost stanica je pri tretmanu A β 42 oligomerima u koncentraciji 0,1 μM iznosila oko 80%. Pri koncentraciji od 1 μM vijabilnost je bila snižena na oko 65%, a pri primjeni A β 42 oligomera koncentracije 10 μM vijabilnost je pala na oko 60% u odnosu na kontrolu.



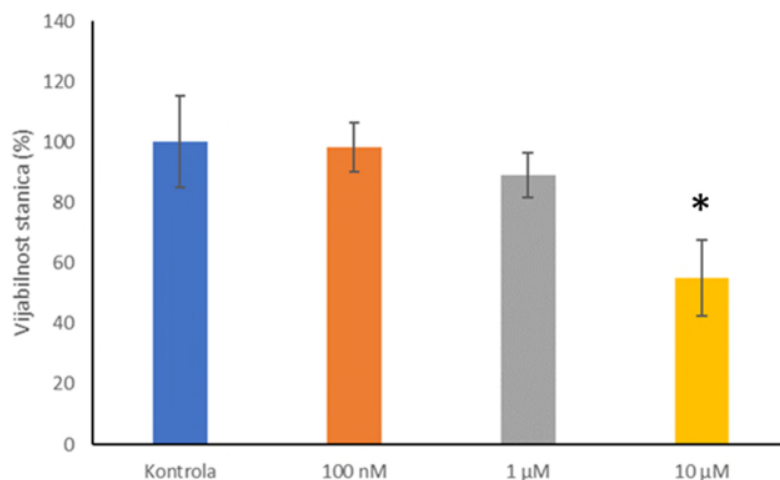
Slika 17. Vijabilnost neurona izoliranih iz embrija C57BL/6 miševa, tretiranih beta amiloid 42 oligomerima tijekom 72 sata. Vrijednosti su prikazane kao postotak u odnosu na netretirane stanice (Kontrola) i to kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. (n=6) * $p < 0,005$ prema Kontrolni, post-hoc Dunett test

Na temelju iznad navedenih rezultata zaključeno je da je tretman A β 42 oligomerima koncentracije 10 μ M u trajanju 24 sata optimalan za postizanje željene toksičnosti u svrhu uspostave modela AB-*a in vitro*.

4.2.3. Vijabilnost i citotoksičnost neurona određena ApoTox-Glo™ Triplex testom nakon tretmana beta amiloid 42 oligomerima

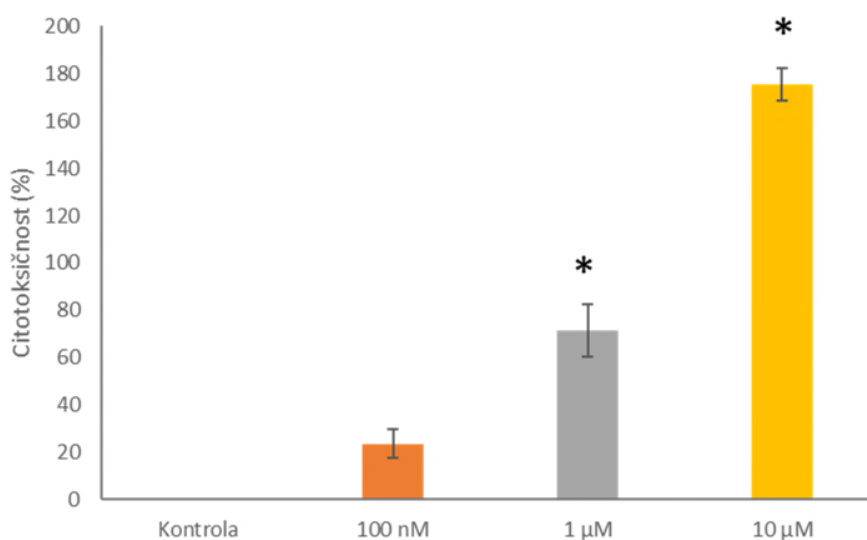
Osim testom MTT, učinak tretmana neurona različitim koncentracijama A β 42 oligomera ispitan je i korištenjem ApoTox-Glo™ Triplex testa za vijabilnost i citotoksičnost. Primarna kultura mišjih neurona tretirana je A β 42 oligomerima pri različitim koncentracijama (100 nM, 1 μ M, 10 μ M), a kao kontrola su poslužile stanice tretirane samo odgovarajućim otapalom.

Rezultati ApoTox-Glo™ Triplex testa prikazani su na Slici 18. Iz rezultata je vidljivo da postoji značajna razlika u vijabilnosti različito tretiranih neurona ($F=9,41$, $p=0,002$; ANOVA). Pritom je primjena A β 42 oligomera pri koncentraciji od 10 μ M uzrokovala pad vijabilnosti u odnosu na kontrolnu skupinu za oko 50% (Slika 19.).



Slika 18. Vijabilnost neurona izoliranih iz embrija C57BL/6 miševa, tretiranih beta amiloid 42 oligomerima različitim koncentracijama. Vrijednosti su prikazane kao postotak u odnosu na netretirane stanice (Kontrola) i to kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. (n=6) * $p=0,003$ prema Kontrolu; post-hoc Dunett test

Rezultati citotoksičnog djelovanja tretmana A β 42 oligomerima ispitanog ApoTox-Glo™ Triplex testom prikazani su na Slici 19. Iz rezultata je vidljivo da primjena A β 42 oligomera ima značajan citotoksični učinak ($F=82,56$, $p<0,001$; ANOVA). U slučaju tretmana A β 42 oligomerima u koncentraciji 1 μ M citotoksičnost je iznosila oko 70%, dok je primjena 10 μ M A β 42 oligomera uzrokovala najveću citotoksičnost (Slika 19.).

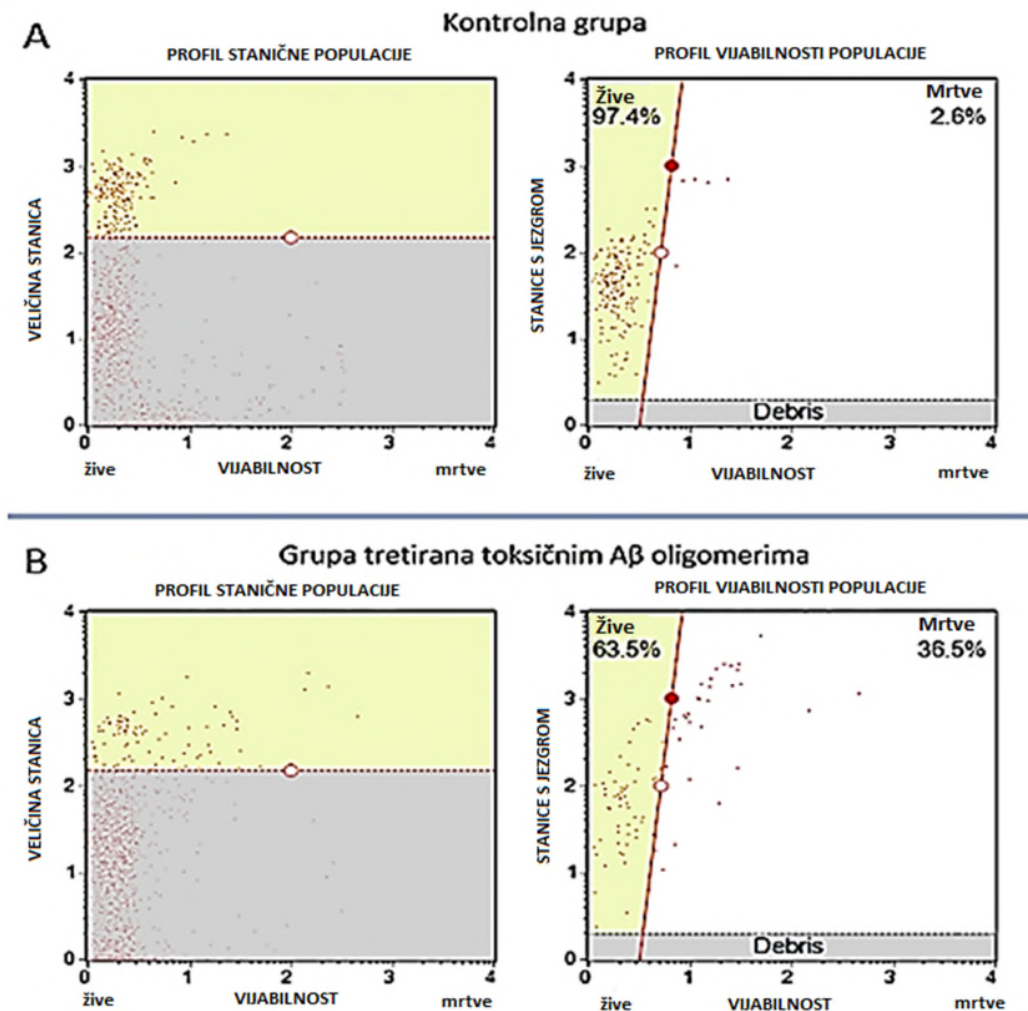


Slika 19. Citotoksičan učinak tretmana beta amiloid 42 oligomerima u različitim koncentracijama kod neurona izoliranih iz embrija C57BL/6 miševa. Vrijednosti su prikazane kao postotak promjene u odnosu

na netretirane stanice (Kontrola) i to kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. (n=6) * $p < 0,002$ prema Kontrolni, post-hoc Dunett test

4.2.4. Vijabilnost tretmana stanica s beta amiloid 42 oligomerima određena Muse® Count & Viability testom

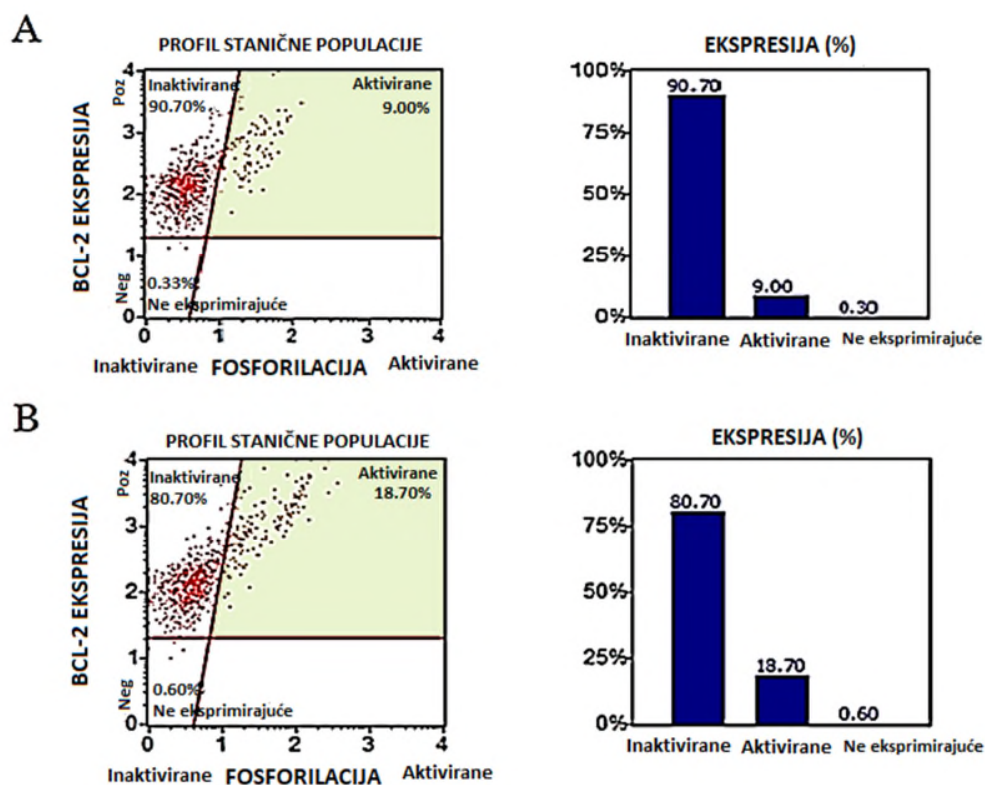
Učinak 24-satnog tretmana neurona A β 42 oligomerima je dodatno ispitana korištenjem protočnog citometra MUSE te su rezultati, izraženi kao udjeli živih i mrtvih stanica, prikazani na Slici 20. U slučaju kontrole tretirane samo otapalom, udio mrtvih stanica iznosi 2,6%, dok u slučaju stanica tretiranih A β 42 oligomerima u koncentraciji 10 μ M kroz 24 sata taj udio iznosi 36,5%. Smanjena vijabilnost tretiranih neurona implicira neurotoksičnost primjenjenog tretmana.



Slika 20. Vijabilnost neurona tretiranih otapalom (A) i beta amiloid 42 oligomerima (10 μ M) (B) kroz 24 sata određena testom Muse® Count & Viability. (n=6) Tretman beta amiloid 42 oligomerima izaziva povećanje udjela mrtvih stanica u primarnoj kulturi mišjih neurona s 2,6% (A) na 36,5% (B).

4.2.5. Aktivnost BCL-2 proteina nakon tretmana primarne kulture neurona beta amiloid 42 oligomerima

Kako bi se ispitaio proapoptotski učinak tretmana neurona A β 42 oligomerima, korišten je Muse® BCL-2 Activation Dual Detection test. Rezultati ispitivanja aktivnosti BCL-2 proteina nakon 24-satnog tretmana neurona A β 42 oligomerima u koncentraciji 10 μ M su prikazani na Slici 21. U slučaju kontrole tretirane otapalom tijekom 24 sata, udio stanica s neaktiviranim proteinom BCL-2 je bio 90,7%, aktiviranih stanica koje sadrže fosforilirani protein BCL-2 zabilježeno je 9%, dok 0,3% stanica nije ekspresiralo protein BCL-2. U slučaju 24-satnog tretmana A β 42 oligomerima koncentracije 10 μ M vidljiv je blagi porast fosforilacije proteina BCL-2, odnosno aktiviranih stanica, na 18,7%. Prikazana promjena ekspresije regulatora apoptoze BCL-2 upućuju na to da oligomeri A β 42 u neuronima aktiviraju BCL-2 apoptotski signalni put.



Slika 21. Aktivacija BCL-2 proteina u neuronima tretiranim (A) otapalom peptida beta amiloida i (B) beta amiloid 42 oligomerima koncentracije 10 μ M, određena testom Muse® BCL-2 Activation Dual Detection.

(n=6) Tretman beta amiloid 42 oligomerima izaziva porast fosforilacije proteina BCL-2 u primarnoj kulturi mišjih neurona s 9% (A) na 18,7% (B).

4.3. Učinak kotretmana primarne kulture neurona oligomerima beta amiloid 42 i moždanim neurotrofnim čimbenikom

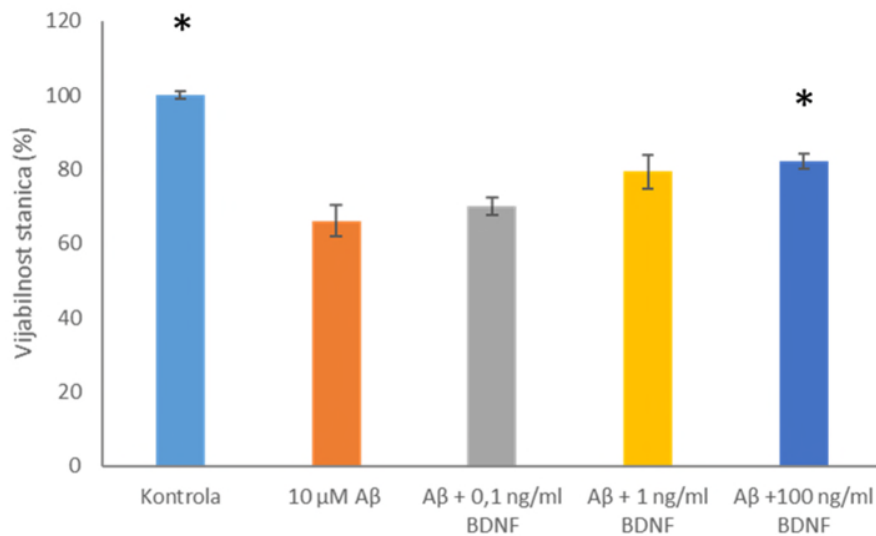
Rezultati su prikazani kao postotak vijabilnih stanica ili postotak promjene u slučaju mjerenja kaspazne aktivnosti u odnosu na kontrolu koja je bila izložena tretmanu samo odgovarajućim otapalom i to prema sljedećim formulama:

$$\% \text{ vijabilnih stanica} = \frac{\text{vrijednost testa (tretman)}}{\text{vrijednost testa (kontrola)}} \times 100$$

$$\% \text{ kaspazna aktivnost} = \frac{\text{vrijednost testa (tretman)} - \text{vrijednost testa (kontrola)}}{\text{vrijednost testa (kontrola)}} \times 100$$

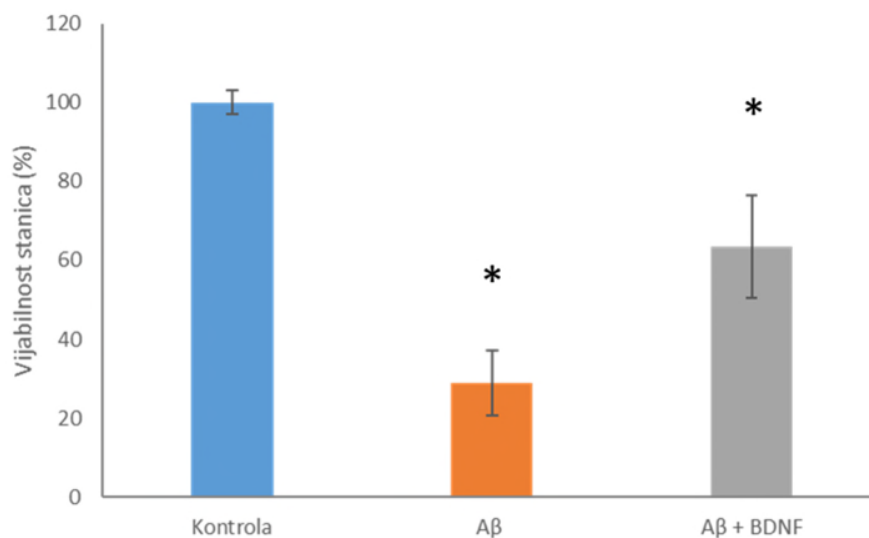
4.3.1. Vijabilnost stanica nakon kotretmana beta amiloid 42 oligomerima i moždanim neurotrofnim čimbenikom

Rezultati testa MTT nakon kotretmana neurona BDNF-om i A β 42 oligomerima, tijekom 24 sata, u svrhu ispitivanja potencijalnog neuroprotektivnog djelovanja BDNF-a, prikazani su na Slici 22. Kotretman uključuje primjenu A β 42 oligomera u koncentraciji 10 μ M te BDNF-a u koncentracijama 0,1 ng/mL, 1 ng/mL i 100 ng/mL. Iz rezultata je vidljiva značajna razlika u metaboličkoj aktivnosti kontrolnih i neurona izloženih kotretmanu BDNF-om i A β 42 oligomerima ($F=17,96$; $p<0,001$; ANOVA). Neuroprotektivni učinak je najizraženiji pri koncentraciji BDNF-a od 100 ng/mL gdje se vijabilnost stanica vraća na oko 80% u odnosu na netretirane kontrolne stanice (Slika 21.).



Slika 22. Protektivni učinak moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF) pri 0,1, 1 i 100 ng/mL, kod neurona izoliranih iz embrija C57BL/6 miševa tretiranih tijekom 24 sata oligomerima beta amiloida 42 (Aβ) koncentracije 10 μM. Vrijednosti su prikazane kao postotak u odnosu na netretirane stanice (Kontrola) i to kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. (n=6) * $p < 0,040$ prema tretmanu Aβ koncentracije 10 μM, post-hoc Dunett test

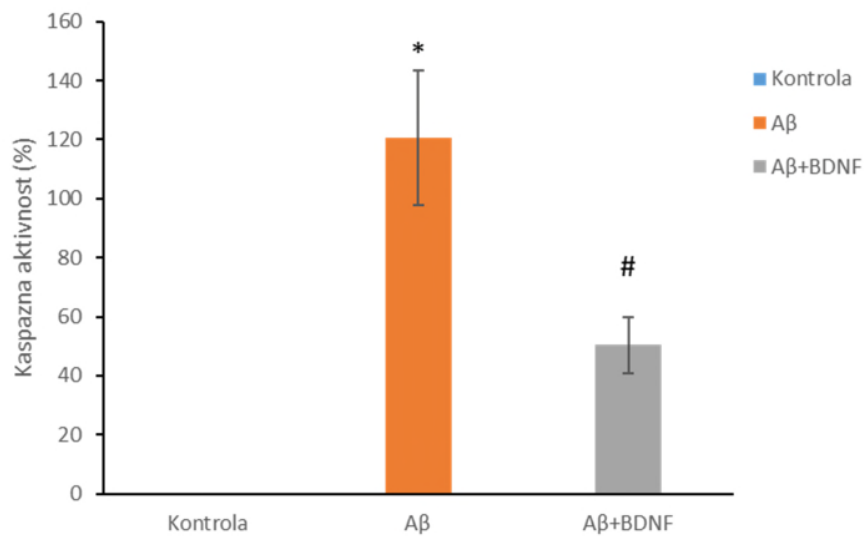
Neuroprotektivni učinak BDNF-a je indiciran i rezultatima daljnjeg testa MTT provedenog nakon 24-satnog kotretmana primarne kulture neurona BDNF-om u koncentraciji 100 ng/mL i Aβ42 oligomerima koncentracije 10 μM (Slika 23.). Rezultati upućuju na značajno različitu vijabilnost neurona izloženih različitim oblicima tretmana ($F=26,56$; $p < 0,001$; ANOVA). Pritom je uočena veća vijabilnost neurona izloženih kotretmanu (oko 60%) u odnosu na neurone tretirane samo Aβ42 oligomerima gdje vijabilnost iznosi oko 30% (Slika 22.).



Slika 23. Protektivni učinak moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF) koncentracije 100 ng/mL kod neurona izoliranih iz embrija C57BL/6 miševa tretiranih tijekom 24 sata beta amiloida 42 oligomerima (A β) koncentracije 10 μ M. Vrijednosti su prikazane kao postotak u odnosu na netretirane stanice (Kontrola) i to kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. (n=6) * p <0,004 prema Kontrolni, post-hoc Dunett test

4.3.2. Kaspazna aktivnost neurona uslijed tretmana oligomerima beta amiloida i moždanim neurotrofnim čimbenikom

Potencijalni antiapoptotski učinak tretmana BDNF-om ispitan je mjerenjem kaspazne aktivnosti u neuronima tretiranim A β 42 oligomerima i BDNF-om i uspoređen s kontrolnim neuronima tretiranim samo odgovarajućim otapalom. Rezultati su uputili na značajnu razliku ($F=32,63$, $p=0,003$; ANOVA) u kaspaznoj aktivnosti između kontrolnih i neurona podvrgnutih različitim tretmanima (Slika 24.). Pritom je uočeno značajno povećanje kaspazne aktivnosti neurona tretiranih oligomerima A β 42 u odnosu na kontrolne neurone. U slučaju kotretmana BDNF-om i oligomerima A β 42, rezultati su pokazali značajan učinak na smanjenje kaspazne, i posredno apoptotske, aktivnosti u odnosu na stanice tretirane samo oligomerima A β 42.



Slika 24. Promjena kaspazne aktivnosti u neuronima izoliranim iz embrija C57BL/6 miševa uslijed kotretmana oligomerima beta amiloid 42 (A β) koncetracije 10 μ M i moždanim neurotrofnim čimbenikom (BDNF) koncetracije 100 ng/mL. Vrijednosti su prikazane kao postotak promjene u odnosu na netretirane stanice (Kontrola) i to kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. (n=6) * $p=0,037$ prema Kontroli, post-hoc Dunett test; # $p=0,012$ prema tretmanu A β , post-hoc Dunett test

5. RASPRAVA

S obzirom na neprekidno rastući broj oboljelih od Alzheimerove bolesti i težinu kliničke slike koju uzrokuje, postoji sve veća potreba za pronalaženjem prikladne terapije i unaprjeđenjem postojećih medicinskih pristupa. Zbog dokazanog zaštitnog djelovanja BDNF-a na neuronsku toksičnost uzrokovanu peptidom A β (Arancibia i sur., 2008; Kitiyanant i sur., 2012), primjena BDNF-a je jedan od potencijalnih terapijskih pristupa za AB. Cilj ovog rada bio je ispitati potencijalni učinak BDNF-a u prevenciji stanične smrti, odnosno promicanju preživljenja neurona, primjenom primarne kulture mišjih neurona tretiranih oligomerima A β 42 kao modelom Alzheimerove bolesti *in vitro*.

Rezultati testova kojima je u ovom istraživanju ispitana vijabilnost stanica, potvrdili su postignute uvjete modela AB-a *in vitro* primjenom 10 μ M A β 42 oligomera tijekom 24 sata, čime je omogućeno provođenje daljnjih testova. Navedeni rezultati (Slika 14.) su u skladu sa dosadašnjim istraživanjima (Kitiyanant i sur., 2012) koja su pokazala da tretman A β 1-42 monomernim, oligomernim i fibrilarnim A β 1-42 peptidima rezultira padom vijabilnosti ovisnim o koncentraciji, u rasponu 0,1-10 μ M. Izlaganje 10 μ M A β 42 oligomerima je izazvalo najveću toksičnost (Slika 15., Slika 16., Slika 17., Slika 18., Slika 19., Slika 20.). U ovom radu je pokazano da, u odnosu na tretmane monomerima i polimerima, najveći utjecaj na vijabilnost neurona ima primjena oligomera A β 42 (Slika 14.) kao što su pokazali Cizas i sur. (2010). Naime, njihovi rezultati pokazuju da sintetički pripremljeni oligomeri uzrokuju smanjenje vijabilnosti neurona štakora za 40% u usporedbi s vijabilnošću kontrolnih kultura nakon 24-satne inkubacije, dok monomeri i fibrili nisu imali utjecaja na vijabilnost kortikalnih neurona. Također, Dahlgren i sur. (2001) su ispitali učinak oligomernih i fibrilarnih vrsta peptida A β na vijabilnost stanica mišjih neuroblastoma nakon izlaganja u trajanju 20 sati. Pri tome su pokazali da tretman oligomerima A β 42 značajno smanjuje vijabilnost neurona u usporedbi s fibrilarnim i neagregiranim vrstama pri 0,01, 0,1 i 1,0 μ M. Nadalje, Resende i sur. (2008) su u primarnoj kulturi embrionalnih kortikalnih neurona štakora tretiranoj sa svježim ili starim A β 1-42 oligomerima, pokazali da su obje vrste toksične za neurone, dok su svježiji preparati toksičniji. Uzorci obogaćeni oligomerima izazvali su značajno veće smanjenje vijabilnosti stanica i veće povećanje apoptotske smrti od A β 1-42 preparata obogaćenim fibrilima.

U svrhu ispitivanja učinka tretmana mišjih neurona oligomerima A β 42, u ovom je radu potvrđena promjena ekspresije proteina BCL-2 (Slika 21.), inače regulatora apoptoze, s 9% na 18,7% nakon tretmana oligomerima A β 42 u koncentraciji od 10 μ M što ukazuje na aktivaciju BCL-2 signalnog apoptotskog puta u tretiranim stanicama. Osim što dobiveni rezultat potvrđuje toksični učinak primjene 10 μ M A β 42 oligomera, također navodi na zaključak da opisani tretman djeluje na način da izaziva apoptozu tretiranih neurona. Istraživanje provedeno na primarnoj kulturi ljudskih neurona (Paradis i sur., 1996) pokazalo je da primjena oligomera A β 42 u koncentraciji 100 nM smanjuje razinu BCL-2 i povećava razinu BAX proteina, te time mijenja anti-apoptotsku zaštitnu ravnotežu i povećava osjetljivost tih stanica na oksidativni stres. Mehanizam apoptoze nadziran proteinom BCL-2 još se naziva i unutarnjim ili mitohondrijskim putem apoptoze (Wang, 2001) te ga nadziru pro- i anti-apoptotski članovi velike obitelji proteina BCL-2. U zdravim stanicama anti-apoptotski proteini, poput proteina BCL-2, BCL-XL (od engl. *B-cell lymphoma-extra large*), MCL-1 (od engl. *Myeloid cell leukemia-1*), BCL-W (od engl. *B-cell lymphoma-W*), smještenih u vanjskoj membrani mitohondrija, održavaju preživljenje stanica inhibirajući aktivnost izvršnih pro-apoptotskih proteina BAX i BAK (od engl. *BCL-2 homologous antagonist/killer*), odgovornih za staničnu smrt (Kelly i Strasser, 2020). Kao odgovor na unutarstanični stres, kao što su nedostatak čimbenika rasta, oštećenje DNA ili pogreške u smatanju proteina, dolazi do transkripcijskog ili posttranskripcijskog povećanja proteina koji imaju samo domenu BH3 (od engl. *Bcl-2 Homology 3*) kao što su PUMA (od engl. *p53 upregulated modulator of apoptosis*), BID (od engl. *BH3-interacting domain death agonist*), BAD (*BCL2 Associated Agonist Of Cell Death*), HRK (od *harakiri*) i BIK (od engl. *BCL2 Interacting Killer*) (Puthalakath i Strasser, 2002). Pritom se proteini koji sadrže samo domenu BH3 visokim afinitetom vežu za anti-apoptotske proteine porodice BCL-2 proteine i dovode do oslobađanja proteina BAX i BAK čijom aktivacijom dolazi do stvaranja oligomera. Ovi oligomeri izazivaju permeabilizaciju vanjske membrane mitohondrija što vodi ka oslobađanju citokroma C te pro-apoptotskog mitohondrijskog proteina Smac/DIABLO (od engl. *Second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI*) u citosol. U citosolu Smac/DIABLO djeluje kao antagonist inhibitora apoptoze (IAP) te na taj način omogućava aktivaciju kaspaza koje dalje cijepaju niz staničnih proteina i omogućuju odvijanje apoptoze (Wang, 2001).

Sukladno rezultatima dosadašnjih istraživanja (Arancibia i sur. 2008), u ovom istraživanju je pokazano da kotretman BDNF-om na modelu Alzheimerove bolesti *in vitro* dovodi do povećane

vijabilnosti tretiranih neurona u odnosu na stanice tretirane samo oligomerima A β 42 (Slika 22., Slika 23.). Najveća vijabilnost postignuta je pri koncentraciji od 100 ng/mL BDNF-a. Arancibia i sur. (2008) su pokazali da BDNF ima zaštitne učinke na neurone kod toksičnog djelovanja peptida A β *in vivo* i *in vitro*. BDNF je značajno zaštitio kortikalne neurone od toksičnog učinka A β 1–42 i A β 25–35 primijenjenih u koncentraciji 20 μ M. U istom tom istraživanju je također potvrđeno da je zaštita ovisna o dozi (Pike i sur., 1995; Yao i sur., 2005; Geci i sur., 2007) te je značajna pri koncentraciji BDNF-a 10 ng/mL, a maksimalna pri 50 ng/mL za toksičnost izazvanu A β 25–35. Ipak, zaštita od toksičnosti izazvane A β 25–35 je bila djelomična (oko 80%) dok je pri 50 ng/mL bila potpuna za toksičnost izazvanu A β 1–42. Pri 100 ng/mL, zaštitni učinak BDNF-a je nadmašio kontrolnu skupinu, vjerojatno zaštitom stanica od prirodne smrti. Slično tome, Kitiyanant i sur. (2012) su tretirali kulture septalnih neurona štakora BDNF-om i u ko-kulturi s genetski modificiranim ljudskim neuralnim progenitorskim stanicama (hNPC) koje su izlučivale neurotrofne čimbenike. Rezultati su pokazali da su u oba slučaja kulture neurona bile zaštićene od smrti stanice izazvane oligomernim peptidom A β 1–42. Prema tome, pomoću hNPC bi se potencijalno mogli oslobađati neurotrofni čimbenici izravno u mozak zahvaćen AB-om. Daljnje studije na životinjskim modelima AB-a su potrebne za potvrdu potencijala *in vivo*.

Kako je u ovom istraživanju pokazano da tretman oligomerima A β 42 izaziva neurotoksične učinke tako što potiče i apoptozu tretiranih stanica (Slika 21.), ispitan je učinak kotretmana oligomerima A β 42 i BDNF-om na proces apoptoze u tretiranim stanicama prateći aktivnost kaspaza 3 i 7 u tretiranim i kontrolnim neuronima. Kaspaze 3 i 7 su efektorne kaspaze koje uslijed dokidanja aktivnosti IAP-a cijepaju široki set proteina što rezultira karakterističnim morfološkim i biokemijskim obilježjima apoptoze kao što su izlaganje fosfatidilserina, kondenzacija jezgre i fragmentacija genomske DNA (Lamkanfi i Kanneganti, 2010). Dvije kaspaze imaju preklapajuće, ali i različite uloge u apoptozu. Tako je na primjer pokazano da je kaspaza 3, a ne kaspaza 7, ključna za pojavu određenih karakteristika apoptoze kao što je fragmentacija DNA i cijepanje poli-(ADP-ribozil) polimeraze 1 kod apoptoze mišjih embrionalnih fibroblasta izazvane izlaganju UV svjetlu (Lakhani et al., 2006). Osim toga, biokemijska istraživanja pokazala su da postoje razlike u afinitetu kaspaza 3 i 7 prema različitim vrstama proteina pri čemu je kaspaza 7 selektivnija, ali se cijepanje određenih supstrata, poput košaperona p23, događa češće djelovanjem kaspaze 7 nego kaspaze 3 (Walsh et al., 2008). Rezultati ispitivanja aktivnosti kaspaza u ovom istraživanju pokazala su njihovu značajno smanjenu aktivnost nakon tretmana neurona BDNF-om (Slika 24.) i

time dodatno potvrdili neuroprotektivan učinak BDNF-a, što je u skladu s očekivanjima i dosadašnjim istraživanjima (Marin i sur., 2000; Arancibia i sur., 2008; Resende i sur., 2008; Kitiyanant i sur., 2012). Naime, Marin i sur. (2000) pokazali su da A β 25–35 inducira apoptozu stanica preko aktivacije kaspaze 3 u kulturi kortikalnih neurona štakora. Osim toga, Resende i sur. (2008) su pokazali da se rana aktivacija apoptoze javlja nakon izlaganja svježem A β 1-42. Ispitivanje aktivnosti kaspaze 3, efektorske kaspaze u putu apoptotske stanične smrti, pokazalo je da tretman svježim A β 42 koncentracije 5 mol/L u kortikalnim neuronima inducira aktivaciju kaspaze 3 nakon 12 sati. Sličan učinak neurotrofina je pokazan u rezultatima Calissano i sur. (2008) koji su ispitali učinak deprivacije NGF-a u primarnim hipokampalnim i kortikalnim neuronima te ustanovili da se nakon uklanjanja NGF-a aktivira amiloidogeni put s posljedičnim unutarstaničnim i izvanstaničnim nakupljanjem peptida A β i apoptotskom smrću.

Pokazano je da BDNF u hipokampalnim (Zeng i sur., 2010) ili entorinalnim kortikalnim rezovima (Criscuolo i sur., 2015) također sprječava poremećaj dugoročnog potenciranja induciranog s A β 1-42. Nedostaju informacije o mogućim učincima BDNF-a na proizvodnju A β i međureakciju BDNF-a i proteina Tau (Tanila, 2017). Jedno istraživanje sugerira da BDNF promiče obradu APP prema putu α -sekretaze u staničnim linijama neurona (Holback, 2005), ali nema podataka o učincima BDNF-a na obradu APP u primarnim neuronima (Tanila, 2017). Također, pretpostavlja se da bi signalizacija BDNF putem receptora TrkB i aktivacija puta PI3K-Akt trebala prigušiti aktivnost glikogen-sintaza-kinaze 3 β svojom inhibitornom fosforilacijom (Tanila, 2017). Elliott i sur. (2005) su uočili defosforilaciju tau na nekoliko mjesta, uključujući uobičajeno mjesto AT8 povezano s AB, u neuronskim stanicama nakon stimulacije BDNF-om. Pokazalo se da je učinak posredovan putem PI3K-Akt, međutim potrebno je istražiti može li se isti učinak pronaći u primarnim neuronima (Tanila, 2017). Tanila (2017) je također pokazao da razine BDNF-a u mozgu mogu ovisiti o rezultirajućem A β agregacijskom stanju. Osim toga, Peng i sur. (2009) su otkrili povezanost između smanjene razine BDNF-a i povećane razine velikih A β oligomera. Također, Rantamäki i sur. (2013) su utvrdili da se imunoreaktivnost BDNF-a koncentrira oko amiloidnih plakova, što sugerira da se BDNF može 'zarobiti' u amiloidnim plakovima, gdje nije dostupan neuronima za svoje primarne funkcije. To također implicira da funkcionalna razina BDNF-a u području mozga gdje su plakovi može biti niža od ukupne razine BDNF-a (Tanila, 2017). Pad razine BDNF-a u mozgu vjerojatno ne uzrokuje amiloidnu ili tau patologiju, ali čini se da doprinosi smanjenoj sinaptičkoj plastičnosti i pamćenju u AB-u (Tanila, 2017).

Rezultati dobiveni u ovom istraživanju (Slika 22., Slika 23.) potvrđuju potencijal BDNF-a u prevenciji stanične smrti, vjerojatno uključujući i mehanizme programirane stanične smrti (Slika 24.), te sukladno tome ukazuju na potrebu daljnjih istraživanja kojima će se utvrditi točni mehanizmi djelovanja BDNF-a na ublažavanje neurotoksičnih učinaka uzrokovanih oligomerima A β . Značajna promjena vijabilnosti nakon kotretmana neurona BDNF-om ukazuje na potrebu za ulaganje daljnjih napora u zaobilaženje problema farmakokinetike BDNF-a (Tanila, 2017) prikladne za sustavnu primjenu. S obzirom da je ovo istraživanje provedeno na modelu *in vitro* koji obuhvaća samo utjecaj oligomera A β , buduća istraživanja bi trebala uz navedeno sadržavati i karakteristike tau patologije koja je također ključna značajka Alzheimerove bolesti.

6. ZAKLJUČAK

Uspostavljena je primarna kultura kortikalnih neurona miša soja C57BL/6.

Testovi metaboličke aktivnosti i vijabilnosti stanica te testovi citotoksičnosti su pokazali da je optimalni model AB-a *in vitro* uspostavljen primjenom 10 μ M A β 42 oligomera tijekom 24 sata, u kulturi kortikalnih neurona miša soja C57BL/6.

Mjerenjem aktivnosti proteina BCL-2 je utvrđena povećana apoptotska aktivnost u uspostavljenom modelu AB-a *in vitro*.

Mjerenjem vijabilnosti stanica i kaspazne aktivnosti pokazano je da BDNF primjenjen pri koncentraciji od 100 ng/mL, tijekom 24 sata, djeluje neuroprotektivno te takva njegova primjena smanjuje apoptotsku aktivnost na modelu AB-a *in vitro*.

7. LITERATURA

Aarsland D, Andersen K, Larsen JP, Lolk A (2003): Prevalence and Characteristics of Dementia in Parkinson Disease: An 8-Year Prospective Study. *Archives of Neurology*, 60, 387–392.

Ancot F, Foveau B, Lefebvre J, Leroy C, Tulasne D (2009): Proteolytic cleavages give receptor tyrosine kinases the gift of ubiquity. *Oncogene* 28, 2185–2195.

Arancibia S, Silhol M, Moulière F, Meffre J, Höllinger I, Maurice T, Tapia-Arancibia L (2008): Protective effect of BDNF against beta-amyloid induced neurotoxicity in vitro and in vivo in rats. *Neurobiology of Disease*, 31(3), 316-326.

American Psychiatric Association (2013): Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.). Arlington, VA.

Apostolova LG, Dutton RA, Dinov ID (2007): Conversion of mild cognitive impairment to Alzheimer disease predicted by hippocampal atrophy maps. *Archives of Neurology*, 63, 693-699.

Apostolova LG (2016): Alzheimer disease. *Continuum Lifelong Learning in Neurology*, 22, 419–434.

Bang J, Spina S, Miller BL (2015): Frontotemporal dementia. *Lancet*, 386, 1672-1682.

Beeri MS, Sonnen J (2016): Brain BDNF expression as a biomarker for cognitive reserve against Alzheimer disease progression. *Neurology*, 86, 702–703.

Binder DK, Scharfman HE (2004): Mini Review. *Growth Factors*, 22(3), 123-131

Blurton-Jones M, Kitazawa M, Martinez-Coria H, Castello NA, Müller FJ, Loring JF, Yamasaki TR, Poon WW, Green KN, LaFerla FM (2009): Neural stem cells improve cognition via BDNF in a transgenic model of Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 13594-13599.

- Boado RJ, Zhang Y, Zhang Y, Pardridge WM (2007): Genetic engineering, expression, and activity of a fusion protein of a human neurotrophin and a molecular Trojan horse for delivery across the human blood-brain barrier. *Biotechnology and Bioengineering*, 97, 1376-1386.
- Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME (1999): Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science*, 286, 1358–1362.
- Brunet A, Datta SR, Greenberg ME (2001): Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Current Opinion in Neurobiology*, 11, 297–305.
- Burbach GJ, Hellweg R, Haas CA, Del Turco D, Deicke U, Abramowski D, Jucker M, Staufenbiel M, Deller T (2004): Induction of brain-derived neurotrophic factor in plaque-associated glial cells of aged APP23 transgenic mice. *Journal of Neuroscience*, 24, 2421-2430.
- Busse A, Hensel A, Gühne U, Angermeyer MC, Riedel-Heller SG (2006): Mild cognitive impairment: long-term course of four clinical subtypes. *Neurology*, 67, 2176-2185.
- Calderon J, Perry RJ, Erzinclioglu SW (2001): Perception, attention, and working memory are disproportionately impaired in dementia with Lewy bodies compared with Alzheimer's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 70(2), 157–164.
- Calderon-Garciduenas AL, Duyckaerts C (2018): Alzheimer disease. *Handbook of Clinical Neurology* 145, 325-337.
- Calero M, Gómez-Ramos A, Calero O, Soriano E, Avila J, Medina M (2015): Additional mechanisms conferring genetic susceptibility to Alzheimer's disease. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9, 138.
- Cash DM, Ridgway GR, Liang Y (2013): The pattern of atrophy in familial Alzheimer disease Volumetric MRI results from the DIAN study. *Neurology*, 81, 1425-1433.
- Chao M, Bothwell M (2002): Neurotrophins: To Cleave or Not to Cleave. *Neuron*, 33(1), 9-12.
- Chang BS, Minn AJ, Muchmore SW, Fesik SW, Thompson CB (1997): Identification of a novel regulatory domain in Bcl-xL and BCL-2. *EMBO Journal*, 16, 968–977.

- Chételat G, Desgranges B, De la Sayette V, Viader F, Eustache F, Baron JC (2003): Mild cognitive impairment: can FDG-PET predict who is to rapidly convert to Alzheimer's disease? *Neurology*, 60, 1374-1377.
- Cho K, Cho MH, Seo JH, Peak J, Kong KH, Yoon SY, Kim DH (2015): Calpain-mediated cleavage of DARPP-32 in Alzheimer's disease. *Aging Cell*, 14, 878–886.
- Chouraki V, Seshadri S (2014): Chapter Five - Genetics of Alzheimer's Disease, *Advances in Genetics, Academic Press*, 87, 245-294.
- Cizas P, Budvytyte R, Morkuniene R, Moldovan R, Broccio M, Lösche M, Niaura G, Valincius G, Borutaite V (2010): Size-dependent neurotoxicity of beta-amyloid oligomers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 496(2), 84-92.
- Coelho FGM, Vital TM, Stein AM, Arantes FJ, Rueda AV, Camarini RTE, Santos-Galduróz RF (2014): Acute Aerobic Exercise Increases Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels in Elderly with Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 39(2), 401-408.
- Collerton D, Burn D, McKeith I, O'Brien J (2003): Systematic review and meta-analysis show that dementia with Lewy bodies is a visual-perceptual and attentional-executive dementia. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 16(4), 229–237.
- Conner JM, Lauterborn JC, Yan Q, Gall CM, Varon S (1997): Distribution of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Protein and mRNA in the Normal Adult Rat CNS: Evidence for Anterograde Axonal Transport. *Journal of Neuroscience*, 17(7), 2295-2313.
- Connor B, Young D, Lawlor P, Gai W, Waldvogel H, Faull RLM, Dragunow M (1996): Trk receptor alterations in Alzheimer's disease. *Molecular Brain Research*, 42(1), 1-17.
- Criscuolo C, Fabiani C, Bonadonna C, Origlia N, Domenici L (2015): BDNF prevents amyloid-dependent impairment of LTP in the entorhinal cortex by attenuating p38 MAPK phosphorylation. *Neurobiology of Aging*, 36(3), 1303-1309.
- Dahlgren KN, Manelli AM, Blaine SW, Baker LK, Krafft GA (2002): Oligomeric and Fibrillar Species of Amyloid- β Peptides Differentially Affect Neuronal Viability. *Journal of Biological Chemistry*, 277(35), 32046-32053.

- Dan S, Sharma D, Rastogi K, Shaloo, Ojha H, Pathak M, Singhal R (2021): Therapeutic and Diagnostic Applications of Nanocomposites in the Treatment Alzheimer's Disease Studies. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 12, 940-960.
- DaRocha-Souto B, Coma M, Perez-Nievas BG, Scotton TC, Siao M, Sanchez-Ferrer P, Hashimoto T, Fan Z, Hudry E, Barroeta I (2012): Activation of glycogen synthase kinase-3 β mediates β -amyloid induced neuritic damage in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, 45, 425–437.
- Das S, Basu A (2008): Inflammation: a new candidate in modulating adult neurogenesis. *Journal of Neuroscience Research*, 86, 1199-1208.
- Davis J, Couch R (2014): Strategizing the Development of Alzheimer's Therapeutics. *Advances in Alzheimer's Disease*, 3, 107-127.
- De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K (1998): Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature*, 391, 387–390.
- Del-Ser T, Munoz DG, Hachinski V (1996): Temporal pattern of cognitive decline and incontinence is different in Alzheimer's disease and diffuse Lewy body disease. *Neurology*, 46, 682–686.
- Devi L, Ohno M (2015): TrkB reduction exacerbates alzheimer's disease-like signaling aberrations and memory deficits without affecting β -amyloidosis in 5xFAD mice. *Translational Psychiatry*, 5, 562.
- Dickerson BC, Sperling RA, Hyman BT, Albert MS, Blacker D (2007): Clinical prediction of Alzheimer disease dementia across the spectrum of mild cognitive impairment. *Archives of General Psychiatry* 64, 1443-1450.
- Di Carlo A, Lamassa M, Baldereschi M (2007): CIND and MCI in the Italian elderly: frequency, vascular risk factors, progression to dementia. *Neurology*, 68, 1909-1916.
- Drzezga A, Grimmer T, Riemenschneider M (2005): Prediction of individual clinical outcome in MCI by means of genetic assessment and (18)F-FDG PET. *Journal of Nuclear Medicine*, 46, 1625-1632.

Eide FE, Vining ER, Eide BL, Zang K, Wang XY, Reichardt LF (1996): Naturally Occurring Truncated trkB Receptors Have Dominant Inhibitory Effects on Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling. *Journal of Neuroscience*, 6(10), 3123-3129.

Elliott E, Atlas R, Lange A, Ginzburg I (2005): Brain-derived neurotrophic factor induces a rapid dephosphorylation of tau protein through a PI-3 kinase signalling mechanism. *European Journal of Neuroscience*. 22, 1081–1089.

Engler H, Forsberg A, Almkvist O, Blomquist G, Larsson E, Savitcheva I, Wall A, Ringheim A, Långström B, Nordberg A (2006): Two-year follow-up of amyloid deposition in patients with Alzheimer's disease. *Brain*, 129, 2856-2866.

Erickson KI, Voss MW, Prakash RS, Basak C, Szabo A, Chaddock L, Kim JS, Heo S, Alves H, White SM, Wojcicki TR, Mailey E, Vieira VJ, Martin SA, Pence BD, Woods JA, McAuley E, Kramer AF (2011): Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(7), 3017-3022.

Erkiniuntii T (1987): Types of multi-infarct dementia. *Acta Neurologica Scandinavica*, 75, 391-399.

Ferrer I, Marín M, Rey MJ, Ribalta T, Goutan E, Blanco R, Tolosa E, Martí E (1999): BDNF and Full-length and Truncated TrkB Expression in Alzheimer Disease. Implications in Therapeutic Strategies. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 58(7), 729–739.

Forsberg A, Engler H, Almkvist O, Blomquist G, Hagman G, Wall A, Ringheim A, Långström B, Nordberg A (2008): PET imaging of amyloid deposition in patients with mild cognitive impairment. *Neurobiology of Aging*, 29, 1456-1465.

Fryer RH, Kaplan DR, Kromer LF (1997): Truncated trkB Receptors on Nonneuronal Cells Inhibit BDNF-Induced Neurite Outgrowth in Vitro. *Experimental Neurology*, 148(2), 616-627.

Gazzaley A, Cooney J, Rissman J (2005): Top-down suppression deficit underlies working memory impairment in normal aging. *Nature Neuroscience* 8, 1298–1300.

Geci C, How J, Alturaihi H, Kumar U (2007): Beta-amyloid increases somatostatin expression in cultured cortical neurons. *Journal of Neurochemistry* 101, 664–673.

- Geldmacher DS, Whitehouse PJ (1996): Evaluation of dementia. *The New England Journal of Medicine*, 335, 330-336.
- Goni-Oliver P, Lucas JJ, Avila J, Hernandez F (2007): N-terminal cleavage of GSK-3 by calpain: A new form of GSK-3 regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 22406–22413.
- Guo J, Chang L, Li C, Li M, Yan P, Guo Z, Wang C, Zha Q, Wang Q (2016): Sb203580 reverses memory deficits and depression-like behavior induced by microinjection of A β 1–42 into hippocampus of mice. *Metabolic Brain Disease*, 32, 57–68.
- Haass C, Selkoe DJ (2007): Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 101-112.
- Haapasalo A, Koponen E, Hoppe E, Wong G, Castrén E (2001): Truncated trkB.T1 Is Dominant Negative Inhibitor of trkB.TK+-Mediated Cell Survival, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 280(5), 1352-1358.
- Haapasalo A, Sipola I, Larsson K, Stamm S, Wong G, Castrén E (2002): Regulation of TRKB Surface Expression by Brain-derived Neurotrophic Factor and Truncated TRKB Isoforms*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(45), 43160-43167.
- Hansson O, Zetterberg H, Buchhave P, Londos E, Blennow K, Minthon L (2010): Association between CSF biomarkers and in cipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow up study. *Lancet Neurology*, 67, 949-954.
- Hardwick JM, Soane L (2013): Multiple functions of BCL-2 family proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(2), a008722.
- Harvey RJ, Skelton-Robinson M, Rossor MN (2003): The prevalence and causes of dementia in people under the age of 65 years. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 74, 1206–1209.
- Holback S, Adlerz L, Iverfeldt K (2005): Increased processing of APLP2 and APP with concomitant formation of APP intracellular domains in BDNF and retinoic acid-differentiated human neuroblastoma cells. *Journal of Neurochemistry*, 95(4), 1059-1068.

Horimoto Y, Matsumoto M, Akatsu H (2003): Autonomic dysfunctions in dementia with Lewy bodies. *Journal of Neurology*, 250:5, 530–533.

Hsiao YH, Hung HC, Chen SH, Gean PW (2014): Social Interaction Rescues Memory Deficit in an Animal Model of Alzheimer's Disease by Increasing BDNF-Dependent Hippocampal Neurogenesis. *Journal of Neuroscience*, 34(49), 16207-16219.

Hilgenberg LG, Smith MA 2007: Preparation of dissociated mouse cortical neuron cultures. *Journal of visualized experiments*, 10, 562.

<https://www.molgen.vib-ua.be/ADMutations> (pristupljeno 29.12.2021.)

Huang EJ, Reichardt LF (2001): Neurotrophins: Roles in Neuronal Development and Function. *Annual Review of Neuroscience*, 24:1, 677-736.

Feldman HH, Jacova C, Robillard A, Garcia A, Chow T, Borrie M, Schipper HM, Blair M, Kertesz A, Chertkow H (2008): Diagnosis and treatment of dementia: 2. Diagnosis. *Canadian Medical Association Journal* 178:7, 825-836.

International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (11th ed.; ICD-11; World Health Organization, 2019)

Jack CR Jr, Weigand SD, Shiung MM, Przybelski SA, O'Brien PC, Gunter JL, Knopman DS, Boeve BF, Smith GE, Petersen RC (2008): Atrophy rates accelerate in amnesic mild cognitive impairment. *Neurology* 70; 1740-1752.

Jack CR Jr, Wiste HJ, Vemuri P, Weigand SD, Senjem ML, Zeng G, Bernstein MA, Gunter JL, Pankratz VS, Aisen PS, Weiner MW, Petersen RC, Shaw LM, Trojanowski JQ, Knopman DS (2010): Brain beta-amyloid measures and magnetic resonance imaging atrophy both predict time-to-progression from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *Brain* 133, 3336-3348.

Janocko NJ, Brodersen KA, Soto-Ortolaza AI (2012): Neuropathologically defined subtypes of Alzheimer's disease differ significantly from neurofibrillary tangle-predominant dementia. *Acta Neuropathologica*, 124, 681–692.

- Jeronimo-Santos A, Vaz SH, Parreira S, Rapaz-Lerias S, Caetano AP, Buee-Scherrer V, Castren E, Valente CA, Blum D, Sebastiao AM (2015): Dysregulation of TrkB receptors and bdnf function by amyloid- β peptide is mediated by calpain. *Cerebral Cortex*, 25, 3107–3121.
- Jin N, Qian W, Yin X, Zhang L, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Gong CX, Liu F (2013): CREB regulates the expression of neuronal glucose transporter 3: A possible mechanism related to impaired brain glucose uptake in Alzheimer's disease. *Nucleic Acids Research*, 41, 3240–3256.
- Jin N, Yin X, Yu D, Cao M, Gong CX, Iqbal K, Ding F, Gu X, Liu F (2015): Truncation and activation of GSK-3 β by calpain I: A molecular mechanism links to tau hyperphosphorylation in Alzheimer's disease. *Scientific Reports*, 5, 8187.
- Kelly GL, Strasser A (2020): Toward targeting antiapoptotic MCL-1 for cancer therapy. *Annual Review of Cancer Biology*, 4, 299–313.
- Kemppainen S, Rantamaki T, Jeronimo-Santos A, Lavoisier G, Autio H, Karpova N, Karkkainen E, Staven S, Vicente MH, Outeiro TF (2012): Impaired TrkB receptor signaling contributes to memory impairment in APP/PS1 mice. *Neurobiology of Aging*, 33, 1123–1139.
- Kim SH, Nairn AC, Cairns N, Lubec G (2001): Decreased levels of ARPP-19 and PKA in brains of Down syndrome and Alzheimer's disease. *Journal of neural transmission. Supplementum*, 61, 263–272.
- Kitazawa M, Yamasaki TR, Laferla FM (2004): Microglia as a potential bridge between the amyloid beta-peptide and tau. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1035, 85-103.
- Kitiyant N, Kitiyant Y, Svendsen CN, Thangnipon W (2012): BDNF-, IGF-1- and GDNF-secreting human neural progenitor cells rescue amyloid β -induced toxicity in cultured rat septal neurons. *Neurochemical Research*, 37(1), 143-152.
- Klunk WE, Engler H, Nordberg A, et al. (2004): Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Annals of neurology*, 55, 306-319.
- Koponen N, Vöikar V, Riekkö R, Saarelainen T, Rauramaa T, Rauvala H, Taira T, Castrén E (2004): Transgenic mice overexpressing the full-length neurotrophin receptor trkB exhibit increased activation of the trkB-PLC γ pathway, reduced anxiety, and facilitated learning. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 26(1), 166-181.

- Kumar A, Sidhu J, Goyal A, Tsao JW (2021): Alzheimer Disease. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022. PMID: 29763097.
- Kuzuhara S, Yoshimura M (1993): Clinical and neuropathological aspects of diffuse Lewy body disease in the elderly. *Advances in Neurology*, 60, 464–469.
- Lakhani SA, Masud A, Kuida K, Porter GA, Jr, Booth CJ, Mehal WZ (2006): Inayat I, Flavell RA. Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science*, 311, 847–851.
- Lamkanfi M, Kanneganti TD (2009): Caspase-7: a protease involved in apoptosis and inflammation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(1), 21-24.
- Landau SM, Harvey D, Madison CM, Reiman EM, Foster NL, Aisen PS, Petersen RC, Shaw LM, Trojanowski JQ, Jack CR Jr, Weiner MW, Jagust WJ (2010): Comparing predictors of conversion and decline in mild cognitive impairment. *Neurology*, 75, 230-238.
- Liang Z, Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX (2007): Down-regulation of cAMP-dependent protein kinase by over-activated calpain in Alzheimer disease brain. *Journal of Neurochemistry*, 103, 2462–2470.
- Liljegren M, Landqvist Waldö M, Rydbeck R, Englund E (2018): Police Interactions Among Neuropathologically Confirmed Dementia Patients: Prevalence and Cause. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, 32(4), 346-350.
- Lopez OL, Jagust WJ, DeKosky ST, Becker JT, Fitzpatrick A, Dulberg C, Breitner J, Lyketsos C, Jones B, Kawas C, Carlson M, Kuller LH (2003): Prevalence and classification of mild cognitive impairment in the Cardiovascular Health Study Cognition Study: part 1. *Archives of Neurology*, 60, 1385-1389.
- Lossinsky AS, Shivers RR (2004): Structural pathways for macromolecular and cellular transport across the bloodbrain barrier during inflammatory conditions. Review. *Histology and Histopathology* 19, 535-564.
- Lu B, Pang P, Woo N (2005): The yin and yang of neurotrophin action. *Nature Reviews Neuroscience*, 6, 603–614.

- Luikart BW, Nef S, Shipman T, Parada LF (2003): In vivo role of truncated trkb receptors during sensory ganglion neurogenesis. *Neuroscience*, 117(4): 847-858.
- Maisonpierre PC, Le Beau MM, Espinosa R 3rd, Ip NY, Belluscio L, De la Monte SM, Squinto S, Furth ME, Yancopoulos GD (1991): Human and rat brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: gene structures, distributions, and chromosomal localizations. *Genomics*, 10(3), 558-568
- Manly JJ, Tang MX, Schupf N, Stern Y, Vonsattel JP, Mayeux R (2008): Frequency and course of mild cognitive impairment in a multiethnic community. *Annals of Neurology*, 63, 494-506.
- Massa SM, Yang T, Xie Y, Shi J, Bilgen M, Joyce JN, Nehama D, Rajadas J, Longo FM (2010): Small molecule BDNF mimetics activate TrkB signaling and prevent neuronal degeneration in rodents. *Journal of Clinical Investigation*, 120, 1774-1785.
- Maundrell K, Antonsson B, Magnenat E, Camp M, Muda M, Chabert C, Gillieron C, Boschert U, Vial-Knecht E, Martinou J-C, Arkinstall S (1997): BCL-2 undergoes phosphorylation by c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinases in the presence of the constitutively active GTP-binding protein Rac1. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 25238–25242.
- McEvoy LK, Fennema-Notestine C, Roddey JC, Hagler DJ Jr, Holland D, Karow DS, Pung CJ, Brewer JB, Dale AM (2009): Alzheimer disease: quantitative structural neuroimaging for detection and prediction of clinical and structural changes in mild cognitive impairment. *Radiology*, 251, 195-205.
- McKeith IG, Perry RH, Fairbairn AF, Jabeen S, Perry EK (1992): Operational criteria for senile dementia of Lewy body type (SDLT). *Psychological Medicine*, 22, 911–922.
- McKeith IG, Galasko D, Kosaka K, Perry EK, Dickson DW, Hansen LA, Salmon DP, Lowe J, Mirra SS, Byrne EJ, Lennox G, Quinn NP, Edwardson JA, Ince PG, Bergeron C, Burns A, Miller BL, Lovestone S, Collerton D, Jansen ENH, Ballard C, De Vos RAI, Wilcock GK, Jellinger KA, Perry RH, (1996): Consensus guidelines for the clinical and pathologic diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): report of the consortium on DLB international workshop. *Neurology*, 47, 1113–1124.

McKeith IG (2003): The clinical spectrum of Lewy body disease. The Third Kuopio Alzheimer Symposium. Vol. 3, Kuopio, Finland. p. 25.

McKeith, I (2007): Dementia with Lewy bodies, u: Koller CW, Melamed E, Parkinson's disease and related disorders, Part II. Handbook of Clinical Neurology. Elsevier. 84, 531-548 (2007).

Michaelson K, Zagrebelsky M, Berndt-Huch J, Polack M, Buschler A, Sendtner M, Korte M (2010): Neurotrophin receptors TrkB.T1 and p75NTR cooperate in modulating both functional and structural plasticity in mature hippocampal neurons. *European Journal of Neuroscience*, 32(11), 1854-1865.

Minichiello L, Korte M, Wolfert D, Kühn R, Unsicker K, Cestari V, Rossi-Arnaud C, Lipp HP, Bonhoeffer T, Klein R (1999): Essential Role for TrkB Receptors in Hippocampus-Mediated Learning. *Neuron*, 24(2), 401-414.

Minichiello L, Calella AM, Medina DL, Bonhoeffer T, Klein R, Korte M (2002): Mechanism of TrkB-mediated hippocampal long-term potentiation. *Neuron*, 36, 121–137.

Minichiello, L (2009): TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nature Reviews Neuroscience* 10, 850–860.

Mishizen-Eberz AJ, Norris EH, Giasson BI, Hodara R, Ischiropoulos H, Lee VM, Trojanowski JQ, Lynch DR (2005): Cleavage of α -synuclein by calpain: Potential role in degradation of fibrillized and nitrated species of α -synuclein. *Biochemistry*, 44, 7818–7829.

Molano J, Boeve B, Ferman T, Smith G, Parisi J, Dickson D, Knopman D, Graff-Radford N, Geda Y, Lucas J, Kantarci K, Shiung M, Jack M, Silber M, Pankratz VS, Petersen R (2010): Mild cognitive impairment associated with limbic and neocortical Lewy body disease: a clinicopathological study. *Brain*, 133, 540-556.

Morishima Y, Gotoh Y, Zieg J, Barrett T, Takano H, Flavell R, Davis RJ, Shirasaki Y, Greenberg ME (2001): Beta-amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand. *Journal of Neuroscience*, 21(19), 7551-7560.

Morris JC (1996): Classification of dementia and Alzheimer's disease. *Acta Neurologica Scandinavica*, 94, 41–50.

Mowla SJ, Pareek S, Farhadi HF, Petrecca K, Fawcett JP, Seidah NG, Morris SJ, Sossin WS, Murphy RA (1999): Differential Sorting of Nerve Growth Factor and Brain-Derived Neurotrophic Factor in Hippocampal Neurons. *Journal of Neuroscience*, 19(6), 2069-2080.

Murray ME, Graff-Radford NR, Ross OA (2011): Neuropathologically defined subtypes of Alzheimer's disease with distinct clinical characteristics: a retrospective study. *Neurology* 10, 785-796.

Nagahara AH, Merrill DA, Coppola G, Tsukada S, Schroeder BE, Shaked GM, Wang L, Blesch A, Kim A, Conner JM, Rockenstein E, Chao MV, Koo EH, Geschwind D, Masliah E, Chiba AA, Tuszynski MH (2009): Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. *Nature Medicine*, 15, 331-337.

Nagahara AH, Mateling M, Kovacs I, Wang L, Eggert S, Rockenstein E, Koo EH, Masliah E, Tuszynski MH (2013): Early BDNF treatment ameliorates cell loss in the entorhinal cortex of APP transgenic mice. *The Journal of Neuroscience*, 33, 15596-15602.

National Collaborating Centre for Mental Health (UK) (2007): Dementia: A NICE-SCIE Guideline on Supporting People With Dementia and Their Carers in Health and Social Care. Leicester (UK): British Psychological Society; (NICE Clinical Guidelines, No. 42.) 4, DEMENTIA.

Nicolas G, Acuña-Hidalgo R, Keogh MJ, Quenez O, Steehouwer M, Lelieveld S, Rousseau S, Richard AC, Oud MS, Marguet F, Laquerrière A, Morris CM, Attems J, Smith C, Ansorge O, Al Sarraj S, Frebourg T, Champion D, Hannequin D, Wallon D, Gilissen C, Chinnery PF, Veltman JA, Hoischen A (2018): Somatic variants in autosomal dominant genes are a rare cause of sporadic Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, 14(12), 1632-1639.

Nunan J, Small DH (2000): Regulation of APP cleavage by alpha-, beta- and gamma-secretases. *FEBS Letters*, 483, 6-10.

Paradis E, Douillard H, Koutroumanis M, Goodyer C, LeBlanc A. (1996): Amyloid beta peptide of Alzheimer's disease downregulates BCL-2 and upregulates BAX expression in human neurons. *Journal of Neuroscience*, 16(23), 7533-7539.

Peng S, Wu J, Mufson EJ, Fahnstock M (2005): Precursor form of brain-derived neurotrophic factor and mature brain-derived neurotrophic factor are decreased in the pre-clinical stages of Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*, 93(6), 1412-1421.

Peng S, Garzon DJ, Marchese M, Klein W, Ginsberg SD, Francis BM, Mount HTJ, Mufson EJ, Salehi A, Fahnstock M (2009): Decreased Brain-Derived Neurotrophic Factor Depends on Amyloid Aggregation State in Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience*, 9(29), 9321-9329.

Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E (1999): Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Archives of Neurology*, 56, 303-308. [Erratum, *Archives of Neurology*, 1999; 56, 760.]

Petersen RC (2004): Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. *Journal of Internal Medicine*, 256, 183-194.

Petersen RC, Thomas RG, Grundman M (2005): Vitamin E and donepezil for the treatment of mild cognitive impairment. *New England Journal of Medicine*, 352, 2379-88.

Petersen RC, Roberts RO, Knopman D (2009): Mild cognitive impairment: ten years later. *Archives of Neurology*, 66, 1447-1455.

Petersen RC (2011): Mild cognitive impairment. *The New England Journal of Medicine*, 364, 2227-2234.

Pike CJ, Walencewicz-Wasserman AJ, Kosmoski J, Cribbs DH, Glabe CG, Cotman CW (1995): Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25–35 region to aggregation and neurotoxicity. *Journal of Neurochemistry*, 64, 253–265.

Plassman BL, Langa KM, Fisher GG (2008): Prevalence of cognitive impairment without dementia in the United States. *Annals of Internal Medicine*, 148, 427-34. [Erratum, *Annals of Internal Medicine*, 2009; 151, 291-292.]

- Phillips HS, Hains JM, Armanini M, Laramee GR, Johnson SA, Winslow JW (1991): BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease. *Neuron*, 7(5), 695-702.
- Poo MM (2001): Neurotrophins as synaptic modulators. *Nature Reviews Neuroscience*, 2, 24–32.
- Poon WW, Carlos AJ, Aguilar BL, Berchtold NC, Kawano CK, Zograbyan V, Yaoprake T, Shelanski M, Cotman CW (2013): β -Amyloid (A β) oligomers impair brain-derived neurotrophic factor retrograde trafficking by down-regulating ubiquitin C-terminal hydrolase, UCH-L1. *Journal of Biological Chemistry*, 288:23, 16937-16948.
- Priller C, Bauer T, Mitteregger G, Krebs B, Kretschmar HA, Herms J (2006): Synapse Formation and Function Is Modulated by the Amyloid Precursor Protein. *The Journal of Neuroscience*, 26(27), 7212-7221.
- Pruunsild P, Kazantseva, Aid T, Palm K, Timmusk T (2007): Dissecting the human BDNF locus: Bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. *Genomics*, 90(3), 397-406.
- Puthalakath H, Strasser A (2002): Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death & Differentiation*, 9, 505–512.
- Pugazhenthii S, Wang M, Pham S, Sze CI, Eckman CB (2011): Downregulation of CREB expression in Alzheimer's brain and in A β -treated rat hippocampal neurons. *Molecular Neurodegeneration*, 6, 60.
- Rabins PV, Slavney PR (2008): Overview of psychiatric symptoms and syndromes. U: Lyketsos CG, Rabins PV, Lipsey JR (ur.) In *Psychiatric Aspects of Neurologic Diseases: Practical Approaches to Patient Care*. Oxford University Press, str. 41–64.
- Rantamäki T, Kemppainen S, Autio H, Stavén S, Koivisto H, Kojima M, Antila H, Miettinen PO, Kärkkäinen E, Karpova N, Vesa L, Lindemann L, Hoener MC, Tanila H, Castrén E (2013): The Impact of Bdnf Gene Deficiency to the Memory Impairment and Brain Pathology of APP^{swe}/PS1^{dE9} Mouse Model of Alzheimer's Disease. *PLOS ONE*, 8(7), 68722.

- Ramser EM, Gan KJ, Decker H, Fan EY, Suzuki MM, Ferreira ST, Silverman MA (2013): Amyloid- β oligomers induce tau-independent disruption of BDNF axonal transport via calcineurin activation in cultured hippocampal neurons. *Molecular Biology of the Cell*, 24(16), 2491-2592.
- Reitz C, Brayne C, Mayeux R (2011): Epidemiology of Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, 7, 137–152.
- Resende R, Ferreira E, Pereira C, Resende de Oliveira C (2008): Neurotoxic effect of oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptide 1-42: Involvement of endoplasmic reticulum calcium release in oligomer-induced cell death. *Cellular neuroscience*, 155(3), 725-737.
- Rösch H, Schweigreiter R, Bonhoeffer T, Barde YA, Korte M (2005): The neurotrophin receptor p75NTR modulates long-term depression and regulates the expression of AMPA receptor subunits in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 7362-7367.
- Roy S, Zhang B, Lee VM, Trojanowski JQ (2005): Axonal transport defects: a common theme in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathologica*, 109, 5-13.
- Saarelainen T, Lukkarinen JA, Koponen S, Gröhn OHJ, Jolkkonen J, Koponen E, Haapasalo A, Alhonen L, Wong G, Koistinaho J, Kauppinen RA, Castrén E (2000): Transgenic Mice Overexpressing Truncated trkB Neurotrophin Receptors in Neurons Show Increased Susceptibility to Cortical Injury after Focal Cerebral Ischemia. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 16:2, 87-96.
- Sacuiu, S.F (2016): Dementias. U: Aminoff MJ, Boller F, Dick F, Swaab DF (ur.). *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier 138, 123-151.
- Schaie KW, Willis SL (1993): Age difference patterns of psychometric intelligence in adulthood: Generalizability within and across ability domains. *Psychology and Aging*, 8(1), 44–55.
- Sahgal A, Galloway PH, McKeith IG (1992): A comparative study of attentional deficits in senile dementias of Alzheimer and Lewy body types. *Dementia* 3, 350–354.

Saito K, Elce JS, Hamos JE, Nixon RA (1993): Widespread activation of calcium-activated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: A potential molecular basis for neuronal degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 2628–2632.

Sechi S, Chiavolelli F, Spissu N, Di Cerbo A, Canello S, Guidetti G, Fiore F, Cocco R (2015): An Antioxidant Dietary Supplement Improves Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels in Serum of Aged Dogs: Preliminary Results. *Journal of Veterinary Medicine*, 2015, 9.

Shin MK, Kim HG, Baek SH, Jung WR, Park DI, Park JS, Jo DG, Kim KL (2014): Neuropeptide-1 ameliorates learning and memory deficits in an Alzheimer's disease mouse model, increases brain-derived neurotrophic factor expression in the brain, and causes reduction of amyloid beta plaques. *Neurobiology of Aging*, 35, 990-1001.

Snowdon DA, Greiner LH, Mortimer JA, Riley KP, Greiner PA, Markesbery WR (1997): Brain infarction and the clinical expression of Alzheimer disease. The Nun Study. *Journal of the American Medical Association*, 277, 813–817.

Stuss DT, Cummings JL (1990): Subcortical vascular dementia. In: Cummings JL, ed. *Subcortical dementia*. New York:Oxford University Press, 145-163.

Szapacs ME, Numis AL, Andrews AM (2004): Late onset loss of hippocampal 5-HT and NE is accompanied by increases in BDNF protein expression in mice co-expressing mutant APP and PS1. *Neurobiology of Disease*, 16, 572-580.

Tanila H (2017): The role of BDNF in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, 97, 114–118.

Tansey MG, McCoy MK, Frank-Cannon TC (2007): Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. *Experimental Neurology*, 208, 1-25.

Taupin P (2008): Adult neurogenesis, neuroinflammation and therapeutic potential of adult neural stem cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 5, 127-132.

Trojanowski JQ, Smith AB, Hurn D, Lee VM (2005): Microtubule-stabilising drugs for therapy of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders with axonal transport impairments. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 6, 683-686.

Tejeda GS, Díaz-Guerra M (2017): Integral Characterization of Defective BDNF/TrkB Signalling in Neurological and Psychiatric Disorders Leads the Way to New Therapies. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 268.

Tong L, Balazs R, Thornton PL, Cotman CW (2004): β -Amyloid peptide at sublethal concentrations downregulates brain-derived neurotrophic factor functions in cultured cortical neurons. *Journal of Neuroscience*, 24, 6799–6809.

Tong BC, Wu AJ, Li M, Cheung KH (2018): Calcium signaling in Alzheimer's disease & therapies. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1865, 1745-1760.

Vieira RT, Caixeta L, Machado S, Cardoso Silva A, Egidio Nardi A, Arias-Carrión O, Giovanni Carta M (2012): Epidemiology of early-onset dementia: a review of the literature. *Clinical Practice and Epidemiology in Mental Health*, 9, 88–95.

Visser PJ, Verhey F, Knol DL, Visser PJ, Verhey F, Knol DL, Scheltens P, Wahlund LO, Freund-Levi Y, Tsolaki M, Minthon L, Wallin AK, Hampel H, Bürger K, Pirttilä T, Soininen H, Rikkert MO, Verbeek MM, Spira L, Blennow K (2009): Prevalence and prognostic value of CSF markers of Alzheimer's disease pathology in patients with subjective cognitive impairment or mild cognitive impairment in the DESCRIPA study: a prospective cohort study. *Lancet Neurology*, 8, 619-627.

Vitolo OV, Sant'Angelo A, Costanzo V, Battaglia F, Arancio O, Shelanski M (2002): Amyloid β -peptide inhibition of the PKA/CREB pathway and long-term potentiation: Reversibility by drugs that enhance cAMP signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 13217–13221.

Yacoubian T, Lo D (2000): Truncated and full-length TrkB receptors regulate distinct modes of dendritic growth. *Nature Neuroscience*, 3, 342–349.

Yadav, D.S (2012): Dementia classification. *Advances in Psychiatric Treatment* 18, 315–316.

- Yamamoto K, Ichijo H, Korsmeyer SJ (1999): BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G2/M. *Molecular and Cellular Biology*, 19, 8469–8478.
- Yamamoto-Sasaki M, Ozawa H, Saito T, Rosler M, Riederer P (1999): Impaired phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein in the hippocampus of dementia of the Alzheimer type. *Brain Research*, 824, 300–303.
- Yao M, Nguyen TV, Pike CJ (2005): Beta-amyloid-induced neuronal apoptosis involves c-Jun N-terminal kinase-dependent downregulation of Bcl-w. *Journal of Neuroscience*, 25, 1149–1158
- Young-Jung, L (2010): Inflammation and Alzheimer's disease. *Archives of Pharmacal Research*, 33, 1539–1556.
- Walker Z, Allan RL, Shergill S, CLE Katona (1997): Neuropsychological performance in Lewy body dementia and Alzheimer's disease. *British Journal of Psychiatry*, 170, 156–158.
- Walsh JG, Cullen SP, Sheridan C, Luthi AU, Gerner C, Martin SJ (2008): Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 12815–12819.
- Wang X (2001): The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes & Development*, 15, 2922–2933.
- Wolfe N, Linn R, Babikian VL, Knoefel JE, Albert ML (1990): Frontal systems impairment following multiple lacunar infarcts. *Archives of Neurology*, 47, 129-132.
- World Health Organization (1992): The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders: Clinical Descriptions and Diagnostic Guidelines. Geneva: WHO.
- Zeng Y, Zhao D, Xie CW (2010): Neurotrophins enhance CaMKII activity and rescue amyloid- β -induced deficits in hippocampal synaptic plasticity. *Journal of Alzheimer's Disease*, 21(3), 823-831.

Zheng Z, Sabirzhanov B, Keifer J (2010): Oligomeric amyloid- β inhibits the proteolytic conversion of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), AMPA receptor trafficking, and classical conditioning. *Journal of Biological Chemistry*, 285:45, 34708-34717.

8. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Katarina Štulić

Datum rođenja: 14.01.1997.

Obrazovanje:

2018.-2022. **Diplomski sveučilišni studij Molekularna biologija**

Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb (Republika Hrvatska)

2015.-2018. **Preddiplomski studij Biologija i ekologija mora**

Sveučilište u Splitu, Sveučilišni odjel za studije mora, Split (Republika Hrvatska)

Radno iskustvo:

2020.-2022. Suradnik za farmakovigilanciju

Primevigilance d.o.o. Zagreb

2020.-2022. Online instruktor iz biologije

Teachme d.o.o. Zagreb

2021. Laboratorijska stručna praksa

Institut Ruđer Bošković, Zavod za molekularnu medicinu, Laboratorij za molekularnu neuropsihijatriju

Mentorica: dr.sc. Gordana Nedić Erjavec

2020.-2021. Student asistent

Muzej prekinutih veza d.o.o. Zagreb

2019.-2020. Student asistent

Javna ustanova Maksimir, Zagreb

2019. Laboratorijska stručna praksa

Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zavod za animalnu fiziologiju

Mentor: prof.dr.sc. Dubravka Hranilović

Dodatno:

Hrvatski kongres farmakologije s međunarodnim sudjelovanjem (2019.)

Manifestacija koja promiče znanost.

Festival znanosti (2016., 2017., 2018.)

Manifestacija koja promiče znanost.