Neuro-upalni odgovor i oksidacijski stres u štakorskom modelu Alzheimerove bolesti

Mojzeš, Anamarija

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:851648

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-13**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Anamarija Mojzeš

Neuro-upalni odgovor i oksidacijski stres u štakorskom modelu Alzheimerove bolesti

Diplomski rad

Zagreb, 2018

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za Animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom Prof. dr. sc. Nade Oršolić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

Želim izraziti najveću zahvalnost svojoj mentorici prof. dr. sc. Nadi Oršolić na predloženoj temi, te što je uvijek bila tu za mene kada bih zatrebala stručni savjet i pomoć.

Posebno zahvaljujem Marini Kukolj što mi je s puno strpljenja pomagala oko eksperimentalnog dijela, te svojom srdačnošću i vedrinom uljepšala sate provedene u laboratoriju.

Zahvaljujem i svim djelatnicima Zavoda za animalnu fiziologiju koji su na bilo koji način pridonijeli ovome radu, a posebno tehničarima Mariji Potočić i Hrvoju Jedvaj, te asistenticama Dyani Odeh i Barbari Nikolić.

Ovaj rad posvećujem mojim roditeljima i zahvaljujem im na njihovoj nesebičnoj podršci, žrtvi i molitvama kojima su me pratili kroz cijelo vrijeme studija i tako mi omogućili da danas budem tu gdje jesam.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno- matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

NEURO-UPALNI ODGOVOR I OKSIDACIJSKI STRES U ŠTAKORSKOM MODELU ALZHEIMEROVE BOLESTI

Anamarija Mojzeš

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Alzheimerova bolest je najčešći tip demencije od koje obolijeva sve više ljudi. Karakterizira ju vrlo složena etiologija, uključujući mutacije u nekim genima, oksidativni stres, poremećaj homeostaze kalcija, upala i poremećaj u hormonima i staničnom ciklusu. Do promjena u većini ovih parametara mogu dovesti tvari koje hranom, vodom ili lijekovima unosimo u organizam. U radu je istražen učinak aluminij klorida ($AlCl_3$) i D- galaktoze (D- gal) na nastanak oksidativnog stresa u mozgu, te posljedično nastalu razinu upale i oštećenja. Poseban naglasak je bio na praćenju pokazatelja Alzheimerove bolesti. U pokusu smo koristili štakore soja Y59 kojima smo kroz 28 dana intraperitonealno injicirali $AlCl_3$i D-gal. Dobiveni rezultati pokazuju da $AlCl_3$i D-gal uzrokuju oksidativni stres u mozgu tako što povećavaju koncentraciju dušikova oksida, karboniliranih proteina i malondialdehida, te aktivnost superoksid dismutaze i katalaze. Povećane koncentracije proupalnih citokina i arginaze 1 u štakora izloženih $AlCl_3$ i D- gal, ukazuju na prisutnost neuroupale koju karakterizira pojačana aktivnost mikroglija-stanica i to posebno M1, M2b i M2c oblika. Imunohistokemijska analiza mozga pokazala je povećanu prisutnost amiloidnih plakova u regijama mozga koje su bile jače izložene oksidativnom stresu i neuroupali.

(75 stranica, 27 slika, 10 tablica, 52 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Centralnoj biološkoj biblioteci Prirodoslovno - matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb, Hrvatska.

Ključne riječi: aluminij klorid, D- galaktoza, neuroupala , oksidativni stres, Alzheimerova bolest

Voditelj: Dr. sc. Nada Oršolić, red. prof.

Ocjenitelji: Dr. sc. Nada Oršolić, red. prof.

Dr. sc. Sunčica Bosak, doc.

Dr. sc. Davor Zanella, izv. prof.

Rad prihvaćen: 1.2.2018.

BACIS DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

NEUROINFLAMMATORY RESPONSE AND OXIDATIVE STRESS IN A RAT MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE

Anamarija Mojzeš

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

More and more people are suffering from Alzheimer's Disease, the most common type of dementia. Alzheimer's disease development probably is triggered by a combination of many factors like mutations in some genes, oxidative stress, dysfunctional calcium homeostasis and with hormonal, inflammatory and cell cycle dysregulation. Changes in the most of these factors can be caused by substances that we get into our body through food, water and medicine. The main aim of this study was to investigate the effect of aluminum chloride ($AlCl_3$) and D-galactose (D-gal) on the formation of oxidative stress in the brain and consequently the level of inflammation and brain damage. Particular emphasis was placed on tracking indicators of Alzheimer's disease. In the experiment we had been intraperitoneally injecting $AlCl_3$ and D-gal into rats of the Y59 strain for 28 days. The results show that $AlCl_3$ and D-gal causes an increased level of oxidative stress in brain. That is especially visible in the increased concentration of nitric oxide, carbonyl proteins and malondialdehyde. Also in the increased activity of catalase and superoxide dismutase. Increased concentration of proinflammatory cytokines and arginase 1 in rats exposed to $AlCl_3$ and D-gal indicate on neuroinflammation. Neuroinflammation is characterised by bigger microglia-cell (M1, M2b and M2c) activity. Immunohistochemical brain analysis show bigger presence of amyloid plaques in the brain regions which had been more exposed to oxidative stress and neuroinflammation.

(75 pages, 27 figures, 10 table, 52 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: aluminum chloride, D-galactose, neuroinflammation, oxidative stress, Alzheimer's disease

Supervisor: Dr.sc. Nada Oršolić, Prof.

Reviewers: Dr. sc. Nada Oršolić, Prof.

Dr. sc. Sunčica Bosak, Asst. Prof.

Dr. sc. Davor Zanella, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 1.2.2018.

SADRŽAJ:

1.UVOD 1

1.1. OKSIDATIVNI STRES……...1

1.1.1. Podrijetlo oksidansa.....1

1.1.2. Kisikovi i dušikovi radikali.....4

1.1.3. Antioksidativni sustav.....5

1.1.4. Oksidativni stres i neuroupala.....7

1.2. ALZHEIMEROVA BOLEST 8

1.2.1. Geni uključeni u patologiju Alzheimerove bolesti.....9

1.2.1.1. Gen za amiloid prekusorski protein (APP).....9

1.2.1.2. Gen za apolipoprotein E.....10

1.2.1.3. Geni za presenilin 1 i 2.....10

1.2.2. Amiloid β-peptid (Aβ).....11

1.2.2.1. γ-sekretaza.....13

1.2.2.2. β-sekretaza 13

1.2.2.3. Razgradnja Aβ 13

1.2.2.4. Neurotoksičnost amiloid β-peptida.....14

1.2.3. Tau protein 16

1.2.3.1. Neurotoksičnost proteina tau 17

1.2.4. Neuroupala u Alzheimerovoj bolesti 18

1.2.4.1. Mikroglija 18

1.2.4.2. Astroglija.....20

1.2.4.3. Sustav komplementa 21

1.2.4.4. Medijatori neuroupale 21

2.6. Animalni modeli Alzheimerove bolesti 23

2.6.1. Transgenični animalni modeli Alzheimerove bolesti 23

2.6.2. Netransgenični animalni modeli 24

2.7. Aluminij klorid ($AlCl_3$) + D-galaktoza (D-gal) animalni model Alzheimerove bolesti 25

1.3. CILJ ISTRAŽIVANJA 29

2. MATERIJALI I METODE 30

2.1. MATERIJALI 30

2.1.1. Pokusne životinje 30

2.1.2. Kemikalije korištene u obradi štakora 30

2.1.3. Kemikalije korištene u analizi 30

2.1.4. Instrumenti 31

2.2. METODE 32

2.2.1. Promjena tjelesne mase pokusnih životinja 32

2.2.2. Plan pokusa 32

2.2.3. Određivanje parametara oksidativnog stresa 33

2.2.3.1. Izolacija i priprema tkiva 33

2.2.3.2. Određivanje proteina po Lowry-u.....33

2.2.3.3. Određivanje koncentracije malondialdehida (MDA).....34

2.2.3.4. Određivanje koncentracije proteinskih karbonila 35

2.2.3.5. Određivanje koncentracije ukupnog glutationa 36

2.2.3.6. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)……38

2.2.3.7. Mjerenje enzimske aktivnosti katalaze (CAT).....39

2.2.4. Metode utvrđivanja prisutnosti značajki Alzheimerove bolesti 39

2.2.4.1. Određivanje koncentracije moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF, engl. Brain-derived neurotrophic factor).....39

2.2.4.2. Određivanje aktivnosti acetilkolinesteraze (AchE) 42

2.2.4.3. Imunohistokemija 43

2.2.5. Metode provjere neuroupale 43

2.2.5.1. Određivanje razine proupalnih citokina 43

2.2.5.2. Određivanje aktivnosti arginaze 44

2.2.5.3. Određivanje dušikovog oksida indirektnom metodom prema Griess-u 45

2.2.5.4. Određivanje relativnog indeksa mozga 46

2.3. Statistička analiza.....46

3. REZULTATI 47

3.1. PROMJENA TJELESNE MASE POKUSNIH ŽIVOTINJA.....47

3.2. ODREĐIVANJE PARAMETARA OKSIDATIVNOG STRESA 48

3.2.1. Koncentracija proteina po Lowry-u 48

3.2.2. Koncentracija malondialdehida (MDA).....49

3.2.3. Koncentracija proteinskih karbonila.....50

3.2.4. Koncentracija glutationa. 51

3.2.5. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD).....52

3.2.6. Aktivnost katalaze (CAT) 53

3.3. METODE UTVRĐIVANJA PRISUTNOSTI ZNAČAJKI ALZHEIMEROVE BOLESTI.....54

3.3.1. Koncentracija moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF)……...54

3.3.2. Aktivnost acetilkolinesteraze (AchE).....55

3.3.3. Imunohistokemija.....56

3.4. PROVJERA PRISUTNOSTI NEUROUPALE.....59

3.4.1. Koncentracija proupalnih citokina.....59

3.4.2. Aktivnost arginaze I.....60

3.4.3. Koncentracija dušikovog oksida ……...61

3.4.4. Relativni indeks mozga.....62

4. RASPRAVA.....64

5. ZAKLJUČAK.....70

6. LITERATURA.....71

7. ŽIVOTOPIS.....76

POPIS KRATICA:

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

Aβ - amiloid- β peptid (engl. *amyloid- β peptide*)

Ach - acetilkolin (engl. a*cetylcholine*)

AchE - acetilkolinesteraza (engl. *acetylcholinesterase*)

AGE - (engl. *Advanced glycation endproducts*)

AICD - APP unutarstanična domena (engl. *APP intracellular domain*)

ApoE - apolipoprotein E (engl. *apolipoprotein E*)

AP -1 - proteinski aktivator 1 (engl. *activator protein 1*)

APP - β-amiloidni prekusorski protein (engl. *amyloid precursor protein*)

BACE/Asp2 - β- sekretaza (engl. *beta-site APP cleaving enzyme/ aspartyl protease 2*)

BDNF - moždani neurotrofni čimbenik (engl. *brain-derived neurotrophic factor*)

CAT - katalaza(engl. *catalase*)

ChAT- kolin acetiltransferaza (engl. *choline acetyltransferase*)

CTF- C-terminalni dio APP-a (engl. *C-terminal fragment*)

DG - dentatni girus (engl. *dentate gyrus*)

DNA - deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxiribonucleic acid*)

DTNB - Ellmanov reagens (engl. *Ellman's reagent*)

Duox- (engl. *dual oxidase*)

FAD - obiteljska Alzheimerova bolest (engl. *familial Alzheimer's disease*)

FADH_2 - flavin adenin dinukleotid (engl. *flavin adenine dinucleotide*)

GFAP - glijalni fibrilarni kiseli protein (engl. *glial fibrillary acidic protein*)

GM-CSF - granulocitno-makrofagni čimbenik rasta kolonija (engl. *granulocyte/macrophage colony stimulating factor*)

GPX - glutation peroksidaza (engl. *glutathione peroxidase*)

GSH - reducirani oblik glutationa (engl. *reduced glutathione*)

GSK-3β - glikogen sintaza kinaza 3β (engl. *glycogen synthase kinase-3β*)

GSSG - oksidirani oblik glutationa (engl. *oxidized glutathione*)

HOO^- - hidroperoksil radikal (engl. *hydoperoxide anion*)

H_2O_2 - vodikov peroksid (engl. *hydrogen peroxide*)

HOCl - hipokloritna kiselina (engl. *hypochlorous acid*)

HRP - peroksidaza hrena (engl. *horseradish peroxidase*)

i.c.v.- intracerebroventrikularna infuzija (engl. *intracerebroventricular infusion*)

IDE - inzulin razarajući enzim (engl. *insulin degrading enzyme*)

IFN-γ - interferon-γ (engl. *interferon gamma*)

IL-1 - interleukin 1 (engl. *interleukin 2*)

iNOS - inducibilna dušik oksid sintaza (engl. *inducibile nitric oxide synthase*)

LOX - lipooksigenaze (engl. *lipoxygenase*)

LRP - lipoproteinski receptor-vezani protein (engl. *lipoprotein receptor-related protein*)

LTP - dugoročna potencijacija (engl. *long-term potentiation*)

MAP kinaza - mitogenom aktivirane protein kinaze (engl. *mitogen-activated protein kinase*)

M-CSF - makrofagni čimbenik stimulacije kolonija (engl. *macrophage colony-stimulating factor*)

MDA - malondialdehid (engl. *malonedialdehyde*)

MIP-1α - makrofagni upalni protein 1α (engl. *macrophage inflammatory protein 1α*)

MPO - mijeloperoksidaza (engl. *myeloperoxidase*)

mtDNA - mitohondrijska deoksiribonukleinska kiselina (engl. *mitochondrial deoxiribonucleic acid*)

NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

NED- N-1- naftiletilendiamin dihidroklor (*N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride*)

NEP - neprilizin (engl. *neprilysin*)

NF-κB - nuklearni faktor κB (engl. *nuclear factor kappa B*)

NFT - neurofibrilarni snopići (engl. *neurofibrillary tangles*)

NK stanice - stanice ubojice (engl. *natural killer cells*)

NO - dušikov oksid (engl. *nitric oxide*)

Nox - NADPH oksidaza (engl.*NADPH-oxidase*)

O_2^- - superoksidni anion (engl. *superoxide ion*)

OH- - hidroksilni ion (engl. *Hydroxide ion*)

$ONOO^-$ - peroksinitrit (engl. *peroxynitrite*)

PGE2- prostaglandin E2 (engl. *prostaglandin E2*)

PKCδ - protein kinaza C-δ (engl. *protein kinase C-δ*)

PS1 - presenilin 1(engl. *presenilin 1*)

PS2 - presenilin 2 (engl. *presenilin 2*)

RAGE - (engl. *receptor for advanced glycation end products*)

RANTES - vrsta kemokina (engl. *regulated on activation normal T cell expressed and secreted*)

RNA - ribonukleinska kiselina (engl. *ribonucleic acid*)

RNS - reaktivni dušikovi radikali (engl. *reactive nitrogen species*)

ROS - reaktivni kisikovi radikali (engl. *reactive oxygen species*)

SOD - superoksid dismutaza (engl. *superoxide dismutase*)

TBA - tiobarbituratna kiselina (engl. *thiobarbituric acid*)

TLR - toll-like receptori (engl. *toll-like receptors*)

TNB - 5- tionitrobenzoična kiselina (engl. *5-thio nitrobenzoic acid*)

TNF-α - faktor nekroze tumora α (engl. *tumor necrosis factor α*)

TREM2 (engl. *trrigering receptor expressed on myeloid cells 2*)

UVA - ultraljubičasto zračenje tipa A (engl. *ultraviolet type A*)

XO - ksantin oksidaza (engl. *xantin oxidase*)

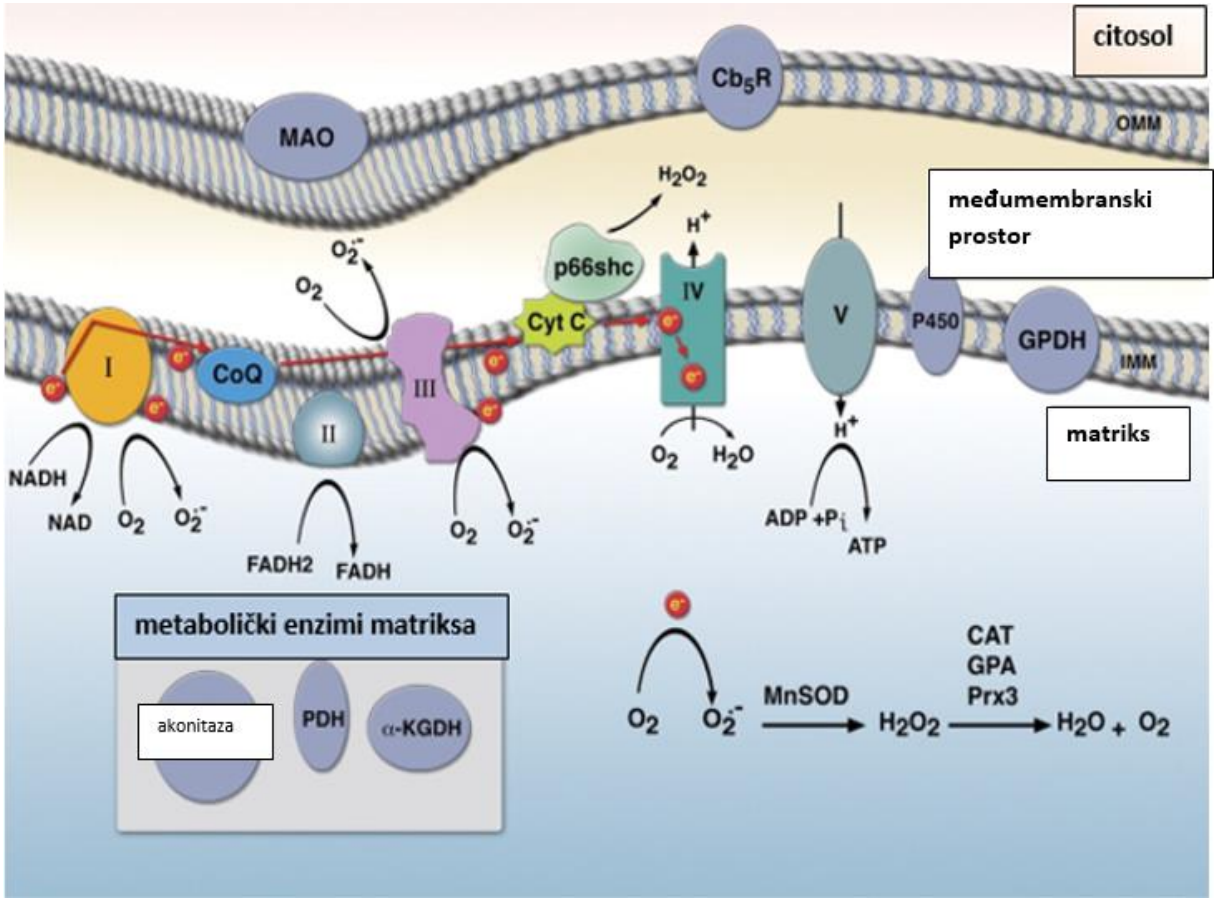
1. UVOD

1.1. Oksidativni stres

Normalnim staničnim metabolizmom nastaju reaktivne kisikove (ROS) i dušikove vrste (RNS). ROS i RNS čine radikale koji mogu reagirati s drugim supstratima (Maes i sur. 2011). U niskim i umjerenim koncentracijama važan su dio normalnih fizioloških procesa stanice (u signalizacijskim putovima, poticanju mitogenog odgovora, obrani od patogena), a u velikim koncentracijama dovode do različitih štetnih promjena, modificiraju stanične komponente kao što su lipidi, proteini, DNA i RNA stanice (Birben i sur. 2012). Reaktivne kisikove i dušikove vrste u mitohondrijima mogu uzrokovati promjenu u metabolizmu što može dovesti do dodatnog povećanja ROS-a i RNS-a što dovodi do oksidacije proteina, lipida i DNA i u mitohondrijima (Islam 2017). Oksidativni stres kao pojam odnosi se na pomak u ravnoteži između oksidansa i antioksidansa u korist oksidansa (Birben i sur. 2012). Svi zdravi aerobni organizmi imaju razvijen antioksidativni sustav koji sprječava veća oštećenja uzrokovana ROS-om. Antioksidativni sustav sastoji se od enzimatskih i neenzimatskih antioksidansa (Birben i sur. 2012).

1.1.1 Podrijetlo oksidansa

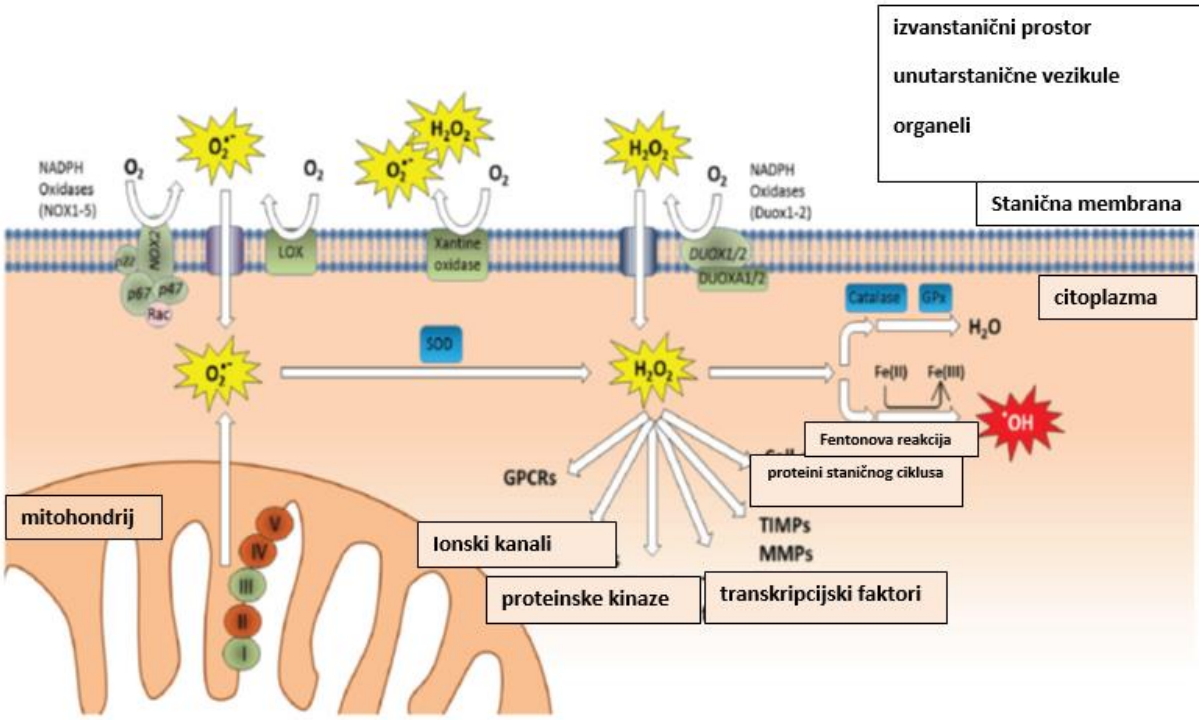
Oksidansi mogu biti endogenog ili egzogenog podrijetla. Unutar stanice postoji više mogućih izvora ROS-a. Jedan od važnih izvora unutarstaničnih oksidansa je porodica membranskih enzima koja koristi NADPH za svoju aktivnost, to su Nox (engl. *NADPH-oxidase*) i Duox (engl. *dual oxidase*). Njihova jedina jasna funkcija je da kontrolirano proizvode ROS. Isprva se mislilo da su ti enzimi specifični samo za fagocitne stanice, no sada znamo da ih posjeduju i mnoge druge stanice. Drugi važan izvor ROS-a su mitohondriji. Većina dokaza pokazuje kako oksidansi u mitohondriju u najvećoj mjeri nastaju na kompleksu I ili kompleksu III citokromskog lanca u kojima elektroni iz NADH ili FADH_2 mogu reagirati s kisikom i stvoriti superoksidni anion (Slika 1.) (Finkel 2011).



Slika 1. Nastanak reaktivnih kisikovih vrsta u mitohondriju

(Preuzeto i prilagođeno od: Finkel 2011)

NAD(P)H i elektronski transportni lanac nakon pojačane stimulacije mogu dovesti do povećane produkcije ROS-a koja ukoliko zakaže endogena antioksidativna obrana može dovesti do oksidativnih oštećenja kao što su posttranslacijske modifikacije i oksidacije proteina, oksidacije lipida i DNA/RNA (Islam 2017). Nekoliko topljivih staničnih komponenata također doprinosi stvaranju unutarstaničnog ROS-a, to su tioli, hidrokvinoni, kateholamini i flavini koji mogu ući u redoks reakcije (Di Meo i sur. 2016). Izvor unutarstaničnog ROS-a su i ezimi: ksantin oksidaza, ciklooksigenaza, enzimi citokroma p450 i lipooksigenaze (LOX) (Slika 2.)(Finkel 2011).



Slika 2. Endogeni izvori kisikovih radikala

(Preuzeto i prilagođeno od: Øvrevik i sur. 2015)

Postoje i brojni egzogeni izvori oksidansa. Jedan od njih je i dim cigarete. On sadrži mnoge oksidanse, slobodne radikale i organske spojeve, kao što su superoksid i dušikov oksid (NO). Osim toga udisanje dima cigarete u plućima aktivira neke endogene mehanizme kao što je aktivacija neutrofila i makrofaga koji proizvodnjom oksidansa dovode do dodatnih oštećenja stanica. Izlaganje ozonu također je štetno jer dovodi do lipidne peroksidacije i ulaska neutrofila u epitel dišnih putova, te do otpuštanja upalnih medijatora kao što su mijeloperoksidaza (MPO), eozinofilni kationski proteini, laktat dehidrogenaza i albumin. Hiperoksija (prezasićenost organizma kisikom) jednako tako dovodi do povećane proizvodnje reaktivnih dušikovih i kisikovih vrsta. Ionizirajuća zračenja uzrokuju promjene na mnogim molekulama i potiču transkripciju brojnih molekula. Ionizirajuće zračenje u prisutnosti molekularnog kisika pretvara hidroksilne radikale, superokside i organske radikale u hidrogen peroksid i organski hidroperoksid. Ove hidroperoksidne vrste reagiraju s redoks aktivnim ionima metala (npr. Fe, Cu) putem Fentonove reakcije što dovodi do oksidativnog stresa. UVA zračenje potiče ekscitaciju porfirina, NADPH oksidaze i riboflavina. Rezultat su brojni oksidacijski produkti, npr. 8-okso-7,8-dihidrogvanin je glavni oksidacijski produkt DNA uzrokovan s UVA zračenjem. Ionizirajuća zračenja potiču transkripciju p53, nuklearnog faktora κB (NF-κB), p38, aktivacijskog proteina 1(AP-1) i dr. Mnogi teški metali (kadmij,

željezo, bakar, živa, nikal, olovo, arsen) također potiču stvaranje reaktivnih radikala. Dio njih poput željeza i bakra stvaraju radikale putem Haber-Weiss/Fentonove reakcije. Dok dio metalnih iona reagira direktno sa staničnim molekulama proizvodeći slobodne radikale poput tiolnih radikala ili potiču stvaranje različitih signalnih puteva (Birben i sur. 2012).

1.1.2. Kisikovi i dušikovi radikali

ROS-ove možemo podijeliti u dvije grupe, na slobodne radikale i neradikale. Slobodni radikali su molekule koje u svojoj vanjskoj ljusci imaju nesparen jedan ili više elektrona koji im daju nestabilnost i veliku reaktivnost (Birben i sur. 2012). Kako bi imali sparene elektrone slobodni radikali su u stalnoj potrazi za elektronima te ih uzimaju od drugih molekula. Molekule donori kada izgube elektron same postaju nestabilne, tj. postaju slobodni radikali (Chauhan 2006). Ukoliko se spoje dva slobodna radikala nastaje neradikal. Tri najčešća i fiziološki važna ROS-a su superoksidni anion (O_2^-), hidroksilni radikal (.OH) i dušikov monoksid (NO·) (Tablica1.).

Tablica 1. Glavni endogeni oksidansi

Oksidansi	Formula	Reakcijske jednadžbe
Superoksidni anion	O_2^-	$NADPH + 2O_2 \leftrightarrow NADP^+ + 2O_2^- + H^+$ $2O_2^- + H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$
Vodikov peroksid	H_2O_2	hipoksantin + H_2O_2 + O_2 ↔ ksantin + H_2O_2 ksantin + H_2O + O_2 ↔ urična kiselina + H_2O_2
Hidroksilni radikal	·OH	$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + 0H^- +$ ·OH
Hipoklorasta kiselina	HOCl	$H_2O_2 + Cl^- \rightarrow HOCl + H_2O$
Peroksilni radikali	ROO·	$R^{\cdot} + O_2 \rightarrow ROO^{\cdot}$
Hidroperoksilni radikal	HOO·	$O_2^- + H_2O \leftrightarrow HOO^{\cdot} + OH^-$

(Preuzeto i prilagođeno od: Birben i sur. 2012)

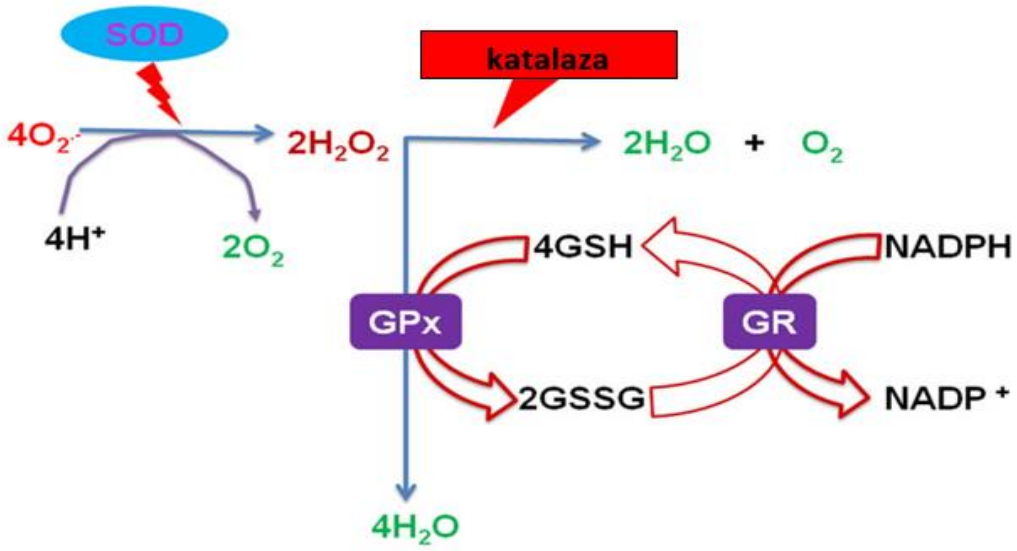
Molekule poput vodikova peroksida (H_2O_2) i peroksinitrita (ONOO -) nisu slobodni radikali ali ih stvaraju različitim kemijskim reakcijama (Uttara i sur. 2009). Glavno mjesto nastanka superoksidnih aniona O_2^- su mitohondriji. Nastanak O_2^- potiče NADPH oksidaza, ksantin

oksidaza ili mitohondrijski elektronski transportni sustav. Polimorfonuklearni leukociti, monociti i makrofagi imaju NAD(P)H oksidazu, tj. mogu stvarati O_2^- koji ima bekteriocidno djelovanje, te u ovom slučaju pozitivnu fiziološku ulogu. Djelovanjem superoksid dismutaze O_2^- prelazi u vodikov peroksid (H_2O_2). H_2O_2 može nastati i djelovanjem ksantin oksidaze, aminokiselinske oksidaze, NAD(P)H oksidaze i u peroksisomima korištenjem molekularnog kisika u metaboličkim reakcijama. H_2O_2 lako difundira kroz plazmatsku membranu. U prisutnosti metala poput Fe^{2+} ili $Cu^{2+}H_2O_2$ može prijeći u OH-. Reakcije prelaska H_2O_2 u OH- nazivaju se Haber-Weiss i Fentonova reakcija. O_2^- može također reagirati s H_2O_2 i dati OH- . Hidroksilni radikali su najreaktivniji ROS-ovi. Granulocitni enzimi mogu dodatno potaknuti reaktivnost H_2O_2 preko eozinofilne peroksidaze i MPO. MPO koristi H_2O_2 u aktiviranim neutrofilima. Ukoliko su prisutni ioni klora H_2O_2 može prijeći u hipoklorastu kiselinu (HOCl). Ona je jako oksidativna, te je važna u uništavanju patogena u dišnim putovima, ali može regirati i s DNA što dovodi do stvaranja međureakcije između DNA i proteina, do nastanka pirimidinskih oksidacijskih produkata, a može dodati i klor na baze DNA. Oksidativnom stresu doprinose i peroksidaza eozinofila, te MPO, tako što halogeniraju i nitriraju proteine, te povezuju proteine preko tirozinskih radikala. Još neki od kisikovih radikala su peroksilni radikali ($ROO\cdot$). Najjednostavniji oblik ovog radikala je hidroperoksil radikal (HOO-) koji dovodi do peroksidacije masnih kiselina. Peroksilni radikali započinju lančanu reakciju koja dovodi do prelaska polinezasićenih masnih kiselina u lipidne hidroperokside. Oni su vrlo nestabilne molekule koje se vrlo brzo raspadaju na sekundarne produkte poput aldehida i malondialdehida. Peroksidacija lipida narušava cjelovitost stanične membrane i dovodi do promjene u njenoj strukturi (Birben i sur. 2012).

1.1.3 Antioksidativni sustav

U zdravom organizmu proizvodnja ROS-a i RNS-a regulirana je preko sustava neenzimskih antioksidansa, antioksidativnih enzima i proteina. Antioksidansi skupljaju radikale, smanjuju njihovu proizvodnju i tako sprječavaju nastanak oštećenja uzrokovanih njihovim djelovanjem (Maes i sur. 2011). Neenzimatski antioksidansi su molekule male molekularne mase. U njih ubrajamo vitamine C (askorbinska kiselina) i E (α-tokoferol), β-karotene, uričnu kiselinu, GSH i tripeptid (L-γ-glutamil-L-cisteinil-L-glicin) (Birben i sur. 2012). Kisikovi radikali poput peroksida i superoksida mogu biti neutralizirani različitim antioksidativnim enzimima

poput superoksid dismutaze (SOD), glutationperoksidaze (GPX) i katalaze koji su glavni antioksidativni enzimi (Slika 3.) (Maes i sur. 2011).



Slika 3. Enzimatski antioksidativni sustav obrane od ROS-a

(Preuzeto i prilagođeno od: Finosh i Jayabalan 2013)

Ti enzimi mogu doći u više oblika, primjerice imamo 3 oblika SOD: CuZn-SOD, Mn-SOD i EC-SOD, različiti oblici ovog enzima preferiraju različita mjesta u organizmu, primjerice Mn-SOD se nalazi u matriksu mitohondrija, a EC-SOD primarno djeluje u izvanstaničnom matriksu (Birben i sur. 2012). Neki proteini djeluju poput antioksidansa vežući ROS-ove i RNS-ove. Takvi proteini su albumin, transferin, haptoglobin i ceruloplazmin. Ukoliko dođe do smanjene koncentracije antioksidansa u tijelu ili do smanjene aktivnosti antioksidativnih enzima i povećane proizvodnje ROS-a i RNS-a može doći do oksidativnog stresa, tj. do oksidativnog oštećenja membranskih lipida (lipidna peroksidacija) i DNA, te nitrozativnog oštećenja proteina. Daljnji procesi mogu dovesti do nefunkcioniranja stanice zbog oštećenja stanične membrane, mitohondrija, DNA i funkcionalnih proteina, što u konačnici dovodi do apoptoze stanice (Maes i sur. 2011).

1.1.4. Oksidativni stres i neuroupala

Metabolički najaktivniji organi najosjetljiviji su na oksidativni stres. Mozak je zbog metaboličke hiperaktivnosti i visoke stope konzumacije kisika (20%), velike potrebe za energijom i male mogućnosti regeneracije, te mnogo polinezasićenih masnih kiselina u staničnim membranama neurona, visokog sadržaja željeza i male aktivnosti antioksidativnih enzima (Yuan i sur. 2012) najosjetljiviji dio tijela na reaktivne vrste. Kortikalni neuroni ljudskog mozga prosječno troše 4,7 milijardi molekula ATP-a po sekundi. Mitohondriji zbog svoje opskrbe neurona ATP-om uz pomoć oksidativne fosforilacije, ali i brojnih drugih važnih funkcija igraju važnu ulogu u zdravom funkcioniranju mozga. Mitohondrijska proizvodnja ATP-a podržava stvaranje sinapsa, te stvaranje i prijenos akcijskog potencijala duž neurona. U sinaptičkoj pukotini održavaju i reguliraju neurotransmisiju održavanjem razine kalcija (Ca^{2+}). Kalcijevi ioni čiju količinu reguliraju u stanici važni su i u održavanju normalne transkripcije gena. Oksidativnim stresom oštećena mtDNA, neravnoteža u mitohondrijskom respiratornom lancu i homeostazi Ca^{2+}, ekscitotoksičnost, apoptoza, propusnost membrane i mitohondrijski obrambeni sustav odgovorni su za pojavnost neurodegnerativnih bolesti ili povećanje već postojećih neuralnih disfunkcija i pokretanje neurodegeneracije (Islam 2017). Ekscitacijske aminokiseline i neurotransmiteri u mozgu također mogu svojim metabolizmom doprinijeti stvaranju ROS-a (Uttara i sur.2009). Povećane razine ROS-a potiču transkripciju proupalnih gena, otpuštanje citokina (interleukina-1 i -6), čimbenika nekroze tumora (TNF-α) i kemokina. Sve to dovodi do neuroupale. Upala potom pokreće aktivaciju mikroglija- stanica i astrocita koji stvaraju velike količine dodatnog ROS-a. Na taj način dolazi do kroničnog oksidativnog stresa (Islam 2017). Osim toga oštećenja uzrokovana ROS-om i RNS-om mogu dovesti do autoimunog odgovora. Tijekom upale lipidi membrana mozga, mišića i živčanih stanica mogu biti oštećeni oksidativnim stresom. Aktivirani neutrofili i monociti mogu dovesti do povećane proizvodnje dušikova oksida i peroksinitrita što može dovesti do nitracije i nitrozilacije proteina. Tijekom tih procesa dolazi do promjene kemijske strukture inače sveprisutnih molekula, te nastaju brojni modificirani novi epitopi, koji su jako imunogenični. Tako oksidacija masnih kiselina autoepitopa koji su u normalnim uvjetima sakriveni od imunološkog sustava, može dovesti do njihova prepoznavanja od strane imunološkog sustava što dovodi do oštećenja komponenti lipidne membrane (Maes i sur. 2011). Sve to pokreće kaskadu događaja koji dovode do razvoja nekih neurodegenerativnih bolesti poput Alzheimerove bolesti, Amiotrofične lateralne skleroze, Huntingtonove bolesti, Multiple skleroze i Parkinsonove bolesti. Oksidativni stres u nekim slučajevima uzrokuje krivo

smatanje proteina što također dovodi do nekih neurodegenerativnih bolesti poput: Creutzfeldt-Jakobove bolesti, Goveđe spongioformne encefalopatije, Kuru bolesti, Gerstmann-Straussler-Scheinkerovog sindroma i Fatalne obiteljske insomnije (Islam 2017).

1.2. Alzheimerova bolest

Simptomi Alzheimerove bolesti prvi su put opisani 1901. godine. Opisao ih je doktor Aloysius Alzheimer kod pacijentice Auguste Deter. 1906. nakon što je pacijentica umrla doktor Alzheimer je zatražio autopsiju. Tada je primjetio da je došlo do atrofije mozga, te da su u mozgu prisutni amiloidni plakovi (Aβ) i neurofibrilarni snopići (engl. NFT, *neurofibrillary tangles*) koji su poslije postali sinonim ove bolesti (Hippius i Neundörfer 2003). Alzheimerova bolest (AB) je najčešći tip demencije i prema procjenama 10% svjetske populacije pati od ove neurodegenerativne bolesti (Islam 2017). Demencija je pojam koji predstavlja stanje smanjene mogućnosti pamćenja i razmišljanja koje je uzrokovano oštećenjem neurona u mozgu. Oštećeni neuroni odumiru što dovodi do promjena u ponašanju, pamćenju i mišljenju. Ljudi u uznapredovaloj fazi ove bolesti imaju problema s osnovnim životnim funkcijama kao što su hodanje i gutanje, a u konačnici ova bolest dovodi do smrti (Alzheimer's Association 2014). Postoji mnogo čimbenika rizika koji mogu dovesti do pojavka Alzheimerove bolesti. Neki od njih su: ozljeda glave, depresija, hipertenzija, dislipemija, pušenje, pretilost, dijabetes (Dillon i sur. 2016), virusi, toksini, niska razina edukacije (Bird 2008). No jedan od najvažnijih čimbenika jest starost. Tako je u populaciji ljudi od 60-65 godina vjerojatnost oboljenja veća za ~0.1%, a u populaciji ljudi iznad 85 godina pojavnost je veća za 47%. Većina AB javlja se u kasnijoj životnoj dobi i nije genetički uvjetovana, te se takav tip AB karakterizira kao sporadični. Tek manji broj ljudi obolijeva od AB koja je nasljedna i koja se javlja rano u životu. Takav tip AB-a uzrokovan je nasljeđivanjem nekih mutiranih gena. Najčešće su to geni koji kodiraju za β-amiloidni prekusorski protein (APP), presenilin 1 (PS1) i presenilin 2 (PS2). No tu su i neki drugi geni čija mutacija može dovesti do povećanog rizika od obolijevanja od AB. To su gen za apolipoprotein E (ApoE), gen za α-makroglobulin i endotelnu dušik oksid sintazu-3 (Yamada i Nabeshima 2000).

1.2.1. Geni uključeni u patologiju Alzheimerove bolesti

U 1-6% slučajeva AB javlja se ranije u životu (prije 60. godine), od toga 60% je tip AB koja se javlja obiteljski, a 13% se nasljeđuje na autosomno dominantan način. Čvrstu granicu između Alzheimerove bolesti koja se javlja ranije u životu (prije 60. godine) i kasnije (poslije 60. godine) nije moguće utvrditi (Bird 2008). No bez obzira o kojem se tipu bolesti radi, obilježava ga između ostaloga abnormalno stvaranje, razaranje i nakupljanje β amiloida, koji dovodi do dijela neuropatologije. A u nastanku tih procesa i posljedično pokretanju ili progresiji patologije AB sudjeluje više gena, poput APP, BACE1, PS1/2, ApoE, NEP, IDE...(Dong i sur. 2012).

1.2.1.1. Gen za amiloid prekusorski protein (APP)

APP protein kodiran je jednim genom koji se nalazi na 21. kromosomu. Sastoji se od 19 egzona, te kodira za nekoliko alternativno izrezanih (engl. *alternatively spliced*) APP mRNA. Prekomjerna ekspresija ovog gena prisutna je kod trisomije 21 (Downov sindrom), a „missense“ mutacije (pogrešna mutacija koja mijenja kodon za jednu aminokiselinu u kodon za drugu) prisutne su kod obiteljskog oblika AB-a. Osobe oboljele od Downovog sindroma imaju mnogo Aβ plakova građenih samo od Aβ_{42} i to već u njihovim dvadesetima, ali nemaju NFT. Potpunu AB neuropatologiju razviju do njihovih pedesetih godina. „Missense“ mutacije APP gena javljaju se u blizini mjesta rezanja α, β i γ sekretaze. Prva mutacija APP gena za koju je otkriveno da je povezana s AB (glutamin zamijenjen s glutamičnom kiselinom na kodonu 693 APP770) javlja se u obiteljima s nasljednom cerebralnom hemoragijom s amiloidozom Dutch tipa. Mutacija na kodonu 692 u nekim slučajevima vodi do AB, a u nekim do cerebralne hemoragije i angiopatije. U obiteljskom obliku AB pronađena su tri tipa supstitucija u kodonu 717 (V717I, V717G, V 717F). Rana pojava AB u Švedskoj populaciji povezana je s mutacijama u kodonima 670 i 671. Mutacije APP-a u AB koje dovode do povećane razine Aβ_{42} su APP692, APP716 i APP717 mutacije, a do ukupnog povećanja Aβ dovodi APP670/671 (Yamada i Nabeshima 2000).

1.2.1.2. Gen za apolipoprotein E

ApoE gen smješten je na kromosomu 19 (Yamada i Nabeshima 2000) i ima tri vrste alela ApoE2, ApoE3 i ApoE4. Aleli se razlikuju u samo dvije aminokiseline na mjestima 112 i 158. ApoE3 ima cistein na mjestu 112 i arginin na mjestu 158, dok ApoE4 ima arginin na oba mjesta, a ApoE2 cistein na oba mjesta. Ta razlika u alelima ApoE proteinu daje različitu funkciju. I dok je ApoE2 protein neuroprotektivan, ApoE4 se povezuje s brojnim bolestima (Dong i sur. 2012). Kod obiteljske AB s kasnijom pojavnošću i sporadične AB primjećena je značajno povećana frekvencija ApoE4 alela, u usporedbi s općom populacijom(Yamada i Nabeshima 2000), te se smatra da je on jedan od glavnih čimbenika rizika za obolijevanje od AB s obzirom na prisutnu razinu kolesterola, homocisteina i nekoliko metalnih iona (Al, Cu, Fe) (Bharathi i sur. 2008). Najveća korelacija između ApoE4 alela i pojavnosti AB primjećena je u slučaju kada je prisutan genotip e4/e4. ApoE glikoprotein je glavni serumski protein uključen u pohranu, transport i metabolizam kolesterola (Yamada i Nabeshima 2000), te kakav će biti njegov utjecaj ovisi o razini kolesterola (Dong i sur. 2012). Astrociti ga stvaraju i ispuštaju u središnji živčani sustav. Akumulira se u senilnim plakovima i NFT. *In vitro* je pokazano kako se ApoE veže za topljivi Aβ i potiče nastanak fibrila (Yamada i Nabeshima 2000).

2.2.3. Geni za presenilin 1 i 2

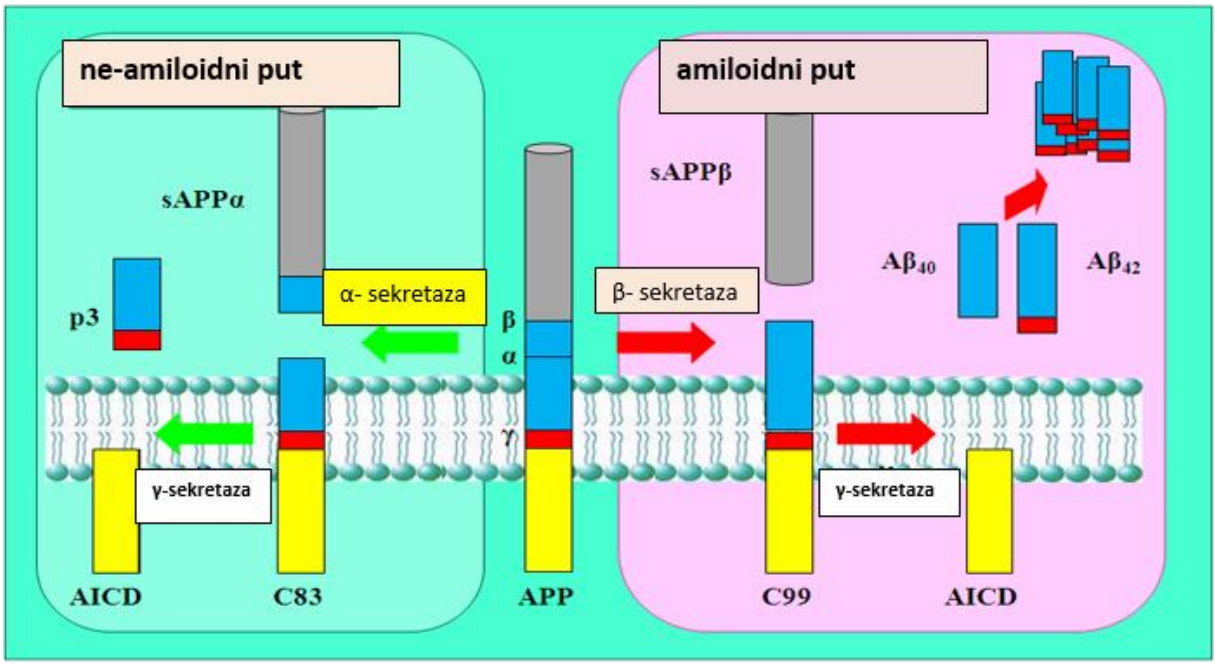
Presenilin 1 gen nalazi se na kromosomu 14, a presenilin 2 gen na kromosomu 1(Yamada i Nabeshima 2000). Mutacije u PS1 genu smatraju se najčešćim genskim uzrokom rane pojavnosti obiteljskog tipa AB (familial AD, FAD). Opisano je više od 100 mutacija PS1 gena od kojih se neke povezuju s vrlo ranim (prije 30 godine života) smanjenjem kognitivnih sposobnosti. Mnoge mutacije u PS1 genu dovode do povećanog stvaranja Aβ_{42} (Dong i sur. 2012). Proteini PS1 i PS2 su visoko homologni politopički proteini. Sastoje se od 463 i 448 aminokiselina (Yamada i Nabeshima 2000). PS 1 i 2 imaju važnu ulogu u mnogim fiziološkim funkcijama koje možemo podijeliti na funkcije ovisne o γ-sekretazi i funkcije neovisne o njoj. PS je uključen u brojne funkcije koje reguliraju razvoj, homeostazu kalcija, staničnu adheziju, transport, lokalizaciju i apoptozu. Smatra se da mutacije PS gena koje su povezane s FAD smanjuju γ-sekretaznu proteolizu nekih supstrata poput Notch unutarstanične domene, N-kadherina i tirozinaze, jer eksprimirani, promjenjeni PS protein ne može vršiti

svoju funkciju. Neke mutacije PS gena pronađene u FAD utječu i na neke druge funkcije neovisne o γ-sekretazi kao što su regulacija β-katenin-ovisnog signalnog puta, fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfatnog metabolizma, otpuštanja Ca^{2+}iz endoplazmatskog retikuluma, regulacija neurozaštite ovisne o PI3K/Akt (fosfoinozitol 3 kinaze/protein kinaza B) signalnom putu, sinaptičke homeostaze i brzog aksonalnog transporta APP-a. Produkti PS gena sudjeluju i u regulaciji degradacije Aβ neprilizinom (Dong i sur. 2012).

1.2.2. Amiloid β-peptid

Amiloid β-peptid (Aβ) prvi je put izoliran iz amiloidnih nakupina mozga pacijenta oboljelog od AB i Downova sindroma. Veličine je od~4 kDa odnosno od 39-43 aminokiseline (Murphy i LeVine III 2010). Aβ nastaje iz APP-a koji je kodiran genom na 21. kromosomu. Alternativnim izrezivanjem (engl. *alternative splicing*) nastaju tri glavne izoforme APP-a. Najprisutnija izoforma je APP695 (695 aminokiselinskih ostataka) koja se eksprimira u neuronima i nema domenu Kunitz proteazni inhibitor (engl. *Kunitz protease inhibitor domain*) koja je prisutna u izoformama APP751 i APP770. APP se za vrijeme translacije translocira u endoplazmatski retikulum pomoću signalnog peptida, gdje sazrijeva prolazeći kroz trans-Golgi mrežu. U sekrecijskom putu postaje N-glikoziliran, O-glikoziliran i tirozil-sulfatiran. APP ima brojne funkcije: doprinosi homeostazi staničnog željeza, regulira unutarstanični transport putem međureakcije s motornim proteinima poput kinezina, receptor je na površini stanice, potiče preživljenje neurona i njihovu uspješnu adhezijsku međureakciju, potiče razvoj neuritskih izrasta, sinaptogenezu i sinaptičku plastičnost. Također povećava sposobnost pamćenja. Za izvanstanične ulomke nastale njegovim izrezivanjem smatra se da imaju neuroprotektivnu ulogu, da potiču rast aksona i da su povezani s naslijeđenim imunološkim mehanizmom obrane, te da imaju antibakterijska peptidna svojstva. Izrezivanje APP se uglavnom odvija kroz α i β put. U α putu (ne-amiloidni put) α-sekretaza (skupina metaloproteinaznih enzima) reže APP kod lizina 16 i nastaje topljivi oblik APP-a, N-terminalni α-APP fragment (Yamada i Nabeshima 2000). Nastali C-terminalni dio APP-a (CTF, engl. *C-terminal fragment*) veličine 83 aminokiseline reže γ-sekretaza na N kraju i nastaje peptid p3. γ-sekretaza izrezivanjem CTF-a može također stvoriti AICD (engl. *APP intracellular domain*) koji se još naziva i CTFγ. AICD je citosolni element za koji se smatra da ima ulogu u prijenosu signala (Murphy i LeVine III 2010). Aktivirani muskarinski i metabotropni glutamatni receptori dovode do povećanog lučenja α-APP-a putem protein

kinaznog C-ovisnog mehanizma. Do povećanog lučenja α-APP-a mogu dovesti i protein kinaza C-neovisni putevi kao što su kolesterolom, ApoE i stresom aktivirani putevi (Yamada i Nabeshima 2000). U β-putu (amiloidni put) β- sekretaza (BACE/Asp2) reže APP na N-terminalni topljivi APP fragment (β-APP) koji se otpušta i βCTF (engl. *β-C-terminal fragment of APP*) fragment veličine 99 aminokiselina koji ostaje vezan za membranu. βCTF tada reže γ-sekretaza i nastaje Aβ (Slika 4.).



Slika 4. Amiloidni i ne-amiloidni put procesiranja APP-a

(Preuzeto i prilagođeno od: Babusikova i sur. 2013)

Izrezivanje γ-sekretaze je neprecizno te rezultira C-terminalnom heterogenosti i nastankom peptidne populacije. Usprkos velikom broju različitih vrsta amiloid β-peptida ipak prevladavaju oni građeni od 40 aminokiselina ($A\beta_{40}$) na njih otpada ~80-90 % nastalih Aβ. Druga najčešća vrsta Aβ su oni koji su građeni od 42 aminokiseline ($A\beta_{42}$, ~5-10 %). $A\beta_{42}$ su više hidrofobni i fibrilogeni, te su glavna vrsta Aβ koja se nakuplja u mozgu (Murphy i LeVine III 2010). Isprva se mislilo da je β-put abnormalni način izrezivanja APP-a, ali je kasnije dokazano da je prisutan i u zdravih ljudi (Yamada i Nabeshima 2000).

1.2.2.1. γ- sekretaza

γ- sekretaza je enzim koji se sastoji od više podjedinica, tj. od proteina APH1, PEN2, nikastrina i presilina (PS1 ili PS2). Enzimski kompleks sadrži po jednu kopiju svakog od navedenih proteina. Točna funkcija svake od komponenti još nije posve poznata, ali su sve četiri potrebne kako bi γ-sekretaza normalno funkcionirala. Za presenilin se pretpostavlja da tvori aktivno mjesto aspartilne proteaze, dok nikastrin povezuje podjedinice enzima. γ-sekretaza ima specifičan način djelovanja, naime može izrezivati supstrat samo ako je u lipidnom dvosloju i ako je prije toga drugom proteazom izrezana i uklonjena velika ektodomena. Ovaj enzim nema neki specifični slijed koji prepoznaje substrat, već se prepoznavanje odvija putem mnogih drugih čimbenika, pa tako i prepoznavanjem duljine transmembranske domene. U AB γ-sekretazna aktivnost se ne povećava već dolazi do promjena u njezinom djelovanju što za posljedicu ima stvaranje dužih oblika Aβ. Do njene promjene dolazi zbog genskih promjena. Sve to dovodi do rane pojavnosti bolesti i razvoja obiteljskog oblika AB (Murphy i LeVine III 2010).

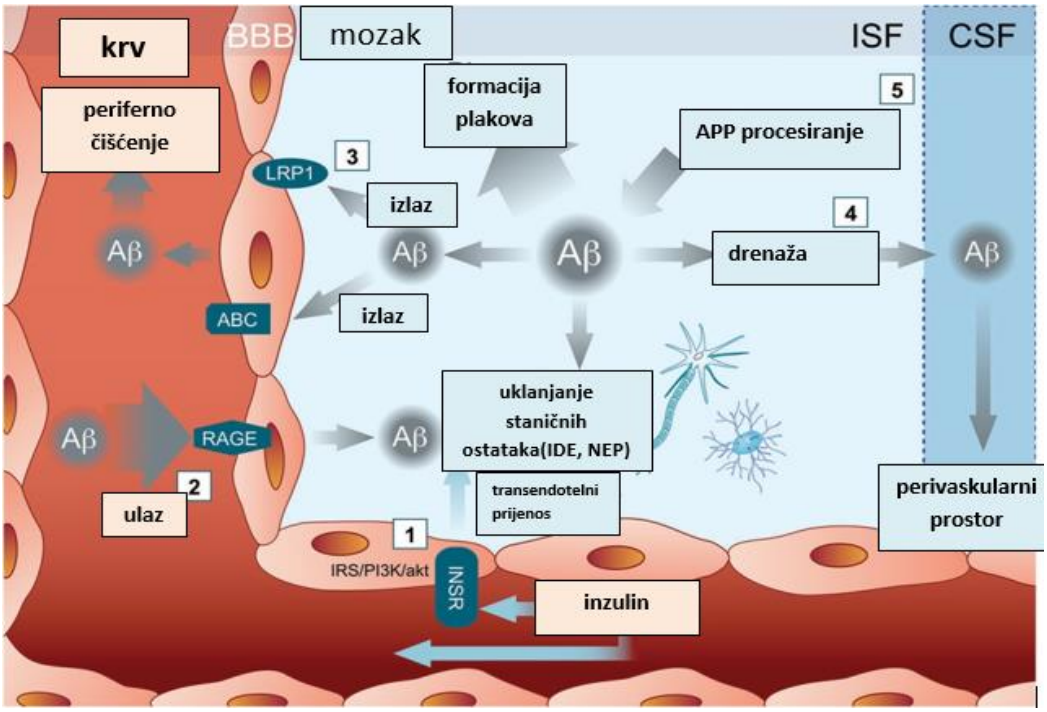
1.2.2.2. β-sekretaza

β-sekretaza je za membranu vezana aspartilna proteaza, koja reže svoje supstrate izvan lipidnog dvosloja. Postoje dva glavna oblika ovog enzima BACE1 i BACE2. BACE1 je najviše eksprimiran u mozgu, ali je u manjoj mjeri prisutan i u drugim organima. Odgovoran je za stvaranje Aβ. Kod BACE2 je obrnuta situacija, u maloj mjeri se eksprimira u mozgu, a u puno većoj je prisutan u većini perifernih tkiva. U sporadičnom tipu AB značajno je povećana β-sekretazna aktivnost (Murphy i LeVine III 2010).

1.2.2.3. Razgradnja Aβ

Neprilizin (NEP, engl. *neprilysin*) i inzulin razarajući enzim (IDE, engl. *insulin degrading enzyme*) su dva glavna enzima odgovorna za razaranje Aβ. Neprilizin je tip II metaloproteinaze koji je vezan za plazmatsku membranu i izvan stanice razara brojne peptide. IDE je metaloproteinaza koja razara proteine u stanici i izvan nje. IDE ima 20 puta veći afinitet za inzulin nego za Aβ, ali daleko sporije hidrolizira inzulin. Inzulin se na taj način

ponaša kao inhibitor razgradnje Aβ putem IDE. U AB smanjena je količina i NEP i IDE. Uz ova dva navedena enzima ulogu u razaranju Aβ imaju i lizosomi pomoću enzima katepsina B. Ipak velike količine Aβ ostaju nerazgrađene, te postoje stanični mehanizmi kojima se Aβ prenosi preko krvo-moždane barijere (engl. *blood brain barrier*) u krvotok. Ukoliko dođe do promjene u tim mehanizmima, dolazi do zaostajanja velikih količina Aβ u mozgu. Topljivi Aβ se prenosi preko krvo-moždane barijere pomoću LRP proteina (engl. *low-density lipoprotein receptor-related protein*) koji se nalazi s moždane strane i RAGE receptora (engl. *receptor for advanced glycation end products*) koji se nalazi na luminalnoj strani krvne žile. Nije poznato zašto postoji taj dvosmjerni protok Aβ kroz krvo-moždanu barijeru (Slika 5.) (Murphy i LeVine III 2010).



Slika 5. Dvosmjerni protok Aβ kroz krvo-moždanu barijeru preko LRP i RAGE receptora (Preuzeto i prilagođeno od: Vandal i sur. 2015)

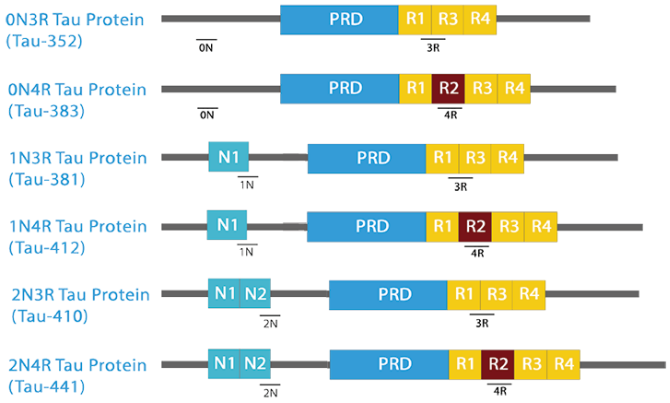
1.2.2.4. Neurotoksičnost amiloid β-peptida

Oligomeri Aβ nastaju u mnogo većoj mjeri od Aβ_{42} nego od Aβ_{40}. C kraj Aβ_{42} je nužan kako bi došlo do sinteze oligomera. Znamo da su topljivi oligomeri biološki aktivni i mogu dovesti do stanične smrti u određenim fiziološkim uvjetima, ipak još uvijek ne znamo način na koji to rade (Murphy i LeVine III 2010). Da bi Aβ peptidi postali toksični moraju tvoriti fibrile,

ukoliko ih ne tvore već ostanu u amorfnom stanju nisu neurotoksični. Za konformacijski promijenjeni oblik Aβ koji može potaknuti razvoj fibrila vjeruje se da nastaje u unutarstaničnim kolesterolom bogatim domenama (Yamada i Nabeshima 2000). Prvi korak u nastanku fibrila jest nukleacija odnosno formiranje nukleusa agregacije. Pokazano je kako fibrile može stvoriti nukleus od dimera Aβ. U fazi elongacije na nukleus se vežu monomeri ili oligomeri Aβ (Serpell 2000). Povećan rizik od AB imaju oni ljudi koji imaju ApoE4 alel koji doprinosi metalom-induciranoj agregaciji Aβ, posebice u prisutnosti bakra i cinka. *In vitro* je pokazano da agregaciju potiče i enzim acetilkolinesteraza (AchE). Primjećeno je i da je Aβ/AChE kompleks još toksičniji od samih Aβ fibrila. Aβ u neuronima dovodi do brzog stvaranja H_2O_2 i lipidne peroksidacije, tj. oksidativni stres je uključen u Aβ neurotoksičnost. Aβ destabilizira homeostazu Ca^{2+} te su neuroni osjetljivi na ekcitotoksičnost, mijenja staničnu ionsku aktivnost na način da stupa u međureakciju s postojećim ionskim kanalima ili potiče stvaranje novih. Za neurotoksičnost Aβ važna je i MAP kinaza (engl. *mitogen-activated protein kinase*) koja upravlja s više aspekata Aβ inducirane neurotoksičnosti (nakupljanjem unutarstaničnog Ca^{2+}, reaktivnim kisikovim vrstama, fosfo-tau imunoreaktivnošću i apoptozom). Neurotoksičnost Aβ u konačnici dovodi do apoptoze neurona. Aβ neovisno o navedenoj neurotoksičnosti ometa funkciju kolinergičnih neurona. Primjerice topljivi $A\beta_{42}$ smanjuje aktivnost piruvat dehidrogenaze tako što aktivira mitohondrijsku tau protein kinazu I/glikogen sintazu kinazu-3β i dovodi do smanjene sinteze ACh. Također pokazano je da inhibira visoko afinitetni unos kolina i otpuštanje ACh u hipokampusu štakora. Aβ ometa i muskarinske receptore tako što se veže na G proteine i dovodi do akumulacije fosfoinozitola i otpuštanja Ca^{2+}. Dosadašnja su istraživanja pokazala da se količina topljivog $A\beta_{42}$ povećava u ranoj i srednjoj fazi AB. Te se smatra da kolinergična hipofunkcija koju je uzrokovao topljivi Aβ dovodi do osjetljivosti kolinergičnih neuronskih populacija i kognitivnih poteškoća u ranoj fazi AB. Aβ aktivira i mikroglija-stanice koje otpuštaju proteolitičke enzime, citokine, slobodne radikale i NO koji djeluju neurotoksično. Dokazane su dvije vrste mikroglijalnih receptora za Aβ, to su receptori čistači (engl. *scavenger receptors*) za fibrile i RAGE receptor za topljivi Aβ (Yamada i Nabeshima 2000).

1.2.3. Tau protein

Tau je protein pridružen mikrotubulima, uključen je u građu mikrotubula i njihovu stabilizaciju. U mozgu postoji 6 izoformi koje su sve kodirane jednim genom na kromosomu 17 i potom nastale alternativnim izrezivanjem njihove pre-mRNA. Te izoforme razlikuju se u tome da li sadrže 3(3R) ili 4 (4R) mikrotubul vezna mjesta od 31-32 aminokiseline na karboksilnom kraju, te da li sadrže jedan (1N), dva (2N) ili ni jedan (0N) umetak od 29 aminokiselina na amino kraju (Slika 6.).



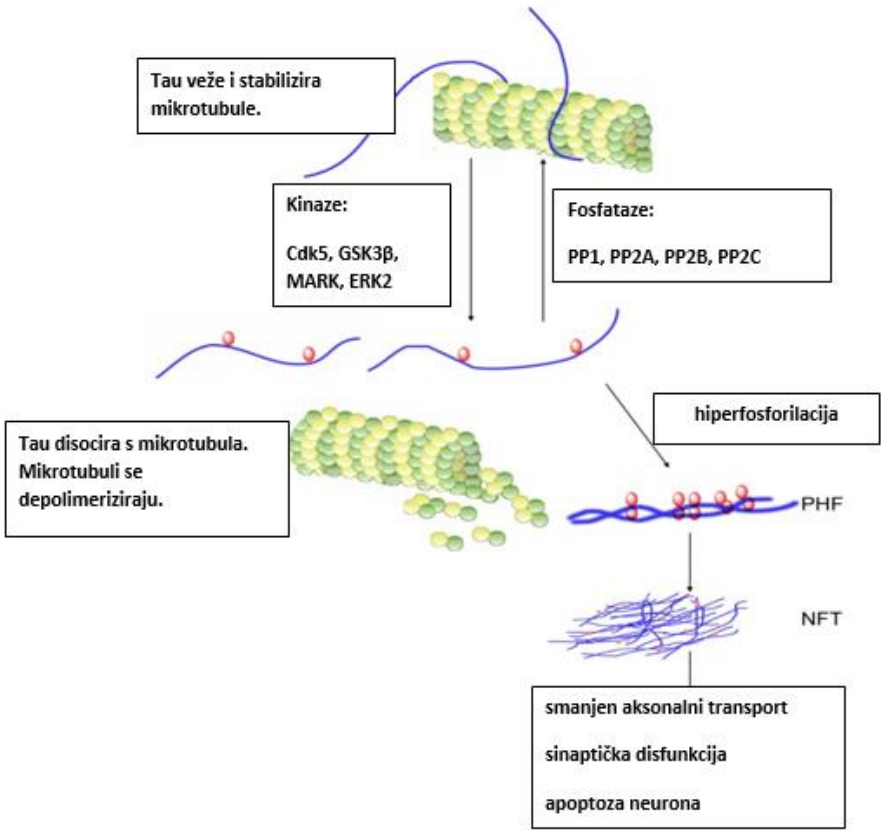
Slika 6. Izoforme Tau proteina

(Preuzeto i prilagođeno od:https://www.biolegend.com/tau)

Tau je fosfoprotein čija je glavna zadaća pokretanje sastavljanja tubulina u mikrotubule i tada njihova stabilizacija. Kao fosfoproteinu aktivnost mu je regulirana stupnjem fosforilacije. U zdravom mozgu tau ima 2-3 mola fosfata po molu proteina što je idealno za njegovu međureakciju s tubulinom. Također u zdravom mozgu tau je prisutan u topljivom obliku, dok ga u osoba oboljelih od AB nalazimo u topljivom obliku, obliku oligomera i fibrila. U mozgu oboljeloga od AB nalazi se normalni citosolni tau u jednakoj količini kao i kod zdravog mozga, ali je povećana ukupna količina tau zbog povećane količine hiperfosforiliranog tau proteina. Abnormalno fosforilirani tau je 3 do 4 puta više fosforiliran od normalnog zbog čega tvori uparene helikalne filamente i gubi sposobnost stabiliziranja aksonalnih mikrotubula. Istraživanja su pokazala da nema značajnih promjena u ekspresiji tau proteina kod oboljelih od AB, već se smatra da ga u stanicama ima više jer se ne razgrađuje u mjeri u kojoj bi trebao. Hiperfosfolirirani tau je rezistentan na kalcijem aktivirane proteaze, kalpain i ubikvitiski proteosomski put razgradnje. Kod oboljelih od AB nisu pronađene mutacije u genu za Tau (Iqbal i sur. 2010).

1.2.3.1. Neurotoksičnost proteina tau

Tau ima dugačke pozitivno i negativno nabijene regije koje nisu pogodne za međusobno hidrofobno povezivanje molekula. Zato je β-struktura tau proteina smještena samo u ponavljajućim regijama R2 i R3 koje mogu tvoriti filamente, te se povezivati s heparinom. U normalnih tau proteina amino i karboksilni kraj bočnih regija mikrotubul veznih mjesta međusobno inhibiraju agregaciju, dok fosforilacija amino i karboksilnog kraja uklanja tu inhibiciju i omogućava stvaranje fibrila. Neurofibrilarni snopići su inertni i ne vežu se za tubulin, te ne potiču nastanak mikrotubula nego ih narušavaju (Slika 7.).



Slika 7. Funkcija Tau proteina i promjene do kojih dolazi zbog njegove hiperfosforilacije (Preuzeto i prilagođeno od: Duan i sur. 2012)

Hiperfosforilirani tau dovodi do smanjenja količine normalnog tau proteina kao i do smanjenja druga dva važna mikrotubulima pridružena proteina MAP1 A/B i MAP2. U somatsko-dendritičkom dijelu neurona tau je povezan s hrapavim endoplazmatskim retikulumom i Golgijevim aparatom. Njegova abnormalna hiperfosforilacija i akumulacija u somatsko-dendritičkom dijelu stanice vjerojatno je odgovorna za primjećene morfološke promjene hrapavog endoplazmatskog retikuluma i Golgija, te abnormalnu N-glikozilaciju tau

proteina koja je zamjećena kod AB. Istraživanja na staničnoj kulturi neurona i na transgeničnim miševima su pokazala da takav tau potiče fragmentaciju Golgija. Smatra se i da kronično nakupljanje nepravilno smotanog, hiperfosfoliriranog tau proteina može dovesti do neurodegeneracije i zbog dugotrajnog stresa koji nastaje u endoplazmatskom retikulumu (Iqbal i sur. 2010).

Istraživanja su pokazala da postoji poveznica između senilnih plakova i NFT-a. Naime Aβ snopići potiču fosforilaciju tau proteina, te dolazi do gubitka sposobnosti mikrotubularnog vezanja i somatsko-dendritične akumulacije. Tau može fosforilirati više protein kinaza: GSK-3β, MAP kinaza, ciklin-ovisna kinaza-5, protein kinaza A, kinaza koja regulira afinitet mikrotubula (engl. *microtubule-affinity-regulating kinase*). A Aβ može povećati aktivnost više vrsta proteinskih kinaza, primjerice GSK-3β koja tada pojačano fosforilira tau protein (Yamada i Nabeshima 2000).

1.2.4. Neuroupala u Alzheimerovoj bolesti

Od samih početaka kako je Alzheimerova bolest otkrivena primijećeno je da je neuroupala prisutna u mozgu bolesnika (Latta i sur. 2015). Ipak trebalo je dosta vremena da otkrijemo da li je njeno djelovanje pozitivno ili negativno za mozak. Istraživanja su pokazala da akutna neuroupala ima pozitivan učinak, jer pomaže uspostavljanju narušene homeostaze u mozgu, dok kronična neuroupala dovodi do progresivne neurodegeneracije. Klinička istraživanja s nesteroidnim protuupalnim lijekovima pokazala su da ti lijekovi mogu odgoditi ili spriječiti pojavnost simptoma AB samo ukoliko se daju u ranoj fazi razvoja bolesti dok još nije došlo do većeg oštećenja mozga uzrokovanog kroničnom neuroupalom. Uz sve dosadašnje znanje još uvijek u potpunosti ne razumijemo na koji je način neuroupala prisutna u AB, te nam pozitron emisijska tomografija (PET) uvelike olakšava daljnje neinvazivno, *in vivo* praćenje neuroupalnih procesa u mozgu (Zimmer i sur. 2014).

1.2.4.1. Mikroglija

Glavni medijator neuroupalnog odgovora u mozgu su mikroglija-stanice. One u svojem mirujućem stanju uklanjaju patogene, stanične ostatke i toksine iz mikrookoliša neurona (Latta i sur. 2015). Također mikroglija je važna u održavanju plastičnosti neuronskog kruga,

doprinoseći zaštiti i remodeliranju sinapsi (Heneka i sur. 2015). Jednom kada su aktivirane mikroglija-stanice proliferiraju i odlaze na mjesto ozljede kako bi svojom fagocitnom funkcijom i otpuštanjem različitih proupalnih medijatora ponovno povratile homeostazu tkiva. Različitim istraživanjima je pokazano kako mikroglija-stanice ne otpuštaju samo neurotoksične molekule već i neuroprotektivne citokine poput transformirajućeg čimbenika rasta-β1 (engl. *transforming growth factor-β1*) (Zimmer i sur. 2014). Baš poput makrofaga i mikroglia-stanice mogu biti aktivirane na više načina ovisno o stimulansu i tako različito odgovarati na potrebe organizma. U prisutnosti IFN-γ ili TNFα iz T stanica, antigen predočnih stanica ili NK stanica (engl. *natural killer cell*) mikroglia-stanice će započeti stvarati proupalne citokine (IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, TNFα), te kisikove i dušikove radikale. U ovom slučaju govorimo o M1 aktivaciji, takva mikroglija regulira upalni odgovor. M2 mikroglija potiče popravak i zaštitu, te zaustavlja imunološki odgovor. M2 mikroglija ovisno o citokinima prelazi u M2a, M2b ili M2c oblik. Ukoliko su mikroglija-stanice stimulirane s IL-4 ili IL-13 prelaze u M2a oblik koji karakterizira velika količina IL-1 receptornog antagonista (IL-1Ra) i arginaze, te ekspresija hitinaza i drugih medijatora koji doprinose akumulaciji i reorganizaciji izvanstaničnog matriksa. Prelazak u M2b oblik potiču imunokompleksi (IgG antitijelo-antigen kompleks), Toll-like receptori i IL-1 receptorski ligandi. M2b oblik karakterizira velika količina arginaze, IL-1β, IL-6 i TNFα, te mala količina IL-12. I konačno u M2c oblik prelaze u prisutnosti IL-10, a karakterizira ga ekspresija TGFβ i velike količine IL-10. U istraživanju provedenom na transgeničnom mišjem modelu kod kojega dolazi do nakupljanja Aβ vidjelo se da se mikroglija u neuroupali ne javlja samo u M1, već i u M2 obliku (Latta i sur. 2015). Naime za vrijeme neuroupale mikroglija je prisutna u velikom broju različitih fenotipskih stanja ovisno o mikrookolišu koji ju okružuje i fizičkoj međureakciji s drugim stanicama i njihovoj aktivnosti u mozgu (Heneka i sur. 2015). U AB mikroglija se može vezati za otopljene Aβ oligomere i Aβ fibrile svojim površinskim receptorima: SCARA1, CD36, CD14, α6β1 integrin, CD47 i Toll-like receptorima (TLR2, TLR4, TLR6 i TLR9). Nakon vezanja mikroglija se aktivira i počinje stvarati proupalne citokine i kemokine. Također započinje proces fagocitoze Aβ, topljivi Aβ podliježe razaranju izvanstaničnim proteazama dok je Aβ u obliku fibrila često rezistentan na enzimatsku razgradnju. U mikroglija- stanicama najvažnije su proteaze NEP i IDE. Povišene koncentracije citokina i smanjena ekspresija Aβ fagocitnog receptora smatraju se glavnim uzrokom nedovoljnog fagocitnog kapaciteta mikroglija-stanica. Tu hipotezu da mikroglija ne izvršavaju svoju funkciju u dovoljnoj mjeri dokazala su i istraživanja koja su pokazala da rijetke mutacije u izvanstaničnoj domeni TREM2 (engl. *triggering receptor expressed on*

myeloid cells 2) povećavaju rizik od AB. TREM2 u velikoj mjeri eksprimira mikroglija, a kontrolira fagocitozu staničnih ostataka (Heneka i sur. 2015). U AB nekoliko mehanizama među kojima su stvaranje Aβ i pozitivna povratna petlja između upale i procesiranja APP-a dovele su do pojavka kronične upale. Stalna izloženost Aβ, kemokini, citokini i drugi upalni medijatori odgovorni su za poremećenu funkciju mikroglije u senilnim plakovima (Heneka i sur. 2015).

1.2.4.2. Astroglija

Astrociti su vrsta glija stanica koje u međureakciji s neuronima upravljaju brojnim signalnim putovima i formiranjem sinapsi. Kao i mikroglija mogu se aktivirati na brojne stimulanse. Kod AB je primjećena povećana ekspresija glijalnog fibrilarnog kiselog proteina (engl. *glial fibrillary acidic protein*, GFAP) u tkivu mozga (post-mortem), što ukazuje na povećan broj reaktivnih astrocita. Od toga su GFAP pozitivni astrociti nađeni oko amiloidnih nakupina. Iako se smatralo da astrociti imaju neuroprotektivnu ulogu i dovode do razaranja Aβ, čini se da uz nju dovode i do amplifikacije amiloidnih nakupina u korteksu na način da potiču izvanstanične kalcijske valove (Zimmer i sur. 2014). Do aktivacije astrocita dolazi vjerojatno već u ranim fazama AB, prije nego uopće počne nakupljanje Aβ. U animalnim modelima AB rani odgovor je vidljiv iz astroglijalne atrofije. Ona vjerojatno ima utjecaj na sinaptičku povezanost neurona jer astrociti imaju središnju ulogu u održavanju sinaptičkog prijenosa, te to doprinosi kognitivnom gubitku koji se javlja. Astrociti također proizvode citokine, inerleukine, NO i druge potencijalno citotoksične molekule nakon što su izloženi Aβ. ApoE protein je važan za uklanjanje Aβ astrocitima. Lipidacija ApoE uzrokovana astrocitima povećava sposobnost mikroglija- stanica da razaraju Aβ. Također astrociti potiču povećanu ekspresiju izvanstaničnih proteaza koje razaraju Aβ kao što su: neprilizin, IDE, ECE2 (engl. *endothelin-converting enzyme-2*) i ACE (engl. *angiotensin converting enzyme*). Astrociti imaju ulogu i u uklanjanju otopljenog Aβ iz parenhima paravenoznom drenažom u tome veliku ulogu ima astrocitni vodeni kanal akvaporin 4 (Heneka i sur. 2015).

1.2.4.3. Sustav komplementa

U mozgu proteine komplementa najviše proizvode mikroglija-stanice, a u manjoj mjeri astrociti (Heneka i sur. 2015). Brojnim istraživanjima primjećeno je da je u mozgu oboljelih od AB povećana količina proteina komplementa C1q, C4 i C3 u amilodnim plakovima. Proteini komplementa imaju veliku ulogu u pokretanju neuroupale, naime C1q ima sposobnost vezanja Aβ na njihovim N krajevima i pokretanje neuroupale klasičnim putem aktivacije komplementa (Zimmer i sur. 2014). Na važnost komplementa u razvoju AB ukazuje i to što klusterin (topljivi inhibitor sustava komplementa) i CR1 (receptor za komplement koji je uključen u uklanjanje opsoniziranih imunokompleksa i u regulaciju C3 konvertazne aktivnosti) mogu utjecati na razvoj bolesti (Heneka i sur. 2015).

1.2.4.4. Medijatori neuroupale

Istraživanja su pokazala da je akumulacija Aβ glavni uzrok pokretanja neuroupalnog odgovora u AB. Izlaganje mikroglije Aβ_{42} dovodi do povećanog lučenja proupalnih citokina IL-1β, IL- 6 i TNFα, te MIP-1α i M-CSF-a. Na mišjem modelu AB primjećeno je i da mikroglija u nekim uvjetima stvara IL-12 i IL-23, koje ukoliko inhibiramo smanjujemo pojavnost patoloških promjena karakterističnih za AB. Rizik prelaska blažeg oblika kognitivnih poteškoća u fazu demencije u AB je uvelike povećan kod pacijenata s povećanom koncentracijom proupalnog citokina TNFα i smanjenom koncentracijom antiupalnog TGF-β. Za brojne citokine smatra se da dovode do poremećaja u funkciji prije nego li do strukturalnih promjena. Naime dovode do supresije dugoročne potencijacije (LTP) sinaptičkog prijenosa signala.

Citokini stimuliraju inducibilnu dušik oksid sintazu (iNOS) u mikroglija-stanicama i astrocitima da proizvodi velike količine NO-a. U oboljelih od AB povećana je ekspresija iNOS-a, kao i NADPH oksidaze (PHOX). NADPH oksidazu također aktiviraju upalni stimulansi poput Aβ, te dolazi do proizvodnje vodikova peroksida koji onda potiče aktivaciju mikroglije. Proizvodi i superokside koji reagiraju s dušikovim oksidom, te nastaje peroksinitrit. U oboljelih od AB primjećeno je da NO dovodi do posttranslacijskih modifikacija: nitracija, S-nitrozilacija i stvaranja ditirozina. Dokazano je da nitracija Aβ peptida na tirozinu 10 dovodi do njegove veće sklonosti za agregacijom i može započeti formiranje senilnog plaka, što pokazuje da ima centralnu ulogu u ranim fazama razvoja

bolesti. Također takav nitrirani Aβ suprimira hipokampalni LTP učinkovitije nego nenitrirani oblik, što ukazuje da dovodi i do funkcijonalnih i do strukturnih oštećenja u mozgu (Heneka i sur. 2015).

Kemokini su također važni u AB, jer reguliraju migraciju mikroglije. U AB primjećena je povećana ekspresija CCL2, CCR3 i CCR5 u reativnih mikroglija-stanica, te CCL4 u reaktivnih astrocita. Također mikroglijalna kultura stanica (stanice uzete autopsijom pacijenta koji boluje od AB) nakon eksperimentalnog izlaganja Aβ pokazala je povećanu ekspresiju CXCL8 (poznat i kao IL-8), CCL2 i CCL3.

Kaspaze su porodica unutarstaničnih proteaza koje igraju glavnu ulogu u apoptozi i upali. U AB je primjećena povećana aktivnost kaspaze 1, koja izrezuje IL-1β i IL-18 kako bi iz neaktivnog oblika prešli u aktivan. Katalitička aktivnost kaspaze 1 regulirana je inflamasomima. Aβ fibrili aktiviraju NLRP3 inflamasom tako što dovode do oštećenja lizosoma, a inflamasom onda dovodi do aktivacije kaspaze 1. Ukoliko nema NLRP3 ili kaspaze 1 mikroglija-stanica prelazi iz proupalnog M1 fenotipa u M2 fenotip. Daljnja stimulacija mikroglije s proupalnim medijatorima dovodi do aktivacije apoptotičke kaspaze 8 i kaspaze 3/7. Kaspaza 3 u aktivnom obliku regulira aktivaciju NF-κB putem PKCδ, što za posljedicu ima povećanu proizvodnju neurotoksičnih proupalnih medijatora poput IL-1β, TNFα i NO. Ukoliko se ove kaspaze inhibiraju sprječava se aktivacija mikroglije i neurotoksičnost.

Prostanoidi su derivati arahidonske kiseline sintetizirani uz pomoć cikooksigenaze 1 i 2, koje proizvodi mikroglija. U AB primjećena je povećana razina proupalnog prostaglandina 2 (PGE2) koji se veže na PTGER1-4 receptore. Te receptore eksprimira mikroglija, ali i mnoge druge stanice u mozgu posebice neuroni. Mikroglija PTGER2 receptor inhibira Aβ fagocitozu i povećava neurotoksičnost mikroglije (pokazano *in vitro*). Na mišjem modelu AB pokazano je da delecija PTGER2 i PTGER3 receptora smanjuje oksidativni stres, neuroupalu, količinu Aβ i ekspresiju BACE1. Ukoliko na mikrogliju djelujemo agonistom PTGER4 receptora dolazi do smanjenja upale, dok njegova delecija dovodi do povećanog nakupljanja Aβ i stvaranja proupalnih citokina poput IL-1β i CCL3. Uloga PGE2 na razvoj neurodegeneracije vjerojatno je još daleko veća jer utječe na brojne druge stanice u mozgu.

Neuroprotektin D1 (derivat dokozaheksanoične kiseline) je važna komponenta staničnih membrana i autokrini/parakrini medijator u ranoj fazi neuroupale, smanjuje nastanak Aβ tako što smanjuje amiloidni način procesiranja APP-a, smanjuje ekspresiju proupalnih citokina i

potiče preživljenje neurona. Njegova ekspresija je smanjena već u ranoj fazi AB (Heneka i sur. 2015).

2.6. Animalni modeli Alzheimerove bolesti

Do sada su razvijeni brojni animalni modeli koji djelomično prikazuju neuropatologiju koju uzrokuje AB. No niti jedan model ne može pokriti baš sve kognitivne, bihevioralne, biokemijske i histopatološke abnormalnosti koje su uočene kod ljudi (Yamada i Nabeshima 2000). Ipak njihova važnost je velika jer svaki od tih modela pomaže nam u detaljnoj analizi, jednog ili dva aspekta bolesti, koje nismo zbog etičkih razloga u mogućnosti proučavati na ljudima (LaFerla i Green 2012).

2.6.1. Transgenični animalni modeli Alzheimerove bolesti

Stvoreni su brojni transgenični animalni modeli koji stvaraju senilne plakove i imaju neuropatologiju povezanu s Aβ. To je postignuto ugradnjom gena za ljudski APP, te dolazi do stvaranja Aβ, ali i gena za APP s mutacijama koje su prisutne kod obiteljskog tipa AB.

Pokušaji stvaranja transgeničnih životinja u kojima bi došlo do stvaranja i nakupljanja NFT-a za sada se nisu pokazali uspješni. Transgenični miševi s povećanom ekspresijom 4 ponavljajuća oblika ljudskog tau proteina pokazala su hiperfosforiliranost koja je lokalizirana na somatsko-dendritičke dijelove neurona, ali nisu uočeni NFT. Transgenični miševi s povećanom ekspresijom serin/treonin kinaze Mos, pokazali su povećanu glijalnu reakciju i progresivnu neurodegeneraciju, ali bez neurofibrilarnih promjena. I GSK-3 β transgenični miševi također nisu stvarali NFT.

Stvoreni su i transgenični miševi s mutantnim PS1, te je u njima došlo do povećanog stvaranja $A\beta_{42(43)}$, isto je i s transgeničnim miševima s mutiranim PS2 genom (Yamada i Nabeshima 2000).

2.6.2. Netransgenični animalni modeli

Akutno injiciranje Aβ ili kontinuirana infuzija u mozak dovodi do disfunkcije mozga što se očituje u smanjenoj mogućnosti učenja i pamćenja. Prvi *in vivo* model za neurodegeneraciju nastalu nakupljanjem Aβ_{40} dobiven je injiciranjem Alz50-imunoreaktivnih proteina. Injiciranjem netopljivih amiloidnih jezgri (iz mozga AB bolesnika) u mozak štakora također dolazi do neurotoksičnosti. Pokazano je da neurotoksičnost fibrila Aβ ovisi o starosti i vrsti pokusne životinje. Primjerice mikroinjektiranje netopljivog Aβ u cerebralni korteks starog rhesus majmuna rezultira propadanjem neurona, tau fosforilacijom i mikroglijalnom proliferacijom, dok za mlade majmune Aβ nije neurotoksičan. Također neurotoksičnost je veća kod starih Rhesus majmuna nego kod starih Mormozet majmuna, a nije značajna kod starih štakora. Utjecaj Aβ ulomaka na učenje i pamćenje je prvo istražen kod miševa i ta istraživanja su pokazala važnost Val-Phe-Phe slijeda za pojavnost amnezije. Mnoga su istraživanja pokazala da različiti Aβ ulomci poput Aβ_{40}, Aβ_{42}i Aβ_{25-35} uzrokuju problem s pamćenjem i učenjem kod miševa i štakora.

Animalni modeli za AB s izraženim nastankom i nakupljanjem NFT-a mogu se dobiti kroničnom intracerebroventrikularnom infuzijom fosfataznog 1/2A inhibitora, okadaične kiseline. Ona uzrokuje nastanak NFT-a, APP ekspresiju i nakupljanje Aβ.

Animalni modeli Alzheimerove bolesti s kolinergičnom disfunkcijom mogu se dobiti na više načina: elektrokoagulacijom, eksitotoksinima, prerezivanjem fimbrije/forniksa, obradom s kolinotoksinima. Kroničnim izlaganjem životinje i.c.v. infuziji kvinolinične kiseline dolazi do sporog razvoja neurodegenerativnih bolesti pa i AB. Kod oboljelih od AB vrlo rano kod pojavnosti bolesti dolazi do razaranja bazalnih kolinergičnih neurona prednjeg mozga koji su zaduženi za kognitivnu funkciju. Zato ukoliko izazovemo leziju u središnjem septalnom nukleusu dobivamo promjene u ponašanju koje su najsličnije kognitivnim promjenama koje se javljaju u ranom stadiju AB. Ovi modeli ne pokazuju neuropatološke karakteristike kao što su senilni plakovi i NFT, ali su dobri za testiranje brojnih potencijalnih lijekova koji bi mogli dovesti do oporavka kolinergičnih neurona. Noviji pristup stvaranja ovakvog tipa animalnog modela jest imunološko ciljanje s nespecifičnim citotoksinima. Kolinergični neuroni u bazalnom dijelu prednjeg mozga imaju NGF receptor (p75NGFR) koji ima mali afinitet vezanja, ali se nalazi u velikom broju na ovoj vrsti neurona te su pogodni da budu cilj monoklonalnog antitijela 192IgG, koje na sebi nosi citotoksin saporin i izaziva smanjenu aktivnost kolin acetiltransferaze (ChAT). Do stvaranja selektivnih lezija u kolinergičnim

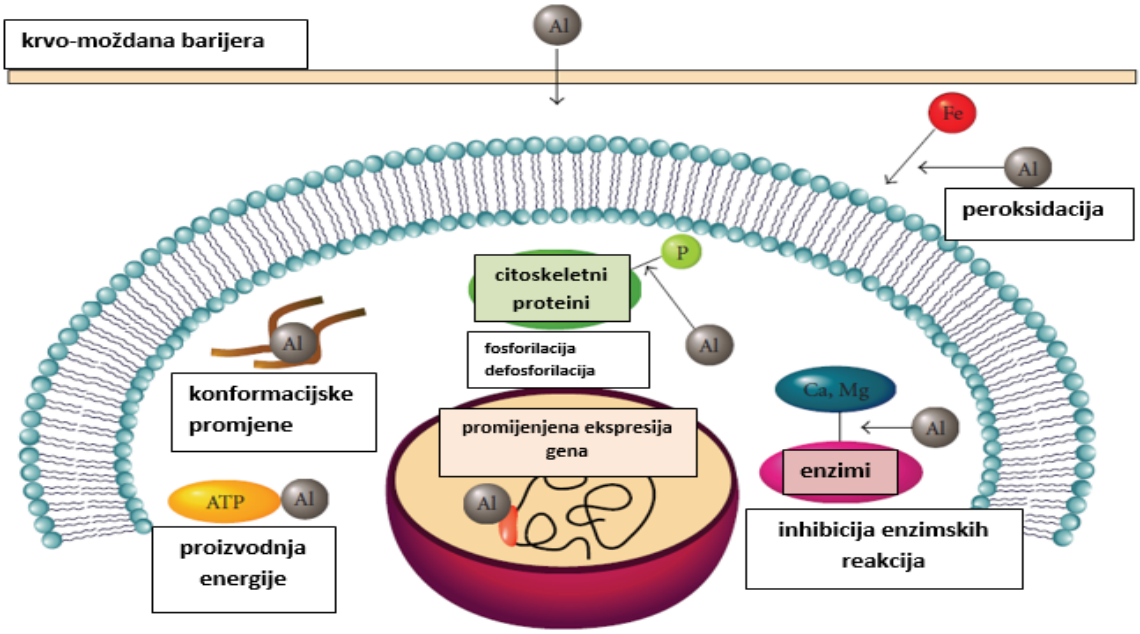
neuronima ovisnim o NGF-u može doći i konstantnim i.c.v. infuzijama ili direktnim intraseptalnim infuzijama anti-NGF antitijela u septum. To direktno injiciranje anti-NGF dovodi do promjena u pamćenju, smanjenoj ChAT aktivnosti i AchE promjenama u hipokampusu.

2.7. Aluminij klorid ($AlCl_3$) + D-galaktoza (D-gal) animalni model Alzheimerove bolesti

Budući da postoji više tipova Alzheimerove bolesti teško je dobiti animalni model koji ju najbolje opisuje. Kod obiteljskog tipa AB otkrivene su mutacije u više gena, te se kao model za ovaj tip AB često koriste transgenične životinje. No u sporadičnom tipu AB nisu pronađene mutacije gena te ga transgenični animalni modeli ne opisuju najbolje. Zato se mnogo radilo na otkrivanju najboljeg netransgeničnog animalnog modela. Takav animalni model nastao je unosom $AlCl_3$ i D-gal (Xiao i sur. 2011). Ovaj model korišten je i za ovo istraživanje. Da bi razumjeli način na koji $AlCl_3$ i D-gal uzrokuju pojavnost obilježja karakterističnih za AB, moramo prvo vidjeti kako Al i D-gal zasebno mogu djelovati na mozak.

Aluminij je jedan od najčešćih elemenata na Zemlji i ljudi ga koriste u mnogobrojne svrhe kao što je konzerviranje hrane, u izradi lonaca, u automobilima, u cjepivima kao adjuvans. Vrlo je reaktivan s ugljikom i kisikom. Aluminij koji uđe u naš organizam hranom i iz okoliša u velikoj mjeri izbacuju bubrezi, ipak aluminijeve soli zaostaju u tijelu i nakupljaju se u živčanom sustavu, te se Al povezuje s pojavnošću brojnih bolesti poput AB, Amiotrofne lateralne skleroze (ALS), Poremećaja iz spektra autizma (ASD) i Multiple skleroze (Chen i sur. 2016). Aluminij kao teški metal vrlo je jak neurotoksin, nije esencijalan element i nije potreban za enzimske reakcije, ipak ukoliko se nađe u organizmu utječe na više od 200 biološki važnih reakcija i ima štetan utjecaj na mozak. Al utječe na sintezu neurotransmitera, sinaptičku transmisiju (inhibiranjem naponom reguliranih Ca^{2+} kanala i neurotransmiterskih receptora), fosforilaciju i defosforilaciju proteina, razaranje proteina, gensku ekspresiju i upalni odgovor. Zbog svoga pozitivnog naboja Al^{+3}se veže s negativno nabijenim molekulama kao što su fosfati, karboksilati, deprotonirana hidroksilna grupa. Iz tog razloga se veže na fosfatne grupe DNA i RNA utječući na ekspresiju gena važnih za normalnu funkciju mozga. Veže se i za fosfatne grupe ADP-a i ATP-a utječući na metabolizam. Inhibira brojne proteinske kinaze i fosfataze, te enzime s Mg^{2+}kofaktorom, te procese koji uključuju brzu

izmjenu Ca^{2+}. Al^{+3} se veže za metal vezujuće aminokiseline poput histidina, arginina, tirozina ili za fosforilirane aminokiseline te ih međusobno povezuje (Slika 8.).



Slika 8. Utjecaj aluminija na središnji živčani sustav

(Preuzeto od: Kawahara i Kato-Negishi 2011)

Na taj način potiče agregaciju i akumulaciju jako fosforiliranih citoskeletnih proteina kao što su neurofilamenti i proteini vezani za mikrotubule (MAPs). Uočeno je da kronična izloženost Al povećava rizik od AB za otprilike 70% (Chen i sur. 2016). Naime Al^{+3} dovodi do konformacijskih promjena u $A\beta_{40}$ te potiče njegovu polimerizaciju i akumulaciju, a inhibira razaranje. Aβ vezan Al je toksičniji od normalnih Aβ jer mijenja homeostazu Ca^{2+} i respiraciju mitohondrija. Al uzrokuje konformacijske promjene i na nekim drugim proteinima važnim za razvoj AB, to su APP, tau i PHF-tau (engl. *paired helical filaments-tau*) (Kawahara i Kato-Negishi 2011). Al potiče povećano stvaranje ROS-a i može potaknuti oksidatvna oštećenja kroz više mehanizama. Vezanjem na negativno nabijene fosfolipide mozga, koji sadrže polinezasićene masne kiseline, olakšava napad ROS-ova poput O_2^-, H_2O_2 , $OH^{\cdot}$ i OH^- na njih. Također Al potiče lipidnu peroksidaciju uzrokovanu željezom koja kroz Fentonovu reakciju stvara ROS-ove i Fe^{3+} (Yuan i sur. 2012). Kakve će posljedice Al imati za organizam ovisi i o njegovu unosu. Unos probavnim sustavom uzrokuje prvotno povećanje aktivnosti ksantin oksidaze (XO) i glutation peroksidaze (GPX), a potom smanjenje aktivnosti što dovodi do nakupljanja toksičnih međumedijera poput vodikova peroksida i hidroksilnih radikala. Injektiranje Al u mozak štakora uzrokuje jači upalni odgovor, jer dolazi do jače

imunoreaktivnosti astrocita i fagocitnih mikroglija stanica. To je utvrđeno procjenom količine glija fibrilarnog kiselog proteina (GFAP) i ED1 (CD68 marker aktivnosti mikroglija- stanica). GFAP je pokazao da neuroni imaju puno veću osjetljivost na Al nego astrociti. Kronično izlaganje Al dovodi do smanjenja bazalne aktivnosti gvanilat ciklaze i premećaja u glutamat-dušikov oksid- ciklički gvanozin monofosfat (cGMP) putu. Smanjuje i količinu kalmodulina i dušik oksid sintaze u malom mozgu. Kod štakora Al smanjuje bazalnu aktivnost topljive gvanilatne ciklaze za 66 %, a bazalnog cGMP-a u vanstaničnom prostoru malog mozga za 50% (Xiao i sur. 2011).

D-gal u organizmu štakora i miševa izaziva metaboličke abnormalnosti, povećanu proizvodnju ROS-a, oštećenje neurona i smanjenje kapaciteta za pamćenje i učenje. S vremenom je injiciranje D-gal prihvaćeno kao model za starenje mozga (Hua i sur. 2007). Naime unošenje D-gal uzrokuje povećanje razine malondialdehida (MDA) i smanjenje antioksidativnih enzima poput superoksid dismutaze (SOD) u serumu. Značajno se povećava broj tzv. TUNEL- pozitivnih stanica (engl. *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling- positive cell*) u dentatnom girusu (DG), te u CA1 i CA3 regijama hipokampusa, dok se broj bromodeoksiuridin(BrdU)-vezanih proliferacijskih stanica i stanica za preživljenje u DG smanjuje. D-gal smanjuje životni vijek nekih životinjskih modela poput voćne mušice (*Drosophila melanogaster*) i kućne muhe (*Musca domestica*) što se povezuje s povećanjem oksidativnog stresa. Starenje kod miševa D-gal ubrzava stvaranjem AGE (engl. *advanced glycation endproducts*). Za ove promjene se smatra da doprinose starenju i potiču nastanak bolesti povezanih s ranim starenjem. Toksičnost D-gal uzrokovana je vjerojatno njegovim metabolitom D-gal etanolom koji stanica ne može razgraditi te se nakuplja u njoj. To rezultira povećanim osmotskim tlakom, bubrenjem stanice i metaboličkom disfunkcijom. Miševi obrađeni D-gal-om pokazali su značajno smanjenje u motornoj aktivnosti, limfocitnoj mitogenezi, stvaranju interleukina-2 (IL-2) i aktivnosti SOD enzima. Primjećena je povećana razina ROS-a i lipidna peroksidacija.

Kombinirano unošenje D-gal i Al rezultira u smanjenoj mogućnosti učenja i pamćenja te poremećenim funkcioniranjem kolinergičkih neurona. Do tih promjena dolazi brže i jače su izražene nego kada se koristi samo jedna od navedenih kemikalija. Za normalno pamćenje i učenje bitan je neurotransmiter Ach, ali i enzim ChAT koji ga sintetizira, te AchE koji ga razara. U AB navedeni enzimi imaju smanjenu aktivnost, te posljedično ima manje Ach, takva se opažanja dobiju i korištenjem ovog AB modela. Primjećeni problemi s učenjem i kolinergička disfunkcija ovog modela najvećim dijelom uzrokovani su djelovanjem D-gal. U

D-gal+Al modelu dolazi i do povećane ekspresije Aβ i to obje najčešće vrste Aβ_{40} i Aβ_{42}. U ovom modelu primjećena je i pojava senilnih plakova i NFT struktura, odnosno injiciranje obje kemikalije dovodi do povećanog nakupljanja NFT-a i plakova što rezutira gubitkom neurona (Xiao i sur. 2011).

1.3. Cilj istraživanja

Glavni cilj ovog istraživanja je:

a) istražiti oksidativni učinak $AlCl_3$i D-galaktoze na mozak određivanjem oksidacijskih parametara (katalaze, superoksid dismutaze, glutationa, malondialdehida, NO-a)
b) procijeniti neuroupalu kroz analizu koncentracije proupalnih citokina, aktivnosti arginaze i određivanjem indeksa mozga
c) utvrditi postojanje Alzheimerove bolesti kod životinja obrađenih s $AlCl_3$ i D-galaktozom (imunohistokemija mozga, određivanje AchE i BDNF-a)

2. MATERIJALI I METODE

2.1. MATERIJALI

2.1.1 Pokusne životinje

U istraživanju su korišteni Y59 štakori, mužjaci, stari 3 mjeseca uzgojeni na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. Istraživanje je provedeno na ukupno 20 Y59 štakora podijeljenih na 2 skupine s po 6 životinja obzirom na obradu (Tablica 2.). Hranjeni su standardnom hranom za laboratorijske životinje (Standard Diet GLP, 4RF21, Mucedola, SettimoMilanese MI, Italija), uz stalnu dostupnost vode. Uvjeti su bili standardni (dnevni ritam od 12 sati dana i 12 sati mraka, temperatura 24 °C uz kontroliranu vlažnost zraka).

Istraživanje je provedeno prema etičkim načelima važećima u Republici Hrvatskoj (Zakon o zaštiti laboratorijskih životinja, NN 19, 1999.) i prema Vodiču za držanje i korištenje laboratorijskih životinja (*Guide for the Care and Use ofLaboratory Animals*, DHHS (NIH) Publ # 86-23).

2.1.2. Kemikalije korištene u obradi štakora

- aluminijev klorid 6-hidrat ($AlCl_3$ x $6H_2O$),Mr = 241,45 g/mol (proizvođač: Gram-mol d.o.o.,Hrvatska)
- D (+) - galaktoza, Mr = 180,16 g/mol (proizvođač: Merck, Njemačka)
- Natrijev klorid 0, 9% otopina za infuziju (proizvođač B. Braun Adria d. o. o., Hrvatska)

2.1.3. Kemikalije korištene u analizi

Glutation reduktaza (enzim, iz pekarskog kvasca), 100-300 U/mg proteina (Sigma-Aldrich Corporation, SAD); Folin i Ciocalteu's fenol reagens (Sigma-Aldrich Corporation, SAD); citokrom C iz goveđeg srca 100 mg (Sigma-Aldrich Corporation, SAD); ksantin oksidaza, Buttermilk 50 U, 1. 05 U/mg proteina (Calbiochem, SAD); NADPH tetranatrijeva sol, Mr = 833, 35 mg/mol (ApplichemGmbH, Njemačka); DTNB (5, 5'-ditiobis-(2-nitrobenzoična

kiselina), Mr = 396, 36 g/mol (Fluka, Švicarska); Albumin iz goveđeg seruma, BSA (Sigma-Aldrich, SAD); SDS, natrij dodecil sulfat (Sigma-Aldrich, SAD); TBA, tiobarbituratna kiselina, Mr = 144. 15 g/mol (ApplichemGmbH, Njemačka); L-glutation reduktaza, Mr = 307. 33 g/mol (ApplichemGmbH, Njemačka); Griess reagent system (Promega, SAD); Rat BDNF ELISA kit (Thermo Fisher Scientific, SAD); Rat Inflammatory Cytokines Multi-Analyte ELISArray Kit (Qiagen, Njemačka); Arginase Activity Assay Kit (Sigma-Aldrich, SAD).

2.1.4. Instrumenti

- Centrifuga: Centrifuge 5702 (proizvođač: Eppendorf); Mikro 200R (proizvođač: Hettich,Njemačka)
- Analitička Vaga: ABS 220 – 4 (proizvođač: Kern&Sohn, Njemačka), AUW220D (proizvođač: Shimadzu, Japan)
- Vortex: VortexGenius 3 (proizvođač: IKA, SAD)
- Homogenizator: Sonopuls mini (proizvođač: Bandelin, Njemačka)
- Digestor: Mikrobiološki zaštitni cabinet, KTB-NS (proizvođač: Klimaoprema, Hrvatska)
- Spektrofotometar: UV-160 (Shimadzu); Libra S22 (Biochrom, UK)
- Mikrotitarski čitač: Microplate reader Model 550 (Bio-Rad); iEMSreader MF (Labsystems)
- Svjetlosni mikroskop: Olympus Cx21; Olympus BX51 (proizvođač: Olympus, Japan)
- Kamera za mikroskop: Artrax +; Olympus U- CMAD3 (proizvođač: Olympus, Japan)
- Program za obradu slike: Quickphoto camera 2.3
- Mufolna peć za spaljivanje: Program Controller LV 9/11/P320 (proizvođač: Nabertherm, Njemačka)
- Sušionik: EPSA 2000 (proizvođač: Bari, Hrvatska)

2.2. METODE

2.2.1. Promjena tjelesne mase pokusnih životinja

Mjerenje tjelesne mase (TM) vršeno je digitalnom vagom. Prije početka izvođenja pokusa kao i tijekom izvođenja pokusa životinje smo pojedinačno označili i izvagali na temelju čega smo ih svrstali u skupine sa sličnom tjelesnom težinom (± 10 g). Na temelju težine životinja za pojedinu skupinu smo odredili količinu pojedinačnih pripravaka koje smo davali tijekom pokusa. Jednom tjedno životinjama smo pratili promjenu težine.

2.2.2. Plan pokusa

Patofiziološke promjene izazvane su intraperitonealnim injiciranjem (*i.p.*) $AlCl_3$ u dozi od 10 mg/kg štakora i D-galaktoze u dozi 60 mg/kg štakora tijekom 28 dana (Tablica 2.). Nakon 24 sata po završetku obrade životinje su anestezirane i analgezirane intraperitonealnim injiciranjem kombinacije Narketana® (Vetoquinol S.A. BP 189 Lure Cedex, Francuska) i Xylapana® (VetoquinolBiowetSp., Gorzow, R. Poljska), te žrtvovane kako bi se izolirao mozak za daljnju analizu.

Tablica 2. Pokusne skupine i način obrade

Naziv vrste i soja životinja	**Oznaka skupine***	**Sastav pokusne otopine**	**Doziranje (dnevno)**	**Način primjene**	**Period obrade (dani)**
Y59 štakori, mužjaci	0. Kontrola	0,9% NaCl	0,5 mL	intaperitonealno, *i.p.*	28
Y59 štakori, mužjaci	1. AlCl3 + D-gal	10 mg/kg AlCl3 60 mg/kg D-galaktoza 0,5 mL 0,9% NaCl	0,5 mL	intraperitonealno, *i.p.*	28

*N=6 životinja po skupini

2.2.3. Određivanje parametara oksidativnog stresa

2.2.3.1. Izolacija i priprema tkiva

Izolirani mozak smo pohranili na -80 °C do pripreme za analizu i u 4% puferirani formalaldehid do obrade za uklapnje u parafin. Tjedan dana nakon pohrane, odvagali smo 75-100 mg tkiva (uzdužni prerez kroz sve regije mozga: prefrontalni korteks, korteks, mali mozak, leđna moždina) u eppendorf epruvetu, dodali fosfatni pufer (PBS) u omjeru 1:10 i uzorke homogenizirali ultrazvučnim homogenizatorom. Dobivene homogenate smo centrifugirali na 15000 okretaja kroz 15 min na 4 °C, nakon centrifugiranja smo odvojili supernatant, razrijedili ga 10 puta (100 µL supernatanta i 900 µL fosfatnog pufera) i sve uzorke pohranili na -80 °C do analize.

2.2.3.2. Određivanje proteina po Lowry-u

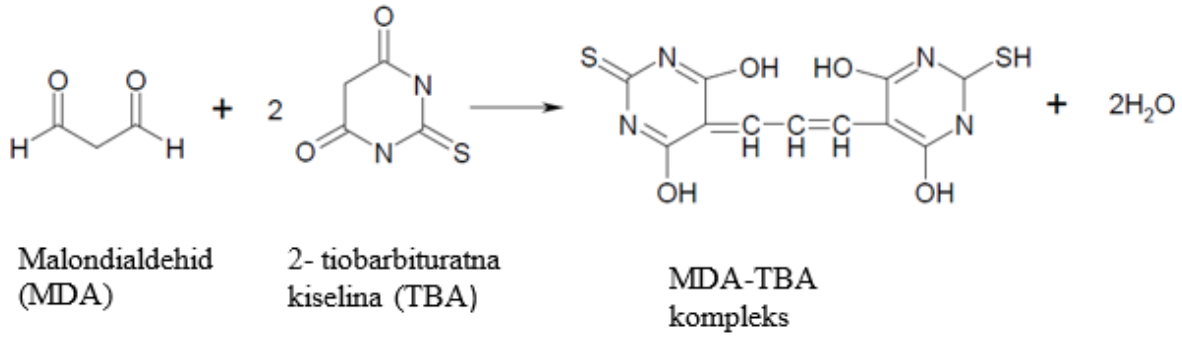
Kako bi odredili količinu proteina u tkivu mozga koristili smo metodu po Lowry-u. Metoda se temelji na reakciji divalentnih iona bakra s peptidnim vezama u lužnatoj sredini, te dolazi do njihove redukcije u monovalentne ione bakra. Dodatkom Folin i Ciocalteu's fenolnog reagensa monovalentni ioni bakra, ostaci tirozina, triptofana i cisteina iz proteina reagiraju s njim tvoreći u početku nestabilan kompleks koji se postepeno reducira pri čemu nastaje plavo obojenje. U označene staklene epruvete stavili smo po 100 µL 40 x razrijeđenog uzorka mozga, te dodali 2 mL otopine A. Potom smo sve inkubirali 10 min na sobnoj temperaturi u zamračenom prostoru. Nakon inkubacije u smjesu smo dodali 200 µL otopine B, sve promiješali na vortexu i inkubirali još 30 min na sobnoj temperaturi u mraku. Tada smo izmjerili apsorbanciju na valnoj duljini od 600 nm. Kako bi mogli izračunati količinu proteina u uzorku mozga koristili smo kao standard albumin goveđeg seruma (engl. BSA, *Bovine serum albumin*) u koncentracijama od 2 mg/mL prema manjim koncentracijama (2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,0312; 0,0156; 0 mg/mL). Iz dobivenih apsorbancija standarda i poznatih koncentracija BSA dobili smo standardnu krivulju ovisnosti apsorbancije o koncentraciji BSA, te smo potom odredili nagib pravca. Iz nagiba pravca izračunali smo koncentraciju proteina u uzorcima mozga prema formuli: $c = (A_{uzorka} - b_{standardne\ krivulje} / nagib\ pravca\ standardne\ krivulje) \times razrijeđenje$**.** Koncentraciju proteina izrazili smo u mg/mL. Otopine potrebne za određivanje proteina po Lowry-u prikazane su u Tablici 3.

Tablica 3. Otopine za određivanje proteina po Lowry-u

Otopina A	Otopine pomiješati u omjeru 48:1:1 (A:B:C) **A: 2% (w/v) Na_2CO_3 u 0,1 M NaOH** 9,6 g Na_2CO_3+ 480 mL 0,1 M NaOH **B: 1% (w/v) natrij-kalij tartarat u dH_2O** 0,1 g natrij-kalij tartarat + 10 mL dH_2O **C: 0,5% (w/v) CuSO_4x 5 H_2O u dH_2O** 0,05 g CuSO_4 x 5 H_2O + 10 mL dH_2O
Otopina B	Pomiješati Folin i Ciocalteu's fenol reagens i dH$_2$O u omjeru 2:1

2.2.3.3. Određivanje koncentracije malondialdehida (MDA)

Količina lipidne peroksidacije u supernatantu mozga određivana je modificiranom metodom koju su opisali Jayakumar i sur. (2007). U metodi se mjeri koncentracija malondialdehida (MDA), jednog od glavnih produkata lipidne peroksidacije. Temelji se na reakciji MDA s tiobarbituratnom kiselinom (Slika 9.) pri čemu se stvara kromogen koji je moguće mjeriti spektrofotometrijski.



Slika 9. Strukturni prikaz reakcije MDA s 2-tiobarbituratnom kiselinom u kojoj nastaje derivat MDA-(TBA)2 (Preuzeto i prilagođeno od: http://rsc.li/2CMyGRm)

U eppendorf-epruvetu smo dodali 100 µL 8,1%-tni SDS, 750 µL 20%-tne octene kiseline (pH=3,5), 750 µL 0,8%-tne TBA (pripremljeni prema: Tablica 4.) i 100 µL nerazrijeđenog supernatanta. Dobro zatvorene epruvete umotali smo u aluminijsku foliju i stavili u vodenu kupelj na 95°C na 60 min. Potom smo uzorke naglo ohladili na ledu 10 min. Hlađenjem su nastale folikule koje su se slegle na dno. Uzorke smo centrifugirali na 15000/10 min/+4 °C.

Dobiveni supernatant stavili smo u kivetu i izmjerili apsorbanciju pri 532 nm. Ukupnu koncentraciju MDA dobili smo računanjem prema formuli: c= A_{uzorka} x $V_{reakcijske\ smjese}$(mL)/ ε x V_{uzorka} (mL) x $c_{proteina}$ (mg/mL). Ukupna koncentracija MDA izražena je kao nmol MDA po mg proteina.

Tablica 4. Otopine za određivanje koncentracije MDA

8,1% SDS	0,81g SDS-a + 10 mL dH_2O
20% octena kiselina	U 20 mL 99,5% octene kiseline i 2,31 mL HCl-a (37%) dodamo dH_2O do 50 mL, podesimo pH na 3.5, te nadopunimo s dH_2O do 100 mL
0,8% TBA	0,8 g TBA, 40 mL dH_2O i 500 µL 5M NaOH lagano zagrijavamo dotle dok se ne otopi, te potom nadopunimo s dH_2O do 100 mL
Otopina A	100 µL 8,1% SDS-a +750 µL 20% octene kiseline (pH = 3,5) + 750 µL 0,81% TBA

2.2.3.4. Određivanje koncentracije proteinskih karbonila

Koncentraciju proteinskih karbonila određivali smo metodom koju je razvio Levine (2002), a temelji se na reakciji karbonilne skupine proteinskog lanca s 2,4- dinitrofenilhidrazinom (DNPH) otopljenim u HCl-u. Reakcijom nastaje 2,4- dinitrofenilhidrazon. Nakon što smo pripremili potrebne otopine (Tablica 5.) u označene staklene epruvete stavili smo 200 µL uzorka (homogenat mozga) i 300 µL 10 mM DNPH, smjesu smo vorteksirali i inkubirali 1 h na sobnoj temperaturi u mraku. Potom smo u smjesu stavili 500 µL 10% TCA. Sve smo vorteksirali, a tada stavili na 5 min na -20 °C. Nakon toga centrifugirali smo 10 min na 12 000 g i 4 °C. U reakcijskoj smjesi došlo je do precipitacije proteina koji su nam potrebni za analizu, te smo nakon centrifugiranja bacili supernatant, a talog smo 3x ispirali s etanolom i etil acetatom (1:1) kako bi isprali nevezani DNPH. Potom smo dodali 1000 µL etanol: etil acetat (1:1), te vorteksirali i centrifugirali 10 min na 12 000 g i 4 °C. Ponovno smo bacili supernatant, a na talog smo dodali 1000 µL 6 M gvanidin HCl-a i uzorke stavili u kupelj na 10 min na 35-37 °C. Kad se talog otopio izmjerili smo apsorbanciju na 370 nm. Koncentraciju

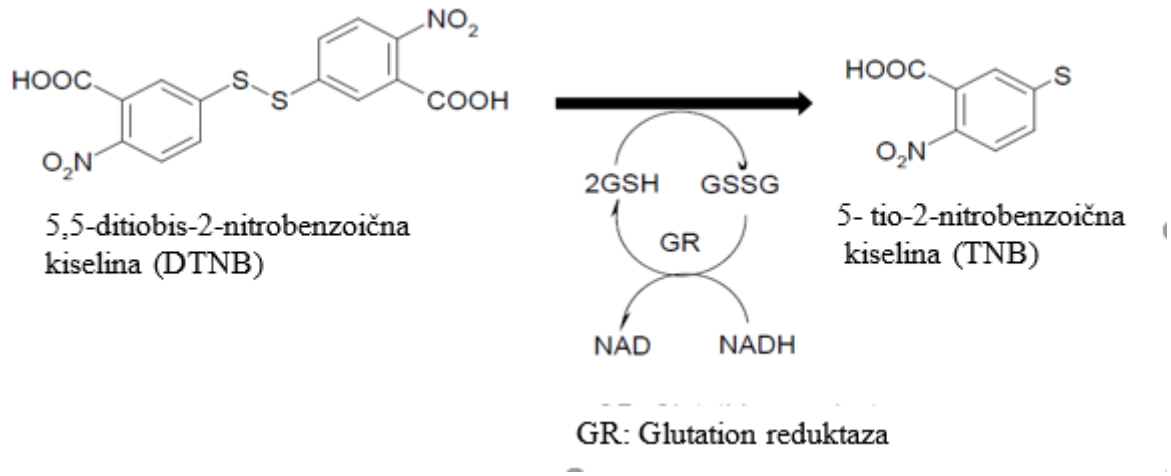
proteinskih karbonilnih skupina izračunali smo prema formuli: *Koncentracija proteinskih karbonilnih skupina*= A_{uzorka} / ε x $c_{proteina}$ = *nmol* mg^{-1} *proteina, gdje je* ε= *0,022* $\mu M^{-1} cm^{-1}$, *a c= koncentracija proteina mg* ml^{-1}.

Tablica 5. Priprema otopina potrebnih za određivanje koncentracije proteinskih karbonila

2 M HCl	42,95 mL 36% HCl + 207,05 mL dH_2O
10 mM DNPH u 2 M HCl	198 mg DNPH + 100 mL 2 M HCl
10% TCA (trikloroctena kiselina)	20 g TCA + 100 mL dH_2O
etanol: etil acetat = 1:1	50 mL EtOH + 50 mL etil acetata
6 M gvanidin HCl u 2 M HCl	57,18 g gvanidin HCl + 100 mL 2 M HCl

2.2.3.5. Određivanje koncentracije ukupnog glutationa

Za određivanje ukupne koncentracije glutationa korištena je modificirana metoda koju je opisao Tietze (1969). Naime tiolni reagens 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoične kiseline (DTNB, Ellmanov reagens) reagira sa sulfhidrilnom grupom GSH i nastaje žuto obojeni TNB (kromofor 5-tionitrobenzoična kiselina) koji apsorbira pri valnoj duljini 405-414 nm (Slika 10.). Uz TNB nastaje i GS-TNB koji se reducira s GSH reduktazom i NADPH, te pri tome otpušta drugu molekulu TNB-a i reciklira GSH. Ta brzina nastanka TNB-a proporcionalna je reciklirajućoj reakciji koja je proporcionalna koncentraciji glutationa u uzorku. Ovom metodom sav oksidirani GSH prisutan u reakcijskoj smjesi ili nastao iz miješanog disulfida GSH s GS-TNB-om brzo se reducira do GSH. Dobiveni konačni rezultat odgovara ukupnoj koncentraciji reduciranog i oksidiranog GSH u uzorku.



Slika 10. Prikaz modificirane metode po Tietzeu iz koje se izračunava aktivnost glutationa

(Preuzeto i prilagođeno od:http://rsc.li/2CMyGRm)

.

Za određivanje ukupne koncentracije GSH u uzorku koristili smo mikrotitarsku pločicu. U svaku jažicu stavili smo po 20 µL nerazrijeđenog uzorka, 40 µL 0,035 M HCl-a i 40 µL 10 mM DTNB-a (Tablica 6.). Reakcijsku smjesu smo inkubirali 10 min na sobnoj temperaturi, te potom izmjerili apsorbanciju na valnoj duljini od 415 nm. Zatim smo dodali 100 µl reakcijske smjese B, te mjerili apsorbanciju tijekom 5 min. Za slijepu probu smo koristili PBS, a za standard koncentraciju reduciranog GSH (0-100 µM). Za standard smo nacrtali pravce kao promjenu apsorbancije u vremenu. Iz vrijednosti nagiba pravaca nacrtali smo pravac ovisnosti nagiba pravca o koncentraciji GSH. Uz pomoć tog pravca izračunali smo koncentraciju ukupnog GSH u uzorku prema formuli*: c= (nagib pravca uzorka – nagib pravca slijepe probe/ nagib pravca standarda) x razrijeđenje*. Ukupnu koncentraciju GSH prikazali smo kao µg GSH po mg proteina.

Tablica 6. Otopine za određivanje koncentracije GSH

0,035 M HCl	7 mL 0,1 M HCl + 193 mL dH_2O
0,5 M pufer PBS	**17 mL 1 M Na_2HPO_4 x 2H_2O** (3 g Na_2HPO_4 x 2H_2O do 17 mL dH_2O) + **183 mL 1 M Na_2HPO_4 x 12H_2O** (65,5 g Na_2HPO_4 x 12H_2O do 183 mL dH_2O)

0,5 EDTA	37,2 g EDTA u 200 mL dH_2O
0,5 M pufer PBS s 0,5 M EDTA	200 mL 0,5 M PBS + 200 mL 0,5 M EDTA
Reakcijska smjesa A (10 mM DTNB)	20 mg DTNB + 0,5 M pufer PBS s 0,5 M EDTA do 5 mL
0,8 mM NADPH	6,67 mg NADPH + 0,5 M pufer PBS s 0,5 M EDTA do 10 mL
Reakcijska smjesa B	9980 µL 0,8 mM NADPH +20 µL glutation reduktaze

2.2.3.6. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

Za određivanje SOD-a u uzorcima koristili smo metodu po Flohe i Ottingu (1971). Ova metoda temelji se na inhibiciji redukcije citokroma c u sustavu ksantin/ksantin oksidaza. Koristili smo dvije slijepe probe, prva slijepa proba sastojala se od 1,45 mL otopine A (Tablica 7.). Odredili smo joj apsorbanciju mjerenjem u spektrofotometru na 550 nm tijekom 3 min. Zatim smo složili drugu slijepu probu. Ona se sastojala od 1,45 mL otopine A, 25 µL dH_2O i 40-50 µL ksantin oksidaze (0,8 U/mL) kako bi dobili aktivnost ksantin oksidaze od približno 0,025 U/min. Odmah nakon dodavanja enzima smjesu smo brzo izmiješali i mjerili joj promjenu apsorbancije tijekom 3 min na 550 nm, tj. aktivnost enzima ksantin oksidaze. Kad smo postigli optimalnu aktivnost SOD-a, analizirali smo uzorke. Svaka reakcijska smjesa se sastojala od 25 µL uzorka i odgovarajućeg dobivenog volumena ksantin oksidaze. Reakcijsku smjesu smo brzo promiješali i potom mjerili apsorbanciju. Enzimsku aktivnost odredili smo kao postotak inhibicije aktivnosti ksantin oksidaze.

$$\%inhibicije = 100 - (\Delta A_{uzorka} / \Delta A_{slijepa\ proba}) \times 100$$

Enzimska aktivnost SOD-a se računa po formuli:

$$Aktivnost\ SOD = 10^{\wedge((\%\ inhibicije + 12{,}757)/\ 30{,}932)}$$, a izražava se kao U/mg proteina.

Tablica 7. Otopine za određivanje aktivnosti SOD

50 mM PBS	17 mL (1,56 g NaH_2PO_4 x 2H_2O u 50 mL dH_2O) + 183 mL (5,678 g Na_2HPO_4 u 200

	mL dH_2O) → namjestiti pH= 7,8 te nadopuniti s dH_2O do 800 mL
50 mM PBS s 0,1 mM EDTA	3,72 mg EDTA u 100 mL 50 mM PBS-a
Citokrom C 0,05 mM	29 mg citokroma C + 190 mL 50 mM PBS-a s 0,1 mM EDTA
Ksantin 1 mM	3 mg ksantina + 19,74 mL 1 mMNaOH→ lagano zagrijavati, teško se otapa
Reakcijska otopina A	190 mL 0,05 mMcitokroma C + 19 mL 1 mM ksantina
Reakcijska otopina B (XOD, aktivnost 0,8 U/mL)	20 μL ksantinoksidaze + 480 μL dH_2O

2.2.3.7. Mjerenje enzimske aktivnosti katalaze (CAT)

Za određivanje aktivnosti katalaze korištena je spektrofotometrijska metoda po Aebiju (1984). Ovom metodom aktivnost katalaze određuje se kao količina potrošenog H_2O_2. U kiveti smo pripremili reakcijsku smjesu ukupnog volumena 1 mL: 980 μL 10 mM H_2O_2 i 20 μL nerazrijeđenog uzorka. Reakcijsku smjesu smo brzo promiješali i na spektrofotometru pratili promjenu apsorbancije pri 240 nm kroz jednu minutu. Aktivnost katalaze prati se kao smanjivanje količine H_2O_2, tj. kao pad apsorbancije u zadanom vremenu, a izražena je preko ekscitacijskog koeficjenta H_2O_2 (ε = 39,4 m$M^{-1}cm^{-1}$) prema formuli: c= (A_{uzorka}/ ($\varepsilon_{H_2O_2}$x l)) x razrijeđenje, gdje je l put koji zraka svjetla prođe kroz kivetu i iznosi 1 cm. Dobiveni rezultat izražavamo kao U/mg proteina što odgovara μmolu razgrađenog H_2O_2 po minuti po miligramu proteina.

2.2.4. Metode utvrđivanja prisutnosti značajki Alzheimerove bolesti

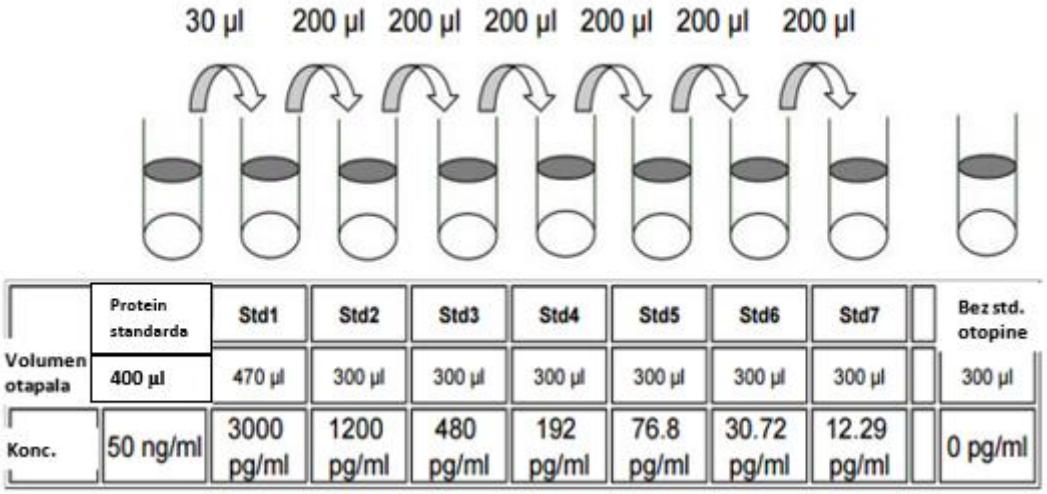
2.2.4.1. Određivanje koncentracije moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF, engl. *Brain-derived neurotrophic factor*)

Za određivanje BDNF-a koristili smo komercijalni štakorski BDNF ELISA kit proizvođača Thermo Fisher Scientific. Ovaj kit radi na metodi direktne sandwich ELISE, naime jažice mikrotitarske pločice obložene su s protutijelom specifičnim za štakorski BDNF, te ukoliko u našem uzorku ima štakorskog BDNF-a on se veže za ta protutijela. Tada se stavljaju biotinirana anti-štakorska BDNF protutijela, nakon ispiranja streptavidin konjugiran s HRP-om (engl. *Horseradish peroxidase*) i na kraju supstrat TMB (Tablica 8.). Reakcija između HRP enzima i TMB supstrata daje plavo obojenje, a dodatkom stop otopine u reakcijsku smjesu boja se promijeni u žutu i tada se mjeri apsorbancija spektrofotometrom na 450 nm.

Tablica 8. Priprema otopina potrebnih za izvođenje štakorskog BDNF ELISA testa

20x koncentriran pufer za ispiranje	U 20 mL 20x koncentriranog pufera za ispiranje dodamo dH_2O do 400 mL, te dobijemo 1x koncentriran pufer
Protein standarda (štakorski BDNF)	Radimo serijska razrijeđenja s otapalom C, kako je prikazano na Slici 11.
Antitijelo za detekciju BDNF-a(anti-štakorski BDNF)	Kratko centrifugiramo i potom dodamo 100 µL 1x koncentriranog otapala B
200 x koncentriran HRP-streptavidin	Razrijediti 200x s 1x otapalom B
TMB supstratni reagent (3, 3, 5, 5'-tetrametilbenzidin u puferskoj otopini)	
Stop otopina (0.2 M sumporna kiselin)	
Otapalo C	Otapalo C koristimo za razrijeđenje uzoraka, preporuča se razrijediti serum/plazmu 10x
5 x koncentrirano otapalo B	5x razrijediti s dH_2O → dobijemo 1x koncentrirano otapalo B

U proteinski standard stavili smo 400 µL otapala C, te dobili koncentraciju proteina od 50 ng/mL. Potom smo iz dobivenog BDNF standarda uzeli 30 µL i stavili u eppendorf epruvetu s 470 µL otapala C, te dobili koncentraciju proteina od 3000 pg/mL. U preostale epruvete stavili smo po 300 µL otapala C, te 200 µL prethodno razrijeđenog standarda, kao što je prikazano na Slici 11.



	Protein standarda	Std1	Std2	Std3	Std4	Std5	Std6	Std7		Bez std. otopine
Volumen otapala	400 µl	470 µl	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl		300 µl
Konc.	50 ng/ml	3000 pg/ml	1200 pg/ml	480 pg/ml	192 pg/ml	76.8 pg/ml	30.72 pg/ml	12.29 pg/ml		0 pg/ml

Slika 11. Prikaz priprave razrijeđenja standarda (Preuzeto i prilagođeno iz protokola Rat BDNF ELISA Kit Thermo Fisher Scientific)

Postupak izvođenja ELISA testa za određivanje količine BDNF-a:

1. Označili smo jažice za uzorke, kontrolu i standard (sve je rađeno u duplikatu). Nakon toga smo ispipetirali po 100 µL standardne otopine (50 ng/mL, 3000, 1200, 480, 192, 76.8, 30.72, 12.29, 0 pg/mL) i 100 µL uzorka mozga, te nakon toga inkubirali 2,5 h na mješalici na sobnoj temperaturi.

2. Nakon inkubacije uklonili smo sadržaj pločice i 4 puta ispirali s 1x koncentriranom otopinom za ispiranje.

3. Zatim smo stavili u svaku jažicu po 100 µL 1x koncentriranih biotiniziranih antitijela i inkubirali 1 h na mješalici, na sobnoj temperaturi.

4. Potom smo ponovno 4x ispirali pločicu s otopinom za ispiranje, a onda u svaku jažicu stavili 100 µL otopine sa streptavidinom. Sve smo stavili inkubirati na 45 min na mješalici i sobnoj temperaturi.

5. Kao i prethodna 2x isprali smo jažice s otopinom za ispiranje, a onda dodali 100 µL TMB reagenta i inkubirali 30 min na mješalici i sobnoj temperaturi.

6. Na kraju smo dodali 50 µL stop otopine i mikrotitarskim čistaćem postavljenim na 450 nm, odredili optičku gustoću svake jažice.

Koristeći poznate vrijednosti koncentracija standarda (x-os) i dobivene apsorbancije standarda (y-os) nacrtali smo standardnu krivulju. Koncentraciju BDNF-a u uzorcima odredili smo očitavajući je sa x-osi, a na temelju dobivenih apsorbancija uzoraka (y-os).

2.2.4.2. Određivanje aktivnosti acetilkolinesteraze (AchE)

Kod određivanja aktivnosti acetilkolinesteraze koristili smo kolorimetrijsku metodu koju su osmislili Ellman i suradnici (1961). Metoda se temelji na mjerenju nastanka tiokolina kao nusprodukta hidrolize acetiltiokolina. Nastali tiokolin reagira s Ellmanovim reagensom (5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzojevim) anionom) (Tablica 9.), te nastaje žuto obojeni anion 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline. Reakcija se odvija pri neutralnom ili alkalnom pH. U eppendorf epruvetu stavili smo 1g tkiva mozga i homogenizacijski pufer u omjeru 1:5 w/v, te homogenizirali ultrazvučnim homogenizatorom. Dobivene homogenate centrifugirali smo 30 min na 9000 okretaja pri 4 °C, a potom izdvojili supernatant. Nakon toga smo u kivetu stavili 1,4 mL fosfatnog pufera, 25 µL DTNB-a, 40 µL dobivenog supernatanta i 35 µL acetiltiokolin jodida, te mjerili apsorbanciju na 412 nm tijekom 30 sekundi. Iz izmjerene apsobancije, a uz pomoć formule navedene u gore citiranom radu izračunali smo aktivnost AchE koja je izražena kao R ($molL^{-1}$ / min / g tkiva).

Tablica 9. Otopine za određivanje aktivnosti acetilkolinesteraze

Otopina A	3,45 g NaH_2PO_4 x H_2O + dH_2O do 125 mL
Otopina B	7,1 g Na_2HPO_4(bezvodni) + dH_2O do 250 mL
0,1 M fosfatni pufer pH= 7.2 (homogenizacijski pufer)	84 mL otopine A + 216 mL otopine B + 300 mL dH_2O → provjeriti pH, po potrebi ga namjestiti pomoću NaOH + HCl
1,6 mM DTNB (5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzojeva kiselina)	0,0317 g DTNB + 50 mL fosfatnog pufera

156 mM acetiltiokolin jodid	0,4511 g acetiltiokolinjodida +10 mL dH_2O → otopina je fotosenzitivna, tijekom mjerenja potrebno ju je zaštititi od svjetla

2.2.4.3. Imunohistokemija

Termin imunohistokemije se odnosi na proces lokalizacije specifičnih antigena u tkivu, pomoću ciljno usmjerenih protutijela, koristeći osnovni princip u imunologiji da se određeno protutijelo veže i prepoznaje samo ciljni antigen. Nakon fiksacije u 4% puferiranom formalaldehidu i uklapanja u parafin imunohistokemija (debljina reza 7 μm) je napravljena u Labortaoriju za razvojnu neuropatologiju, Hrvatski institut za istraživanje mozga. Radi postizanja boljeg signala korištene su dvije metode: peroksidaza antiperoksidaza (PAP) i avidin-biotin (ABC) prema uputama proizvođača. Primarno protutijelo: Purifiedanti-β-Amyloid, 17-24 Antibody (4G8) , **1:2000**, (proizvođač: BioLegend, San Diego, CA). Sekundarno protutijelo: HRP (**1:200**), VECTASTAIN® ABC-HRP Kit (Peroxidase, Mouse IgG), (proizvođač:VECTOR LABORATORIES, SAD). Tercijalno protutijelo: VECTASTAIN® ABC Kit,**1: 200**, (proizvođač:VECTOR LABORATORIES, SAD). BSA (Sigma-Aldrich, Njemačka). DAB (3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid) with Metal EnhancerTablet Set (SigmaAldrich, Njemačka). Preparate smo gledali pod svjetlosnim mikroskopom (Olympus Cx21 i Olympus Cx51).

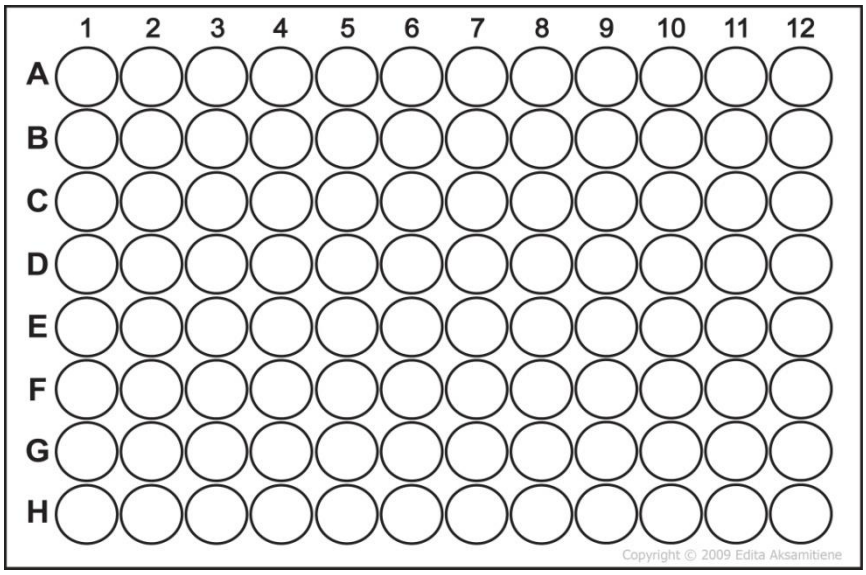
2.2.5. Metode provjere neuroupale

2.2.5.1. Određivanje razine proupalnih citokina

Jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je i vidjeti koliko jaku upalu u mozgu mogu uzrokovati teški metali u ovom slučaju aluminijev klorid, te šećer D-galaktoza. Iz tog razloga koristili smo Multy-Analyte ELISArray Qiagen kit za određivanje štakorskih proupalnih citokina kako bi odredili razinu proupalnih citokina i kemokina u mozgu kod naših eksperimentalnih životinja. Ovim ELISA kitom analizirali smo razinu 12 citokina i kemokina (IL1α, IL1β, IL2, IL4, IL6, IL10, IL12, IL13, INFγ, TNFα, GM-CSF, RANTES). Tkivo mozga je homogenizirano u PBS-u (1:5), potom centrifugirano na 15000 rpm/10 min/+4 °C. Supernatant je pohranjen na -80 °C do analize. ELISA kit je korišten prema uputama proizvođača. Koncentraciju smo izrazili u pg/mL.

2.2.5.2. Određivanje aktivnosti arginaze

Kako bi provjerili razinu arginaze I u pokusnim životinjama koristili smo Arginase activity assay kit (proizvođač: Sigma- Aldrich, Njemačka). Prema uputama proizvođača u A1 i A2 jažicu stavili smo50 µL 1mM standardne radne otopine uree, u B1 i B2 jažicu 50 µL vode, a u preostale jažice po 40 µL seruma u duplikatu. Stupci 2,4,6,8,10 i 12 su slijepe probe. Potom smo u sve jažice izuzev onih za slijepu probu dodali 10 µL 5x koncentriranog supstratnog pufera, pločicu smo prekrili i uzorke inkubirali 2 h na 37 °C (Slika 12.).



Slika 12. Konstrukcija mikrotitarske pločice kod određivanja aktivnosti arginaze

Nakon inkubacije smo dodali 200 µL reagensa uree u svaku jažicu kako bi zaustavili reakciju, a zatim 10 µL 5x supstratnog pufera u jažice za slijepu probu (stupci 2, 4, 6, 8,10 i 12). Sve smo inkubirali 1 h na sobnoj temperaturi, potom očitali apsorbancijuna 430 nm. Aktivnost arginaze smo izračunali prema formuli:

Aktivnost arginaze= $(A(uzorka) - A(prazne\ jažice))/(A\ (standarda) - A\ (vode))\ x\ ((1\ mM\ x\ 50\ x\ 10^3)\ /\ (V\ x\ T))$, gdje je T vrijeme reakcije u minutama, V volumen uzorka dodan u jažice, 1 mM koncentracija standarda ureje, 50 reakcijski volumen, a 10^3 konverzijski čimbenik mM u µM.

Jedna jedinica arginaze je količina enzima dovoljna za pretvorbu 1 µmola L- arginina u ornitin i ureu u minuti, pri 37 °C i pH 9,5. Otopine potrebne za mjerenje arginazne aktivnosti prikazane su na Tablici 10.

Tablica 10. Otopine potrebne za određivanje aktivnosti arginaze

Pufer arginina, pH 9,5	
Reagens A	
Standard uree, 50 mg/dL	24 µL 50 mg/dL standarda uree + 176 µL H_2O → dobili 1 mM standardnu radnu otopinu
Mn otopina	
Reagens B	
5x koncentrirani pufer za supstrat	8 µL arginin pufera + 2 µL Mn otopine (za 1 jažicu)
Reagens uree	100 µL reagensa A + 10 µL reagensa B (za 1 jažicu)

2.2.5.3. Određivanje dušikovog oksida indirektnom metodom prema Griess-u

Za određivanje dušikovog oksida koristili smo Promegin Griess reagens sistem, koji se zasniva na indirektnoj metodi prema Griess-u kojom zapravo određujemo količinu NO_2^-. Ova metoda se temelji na međureakciji spojeva sulfanilamida i N-1-naftiletilendiamin dihidroklorina (NED) u kiselom okolišu. U ovoj reakciji nitrit reagira sa sulfonilnom kiselinom i stvara diazo kation koji se spaja u aromatske amine ružićastog obojenja koji apsorbiraju u vidljivom dijelu spektra pri 540 nm. Sulfanilamid i NED natječu se za nitrit u Griess-ovoj reakciji, te se veća senzitivnost postiže kada se te dvije komponente dodaju u reakciju razdvojeno. Razina detekcije je bila 2,5 µM (125 pmol). Da bi dobili što precizniju kvantifikaciju iona nitrita prvo smo pripremili dvostruka serijska razrijeđenja standardne 0,1 M nitritne otopine, iz koje smo dobili referentnu krivulju. Nakon što smo ispipetirali 50 µL standarda u triplikatu u preostale jažice smo u duplikatu stavili po 50 µL eksperimentalnih uzoraka (tkivo mozga), 50 µL PBS-a (slijepa proba za korekciju) i po 50 µL sulfanilamidne otopine. Sve smo inkubirali 10 min u mraku i pri sobnoj temperaturi. Potom smo u sve jažice dodali po 50 µL NED otopine i unutar 30 min mjerili apsorbanciju pomoću mikrotitarskog čitača koristeći filter od 540 nm. Tada smo za nitritnu standardnu otopinu nacrtali krivulju, na x-osi bila je koncentracija nitritnog standarda, a na y-osi dobivena apsorbancija. Iz dobivene krivulje, a na temelju izmjerene apsorbancije uzorka očitali smo koncentraciju nitrita u pojedinom uzorku.

2.2.5.4. Određivanje relativnog indeksa mozga

Nakon žrtvovanja štakora izvadili smo mozak i izvagali ga na digitalnoj vagi (Analytical balance ABS 220 – 4, Kern&Sohn, Njemačka). Dobivene vrijednosti mase mozga, zajedno s dobivenim vrijednostima mase životinja prije žrtvovanja iskoristili smo u izračunavanju relativnog indeksa mozga prema formulama:

Relativni indeks mozga (g/ 100 g) = (masa mozga x 100)/ masa tijela životinje prije žrtvovanja

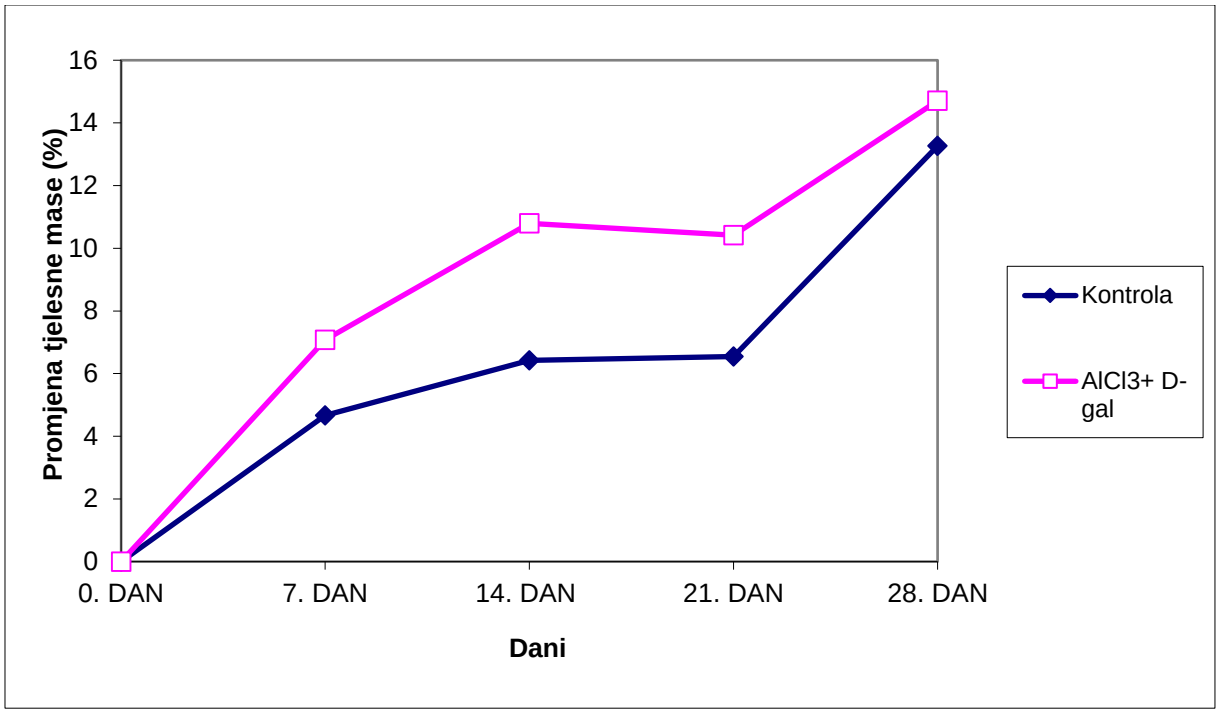
2.3. Statistička analiza

Svi pokusi provedeni su u duplikatu. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SV ± SD) i/ili standardna pogreška (SV ± SP). Podaci su analizirani pomoću Kruskal-Wallis ANOVA-a testa. Daljnja analiza razlika između skupina napravljena je višestrukom komparacijom srednjih vrijednosti svih skupina. Statistička analiza je provedena pomoću STATISTICA 12 programa (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Statistička točnost određena je na razini $P < 0,05$.

3. REZULTATI

3.1. Promjena tjelesne mase pokusnih životinja

Iz dobiveni rezultata postotka promjene tjelesne mase (Slika 13.) vidimo da je veći rast u masi imala skupina obrađena kombiniranim unosom $AlCl_3$ i D-galaktoze u odnosu na kontrolnu skupinu.



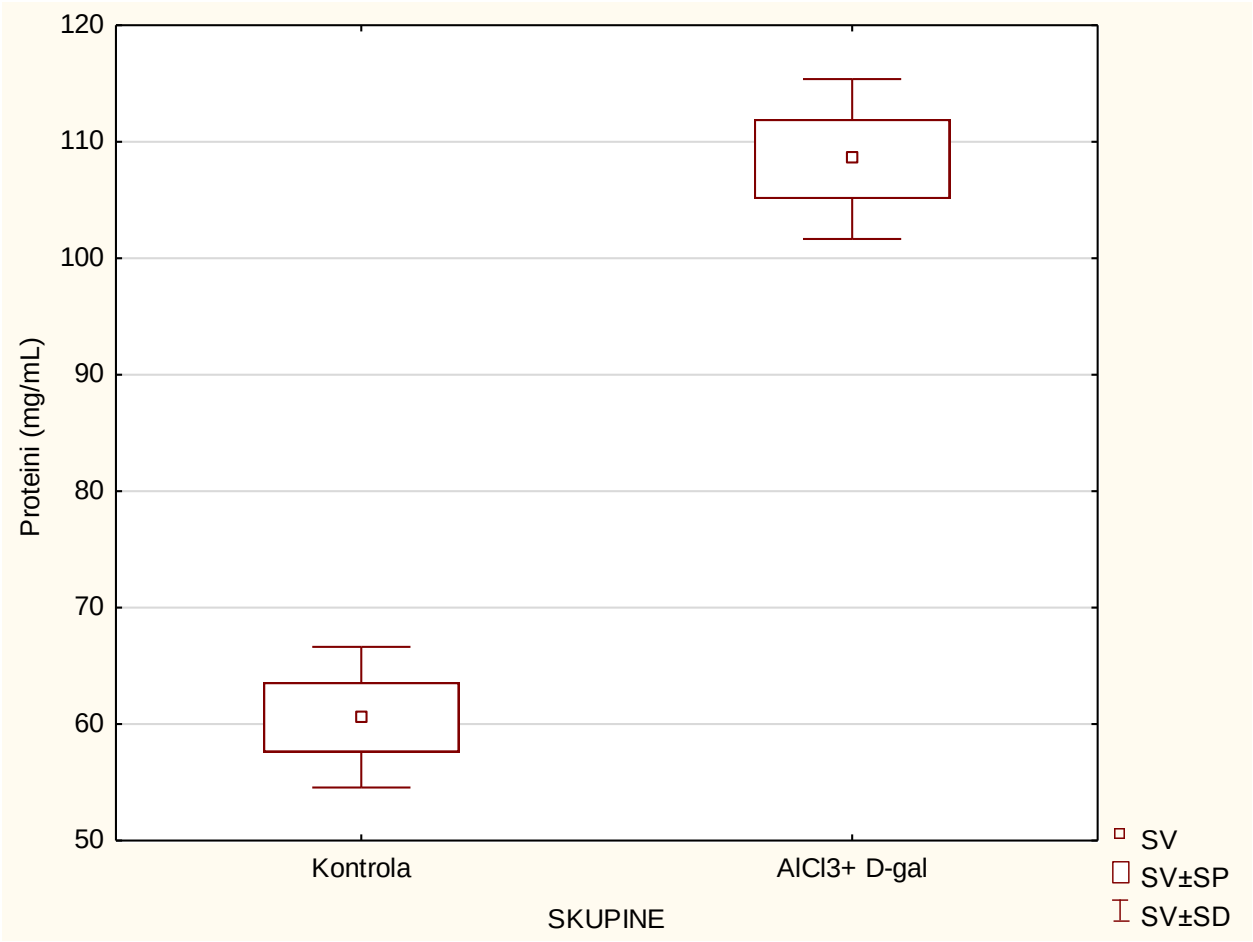
Slika 13. Promjena tjelesne mase (%) kontrolne skupine i skupine obrađene $AlCl_3$ i D-galaktozom u soju štakora Y59

Štakori skupine $AlCl_3$ + D-gal (N=6) su injicirani *i.p.* s $AlCl_3$ (10 mg/kg) i D-galaktozom (60 mg/kg) tijekom 28 dana. Kontrolni štakori (N=6) su injicirani *i.p.* s NaCl-om tijekom 28 dana. Tjelesna masa u obje skupine je mjerena prije početka pokusa, jednom tjedno za vrijeme pokusa i neposredno prije žrtvovanja. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV.

3.2. Određivanje parametara oksidativnog stresa

3.2.1. Koncentracija proteina po Lowry-u

Iz Slike 14. vidljivo je da je veća koncentracija proteina prisutna u skupini obrađenoj $AlCl_3$ i D-galaktozom u odnosu na kontrolnu skupinu. Razlika u koncentraciji proteina nije statistički značajna.



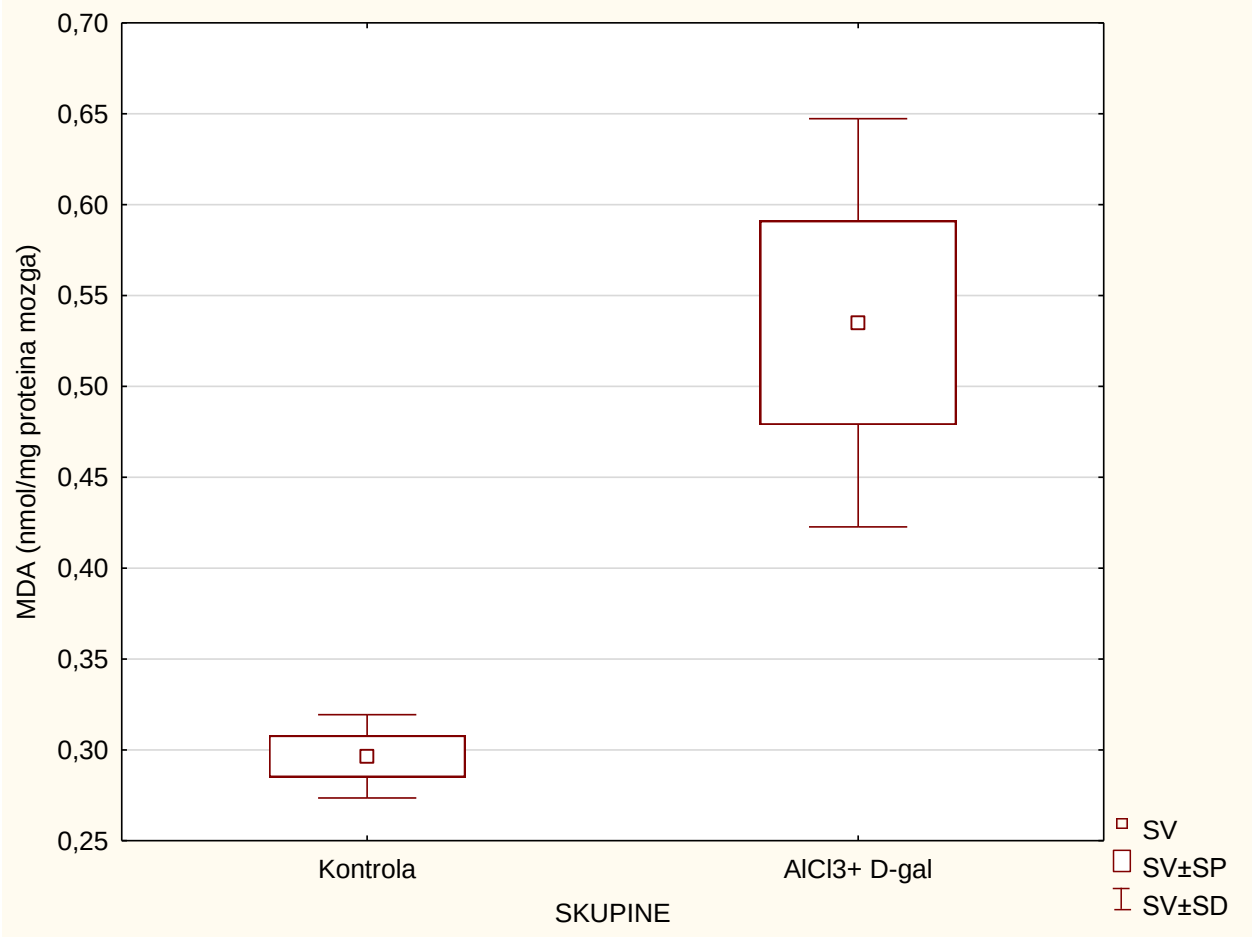
Slika 14. Koncentracija proteina u mozgu kontrolne skupine i skupine obrađene $AlCl_3$ i D-galaktozom u soju štakora Y59

Štakori skupine $AlCl_3$ + D-gal (N=6) su injicirani *i.p.* s $AlCl_3$ (10 mg/kg) i D-galaktozom (60 mg/kg) tijekom 28 dana. Kontrolni štakori (N=6) su injicirani *i.p.* s NaCl-om tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SD (SP).

Kratice: SV- srednja vrijednost, SP- standardna pogreška, SD- standardna devijacija

3.2.2. Koncentracija malondialdehida (MDA)

Dobiveni podaci ukazuju (Slika 15.) na povećanu koncentraciju MDA u skupini obrađenoj $AlCl_3$ i D-galaktozom. Ipak dobivena razlika nije statistički značajna.



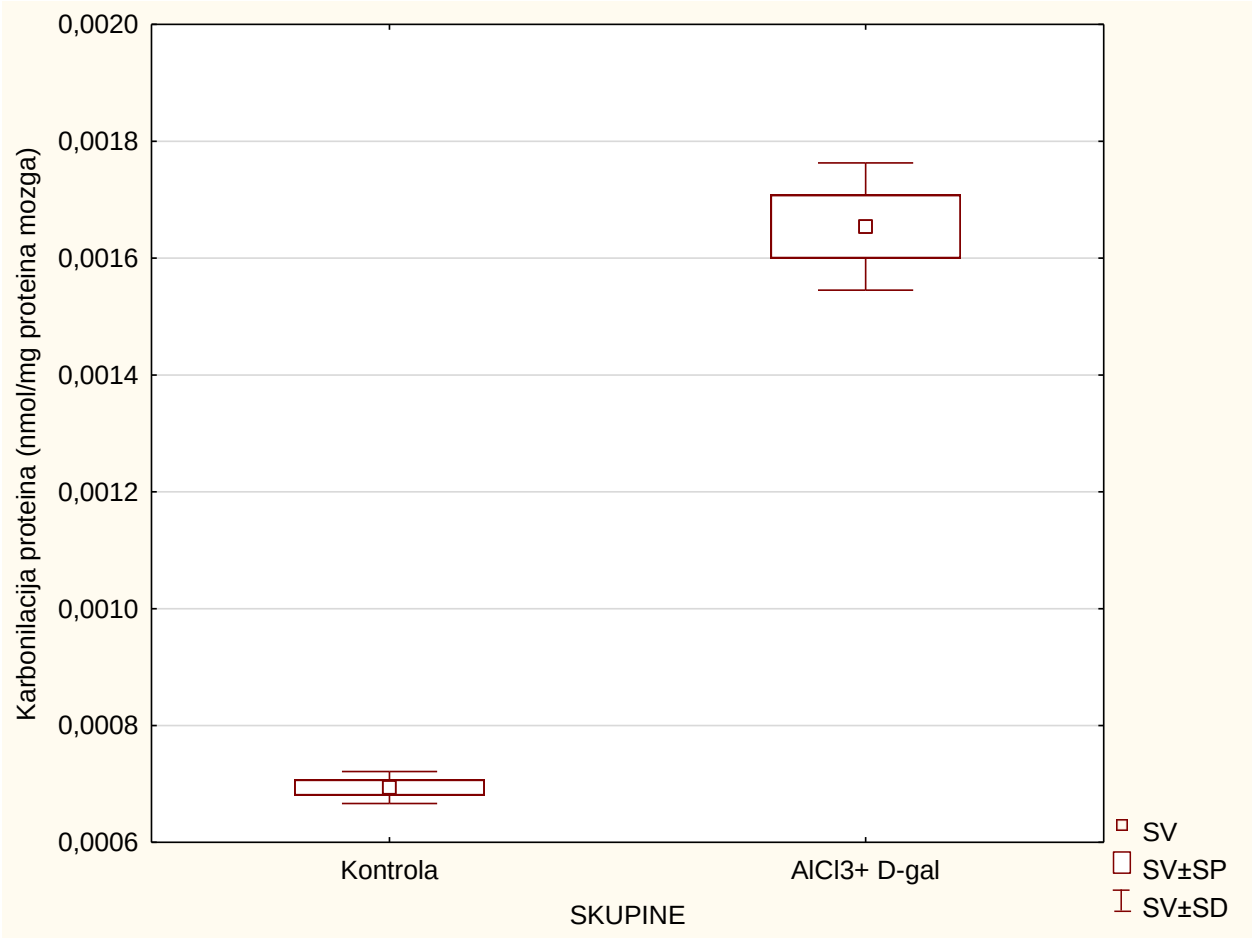
Slika 15. Koncentracija MDA u mozgu kontrolne skupine i skupine obrađene $AlCl_3$ i D-galaktozom u soju štakora Y59

Štakori skupine $AlCl_3$ + D-gal (N=6) su injicirani *i.p.* s $AlCl_3$ (10 mg/kg) i D-galaktozom (60 mg/kg) tijekom 28 dana. Kontrolni štakori (N=6) su injicirani *i.p.* s NaCl-om tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SD (SP).

Kratice: SV- srednja vrijednost, SP- standardna pogreška, SD- standardna devijacija

3.2.3. Koncentracija proteinskih karbonila

Slika 16. pokazuje koncentraciju proteinskih karbonila, gdje je vidljivo da je koncentracija proteinskih karbonila statistički značajno ($P < 0,05$) veća u skupini obrađenoj s $AlCl_3$ + D-gal u odnosu na kontrolnu skupinu.



Slika 16. Koncentracija proteinskih karbonila u mozgu kontrolne skupine i skupine obrađene $AlCl_3$ i D-galaktozom u soju štakora Y59

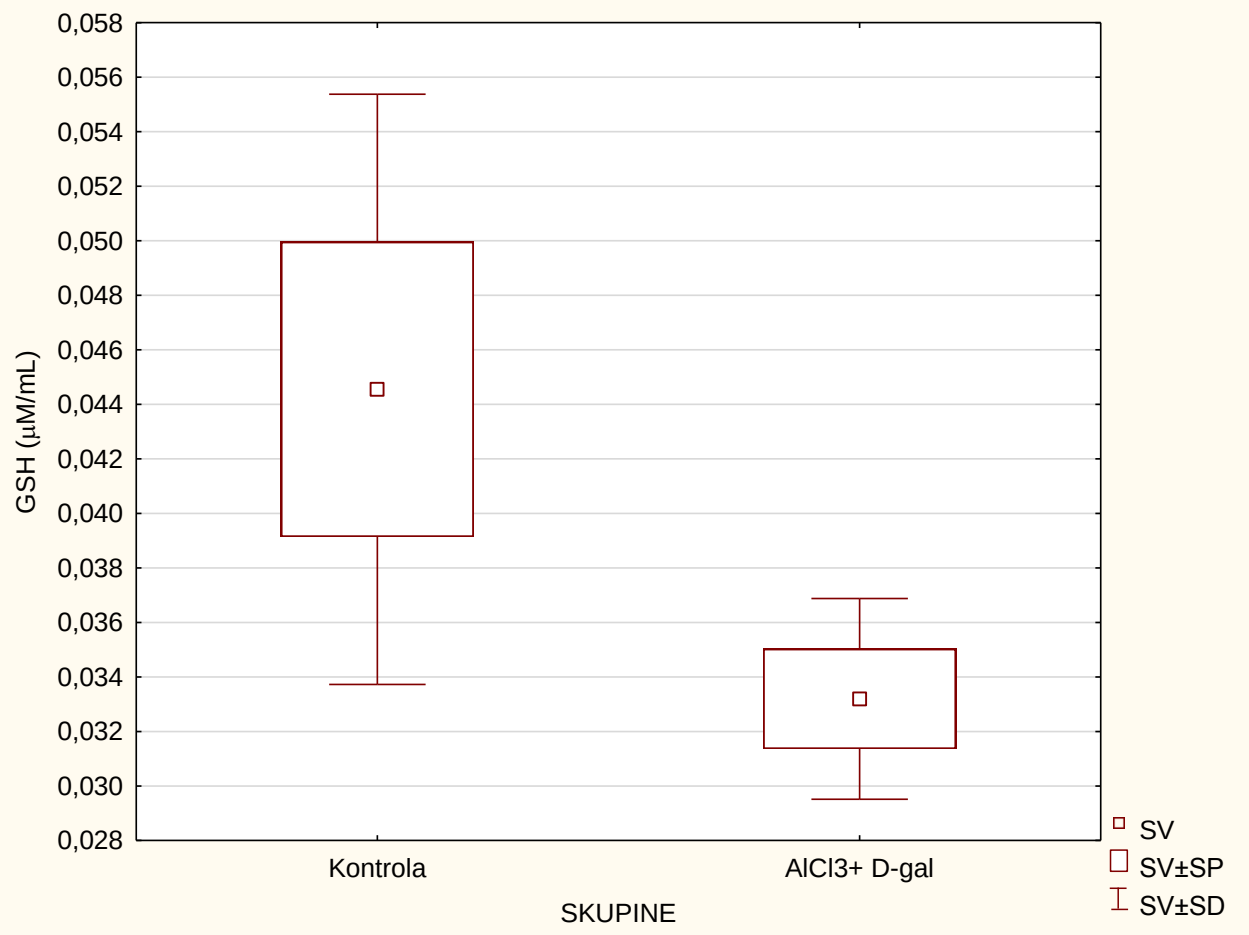
Štakori skupine $AlCl_3$ + D-gal (N=6) su injicirani *i.p.* s $AlCl_3$ (10 mg/kg) i D-galaktozom (60 mg/kg) tijekom 28 dana. Kontrolni štakori (N=6) su injicirani *i.p.* s NaCl-om tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SD (SP).

Kontrola *vs* $AlCl_3$ + D-gal ($P < 0,05$)

Kratice: SV- srednja vrijednost, SP- standardna pogreška, SD- standardna devijacija

3.2.4. Koncentracija glutationa

Koncentracija glutationa je manja kod skupine obrađene $AlCl_3$ i D-galaktozom u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 17.) Razlika nije statistički značajna.



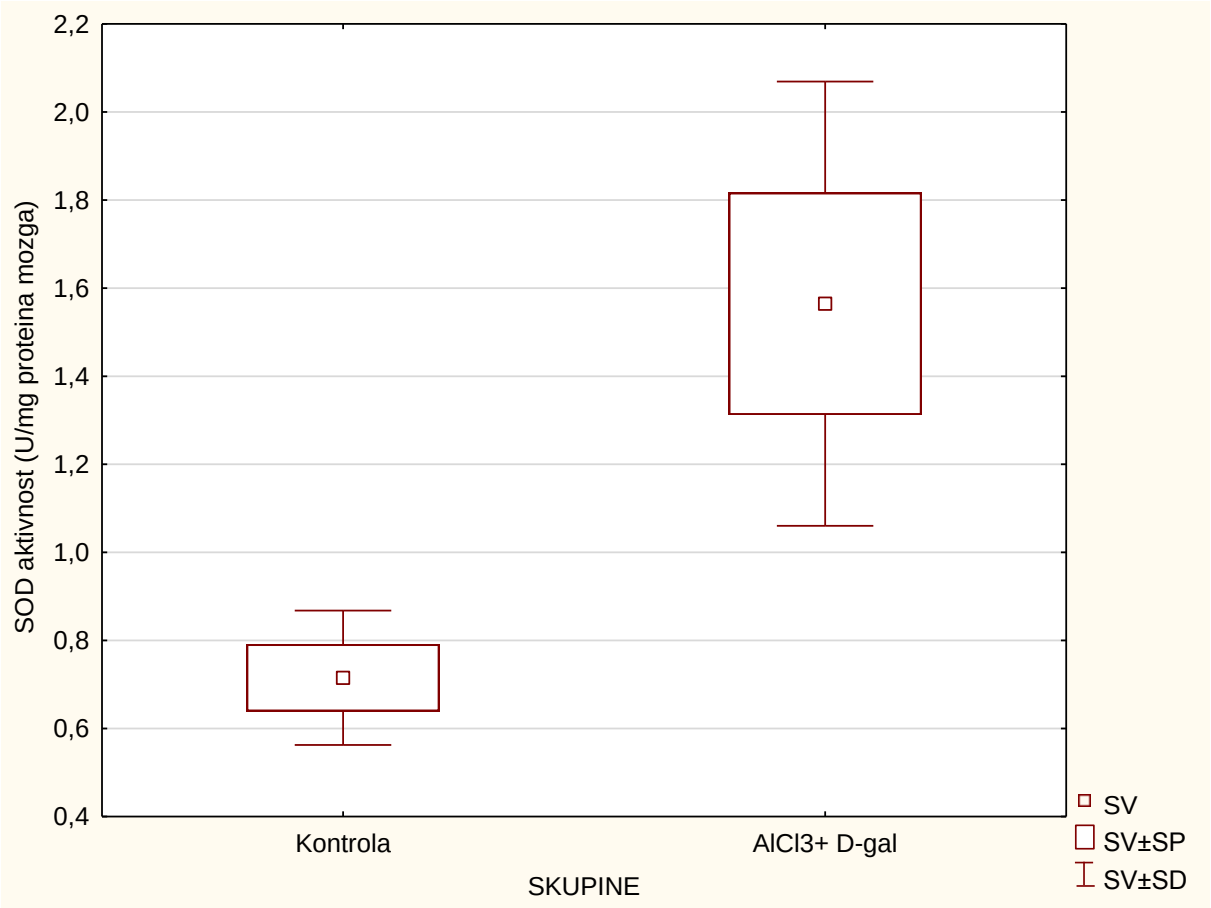
Slika 17. Koncentracija glutationa u mozgu kontrolne skupine i skupine obrađene $AlCl_3$ i D-galaktozom u soju štakora Y59

Štakori skupine $AlCl_3$ + D-gal (N=6) su injicirani *i.p.* s $AlCl_3$ (10 mg/kg) i D-galaktozom (60 mg/kg) tijekom 28 dana. Kontrolni štakori (N=6) su injicirani *i.p.* s NaCl-om tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SD (SP).

Kratice: SV- srednja vrijednost, SP- standardna pogreška, SD- standardna devijacija

3.2.5. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD)

Veća aktivnost superoksid dismutaze zabilježena je u skupini obrađenoj s $AlCl_3$ i D-galaktozom u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 18.). Ta razlika između skupina nije statistički značajna.



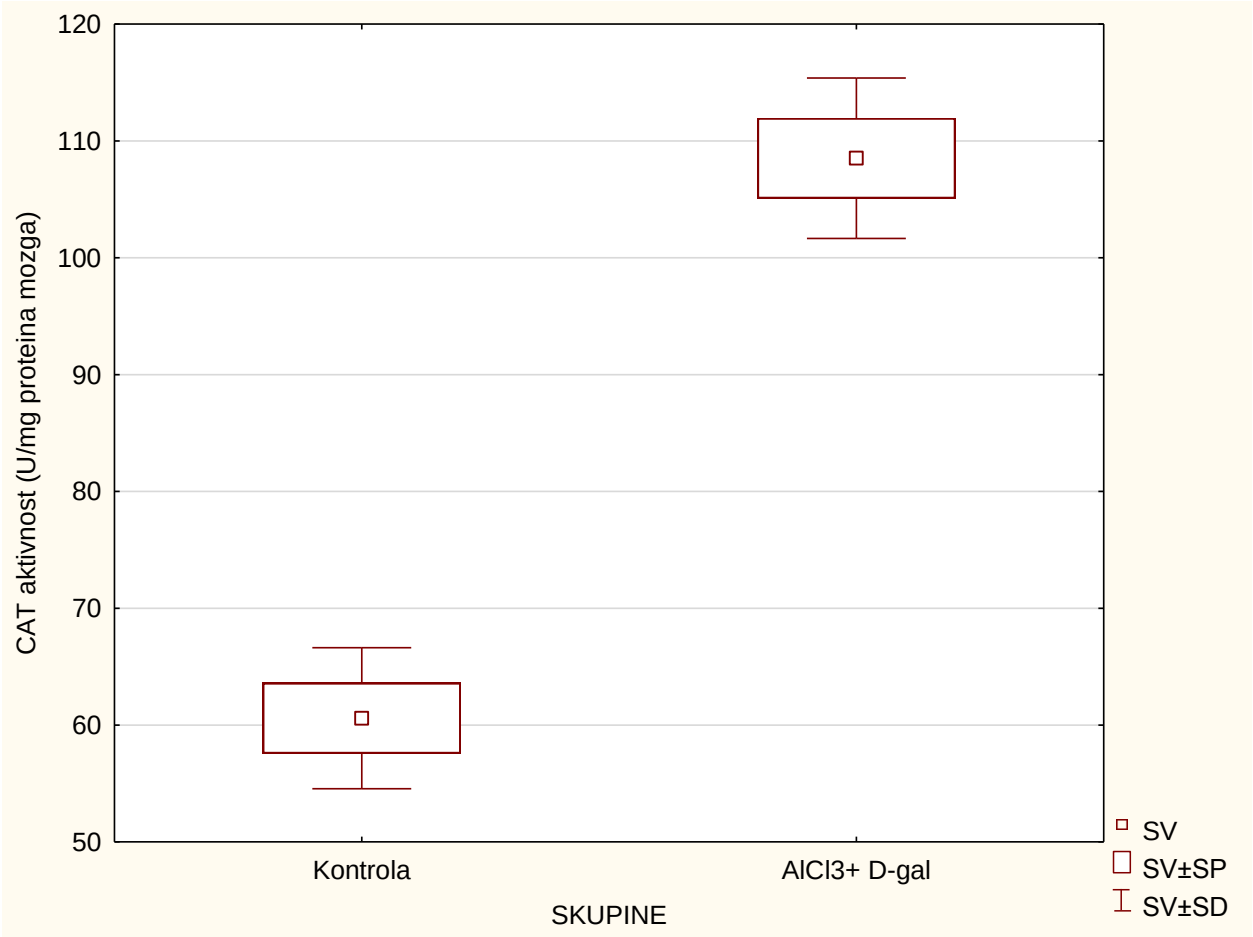
Slika 18. Aktivnost SOD u mozgu kontrolne skupine i skupine obrađene $AlCl_3$ i D-galaktozom u soju štakora Y59

Štakori skupine $AlCl_3$ + D-gal (N=6) su injicirani *i.p.* s $AlCl_3$ (10 mg/kg) i D-galaktozom (60 mg/kg) tijekom 28 dana. Kontrolni štakori (N=6) su injicirani *i.p.* s NaCl-om tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SD (SP).

Kratice: SV- srednja vrijednost, SP- standardna pogreška, SD- standardna devijacija

3.2.6. Aktivnost katalaze (CAT)

Iz dobivenih rezultata (Slika 19.) vidljivo je da je veća aktivnost katalaze u skupini obrađenoj $AlCl_3$ i D-galaktozom. Razlika između $AlCl_3$ + D-gal skupine i kontrolne skupine nije statistički značajna.



Slika 19. Aktivnost katalaze u mozgu kontrolne skupine i skupine obrađene $AlCl_3$ i D-galaktozom u soju štakora Y59

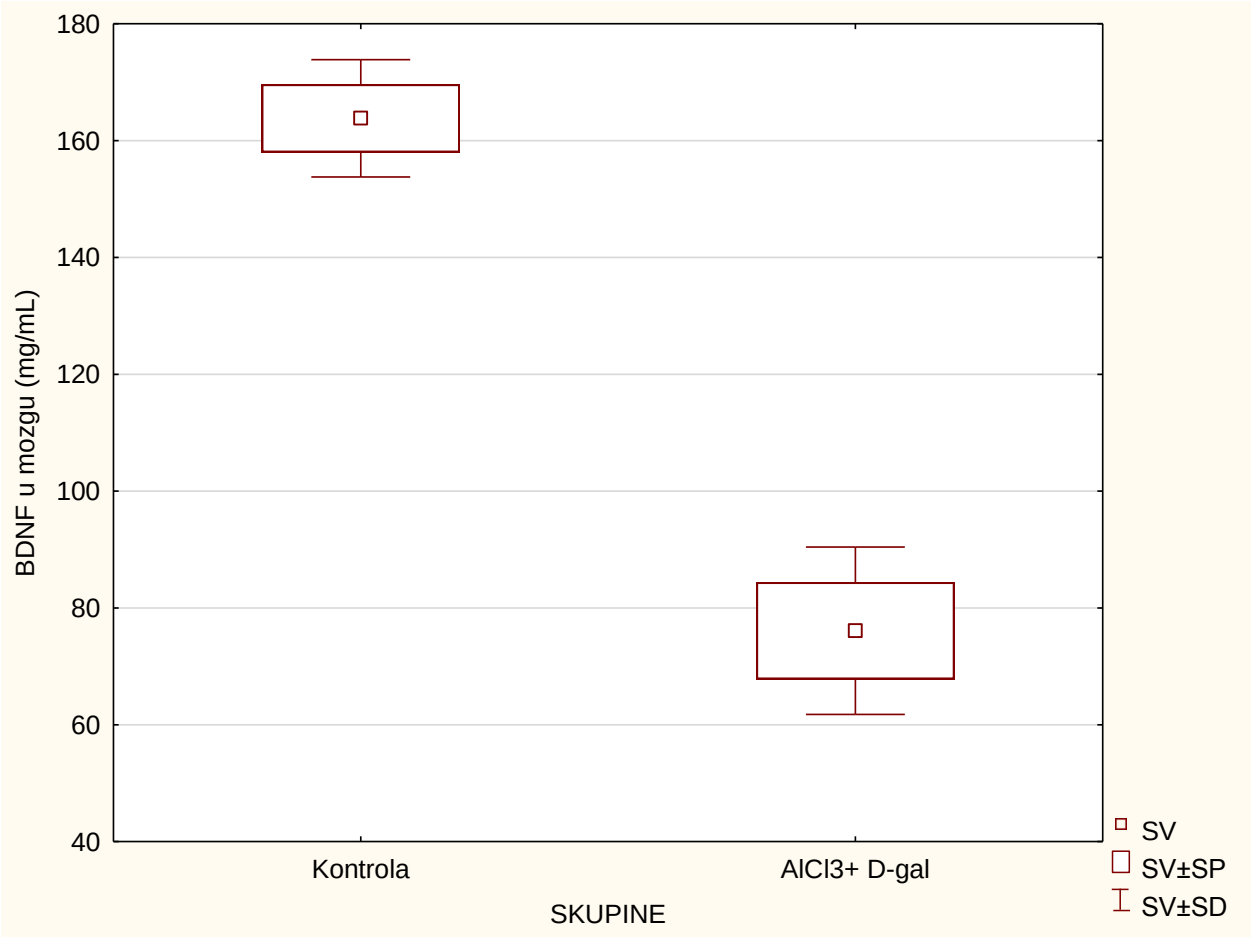
Štakori skupine $AlCl_3$ + D-gal (N=6) su injicirani *i.p.* s $AlCl_3$ (10 mg/kg) i D-galaktozom (60 mg/kg) tijekom 28 dana. Kontrolni štakori (N=6) su injicirani *i.p.* s NaCl-om tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SD (SP).

Kratice: SV- srednja vrijednost, SP- standardna pogreška, SD- standardna devijacija

3.3. Metode utvrđivanja prisutnosti značajki Alzheimerove bolesti

3.3.1. Koncentracija moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF)

Iz Slike 20. vidljivo je da je koncentracija BDNF-a u mozgu skupine štakora obrađene s $AlCl_3$ i D-galaktozom manja u odnosu na kontrolnu skupinu. Smanjenje je statistički značajno ($P < 0,05$).



Slika 20. Koncentracija BDNF-a u mozgu kontrolne skupine i skupine obrađene $AlCl_3$ i D-galaktozom u soju štakora Y59

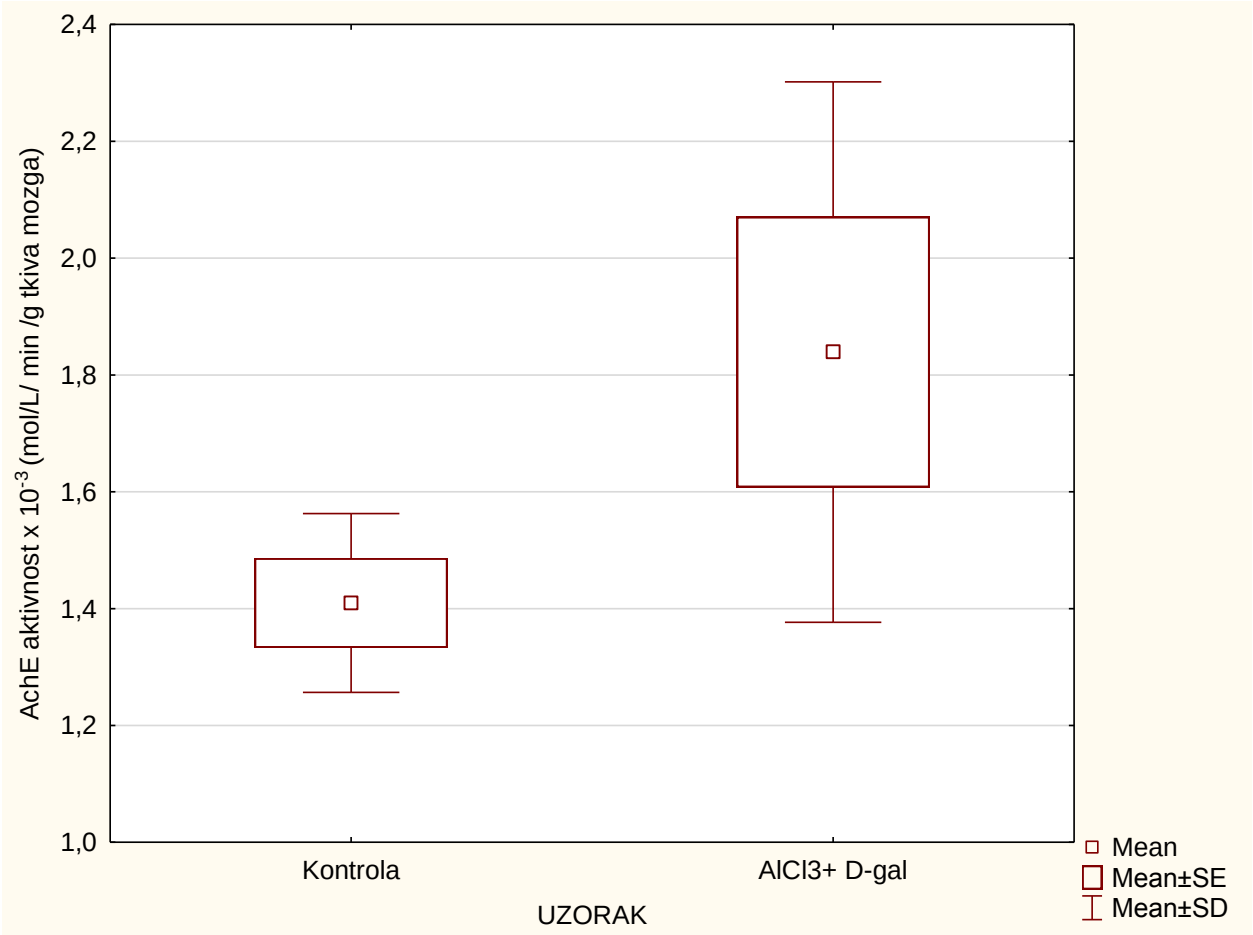
Štakori skupine $AlCl_3$ + D-gal (N=6) su injicirani *i.p.* s $AlCl_3$ (10 mg/kg) i D-galaktozom (60 mg/kg) tijekom 28 dana. Kontrolni štakori (N=6) su injicirani *i.p.* s NaCl-om tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SD (SP).

Kontrola *vs* $AlCl_3$ + D-gal ($P < 0,05$)

Kratice: SV- srednja vrijednost, SP- standardna pogreška, SD- standardna devijacija

3.3.2. Aktivnost acetilkolinesteraze (AchE)

Iz analize rezultata (Slika 21.) vidljiva je povećana aktivnost acetilkolinesteraze u mozgu u skupini obrađenoj s $AlCl_3$ i D-galaktozom u odnosu na kontrolnu skupinu. Povećanje nije statistički značajno.



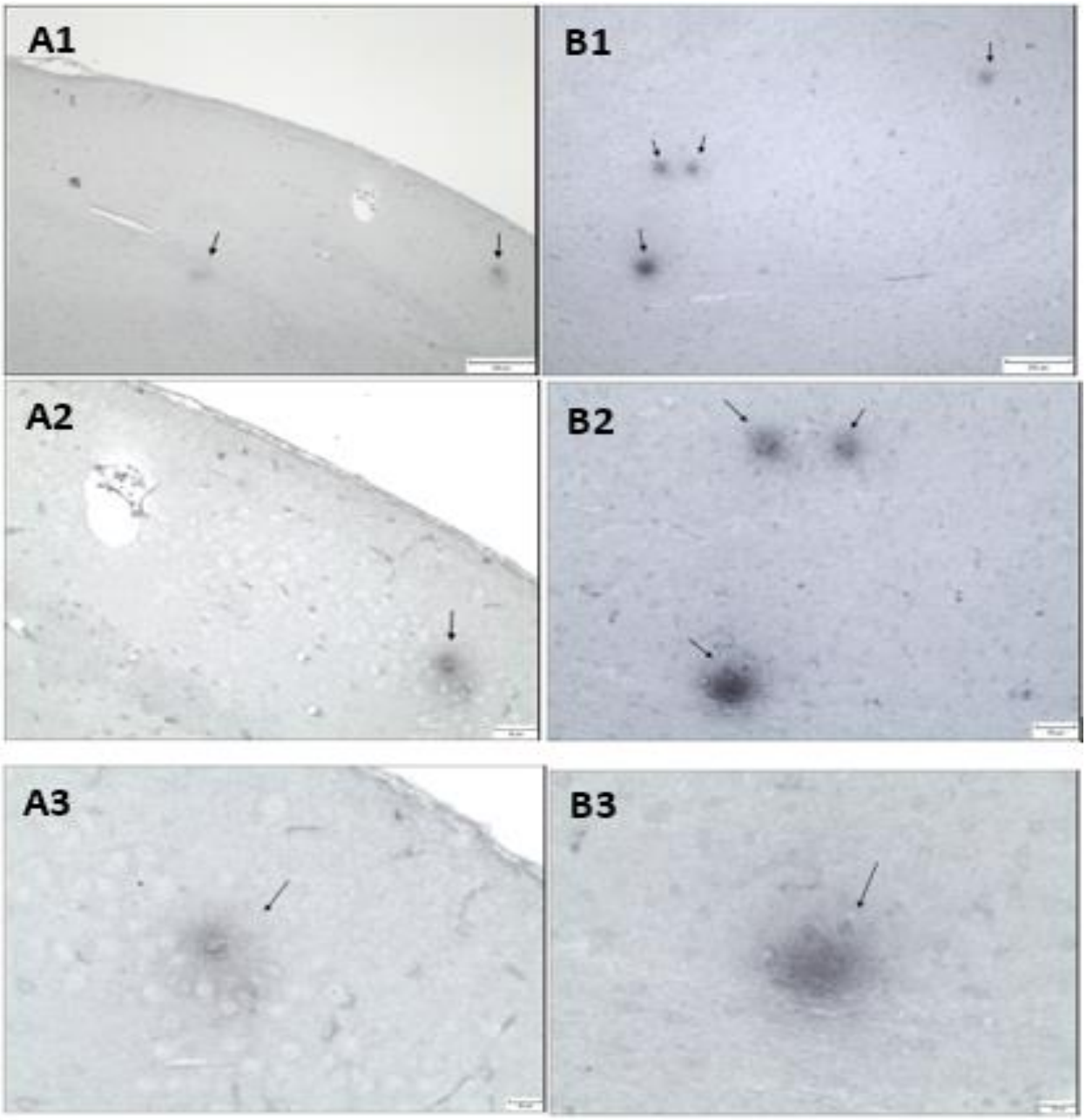
Slika 21. Aktivnost acetilkolinesteraze u mozgu kontrolne skupine i skupine obrađene $AlCl_3$ i D-galaktozom u soju štakora Y59

Štakori skupine $AlCl_3$ + D-gal (N=6) su injicirani *i.p.* s $AlCl_3$ (10 mg/kg) i D-galaktozom (60 mg/kg) tijekom 28 dana. Kontrolni štakori (N=6) su injicirani *i.p.* s NaCl-om tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SD (SP).

Kratice: SV- srednja vrijednost, SP- standardna pogreška, SD- standardna devijacija

3.3.3. Imunohistokemija

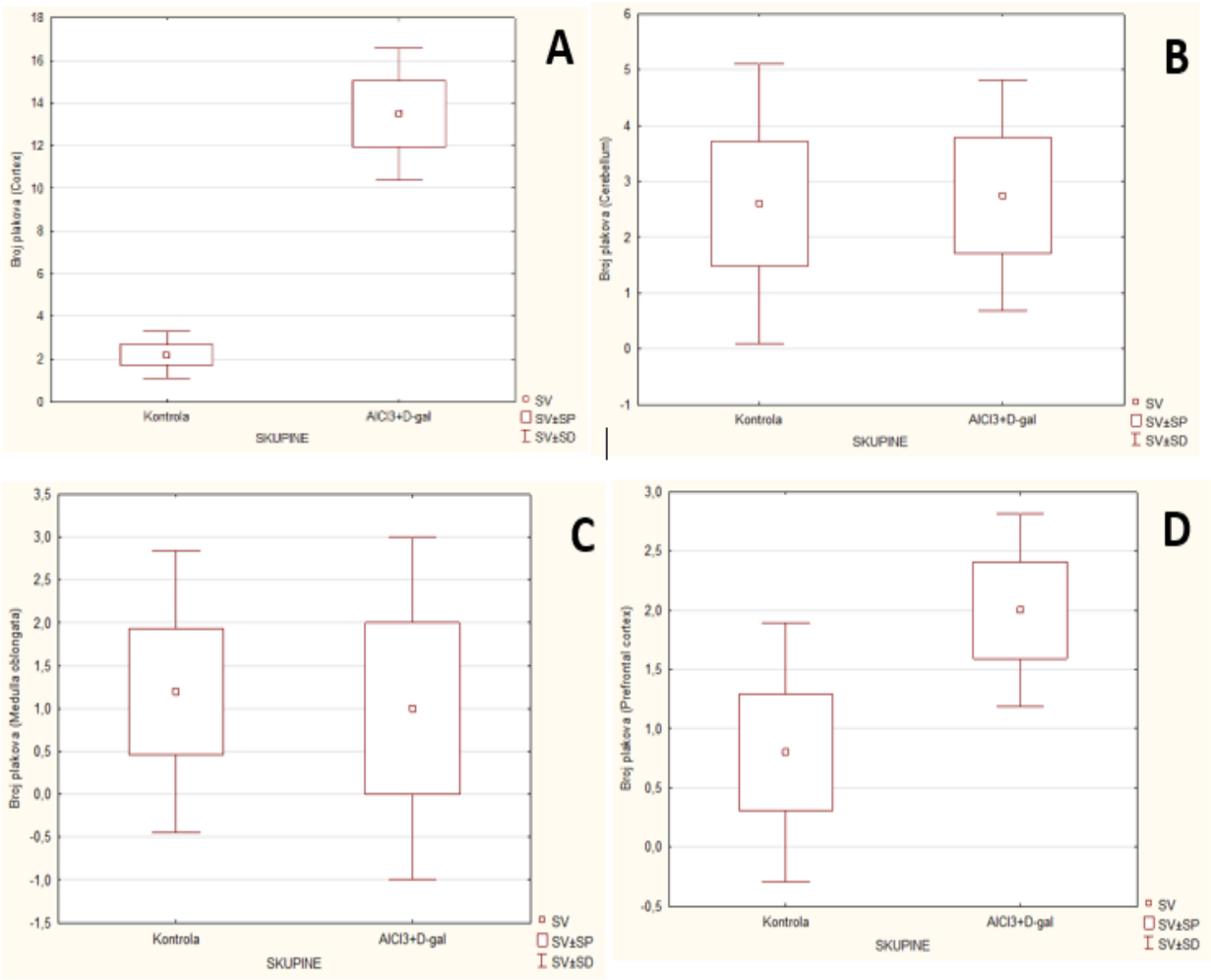
Slika 22. pokazuje prisutnost Aβ plakova u kontrolnoj skupini (Slike A1-3) i u skupini obrađenoj $AlCl_3$ i D-galaktozom (Slike B1-3). U kontrolnoj skupini plakovi su prisutni u manjem broju i sporadično su raspoređeni. Također u kontrolnoj skupini je dobiven slabiji signal što upućuje na manju količinu Aβ u odnosu na $AlCl_3$ + D-gal skupinu. U kontrolnoj skupini nakupine Aβ nalazimo u blizini krvnih žila, dok u $AlCl_3$ + D-gal skupini nisu samo u blizini krvnih žila već i u dubljim slojevima kore. Na Slici 23. vidimo da je broj plakova u prefrontalnoj kori (Slika D) i kori (Slika A) veći u $AlCl_3$ + D-gal skupini u odnosu na kontrolnu skupinu. S tim da je statistički značajno povećanje ($P < 0,05$) zapaženo samo u kori mozga. Približno podjednak broj plakova u obje skupine zapažen je u malom mozgu (Slika B) i produženoj moždini (Slika C).



Slika 22. Prisutnost Aβ plakova u mozgu kontrolne skupine i skupine obrađene $AlCl_3$ i D-galaktozom u soju štakora Y59.

A: Imunohistokemija mozga (korteks kontrolne skupine štakora (0,9% NaCl), primarno protutijelo: 4G8, bojanje: DAB); A1: 4G8 (1:2000); 40x, A2: 4G8 (1:2000); 100x i A3: 4G8 (1:2000); 200x. Dijalitički plak označen crnom strelicom.

B: Imunohistokemija mozga (korteks skupine štakora obrađene s 10 mg/kg $AlCl_3$ + 60 mg/kg D-galaktoze, primarno protutijelo: 4G8, bojanje: DAB); B1: 4G8 (1:2000); 40x, B2: 4G8 (1:2000); 100x , B3: 4G8 (1:2000); 200x. Dijalitički plak označen crnom strelicom.



Slika 23. Broj Aβ plakova u mozgu kontrolne skupine i skupine obrađene $AlCl_3$ i D-galaktozom u soju štakora Y59. A: Broj plakova u kori (lat. *cortex*) mozga; B: Broj plakova u malom mozgu (lat. *cerebellum*); C: Broj plakova u produženoj moždini (lat. *medulla oblongata*); D: Broj plakova u prefrontalnoj kori (lat. *prefrontal cortex*)

Štakori skupine $AlCl_3$ + D-gal (N=6) su injicirani *i.p.* s $AlCl_3$ (10 mg/kg) i D-galaktozom (60 mg/kg) tijekom 28 dana. Kontrolni štakori (N=6) su injicirani *i.p.* s NaCl-om tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SD (SP).

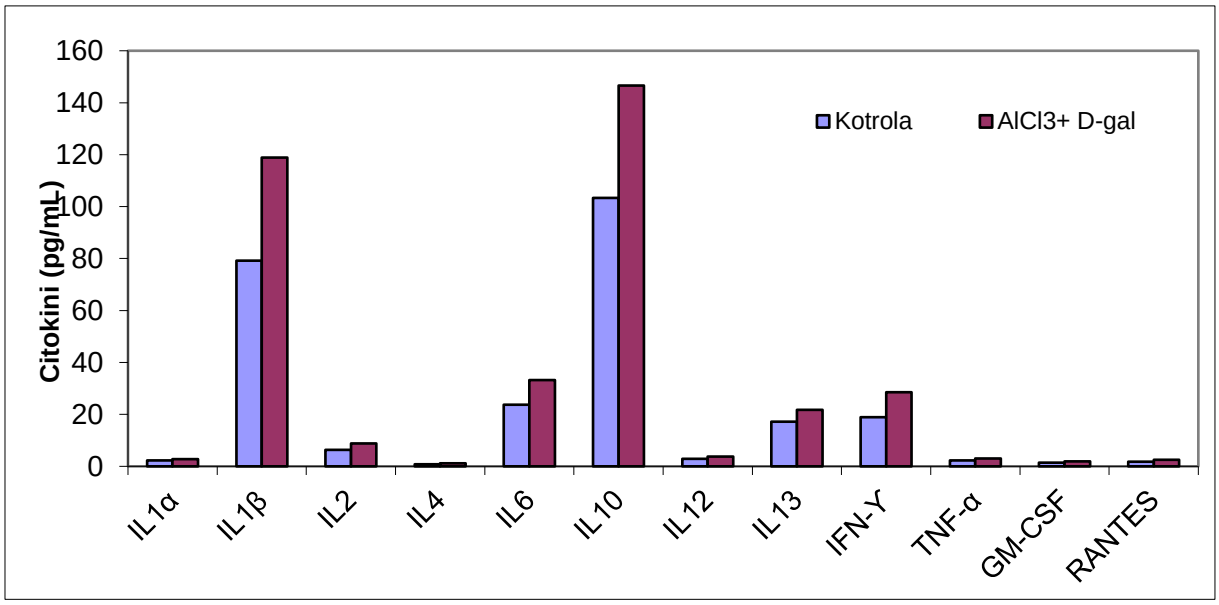
Kontrola *vs* $AlCl_3$ + D-gal ($P < 0,05$) u kori mozga

Kratice: SV- srednja vrijednost, SP- standardna pogreška, SD- standardna devijacija

3.4. Provjera prisutnosti neuroupale

3.4.1. Koncentracija proupalnih citokina

Iz rezultata (Slika 24.) vidljiva je povećana koncentracija proupalnih citokina u skupini obrađenoj s $AlCl_3$ i D-galaktozom u odnosu na kontrolnu skupinu. U $AlCl_3$ + D-gal skupini povećane su koncentracije interleukina 1β, interleukina 6, interleukina 10, interleukina 13 i interferona γ.



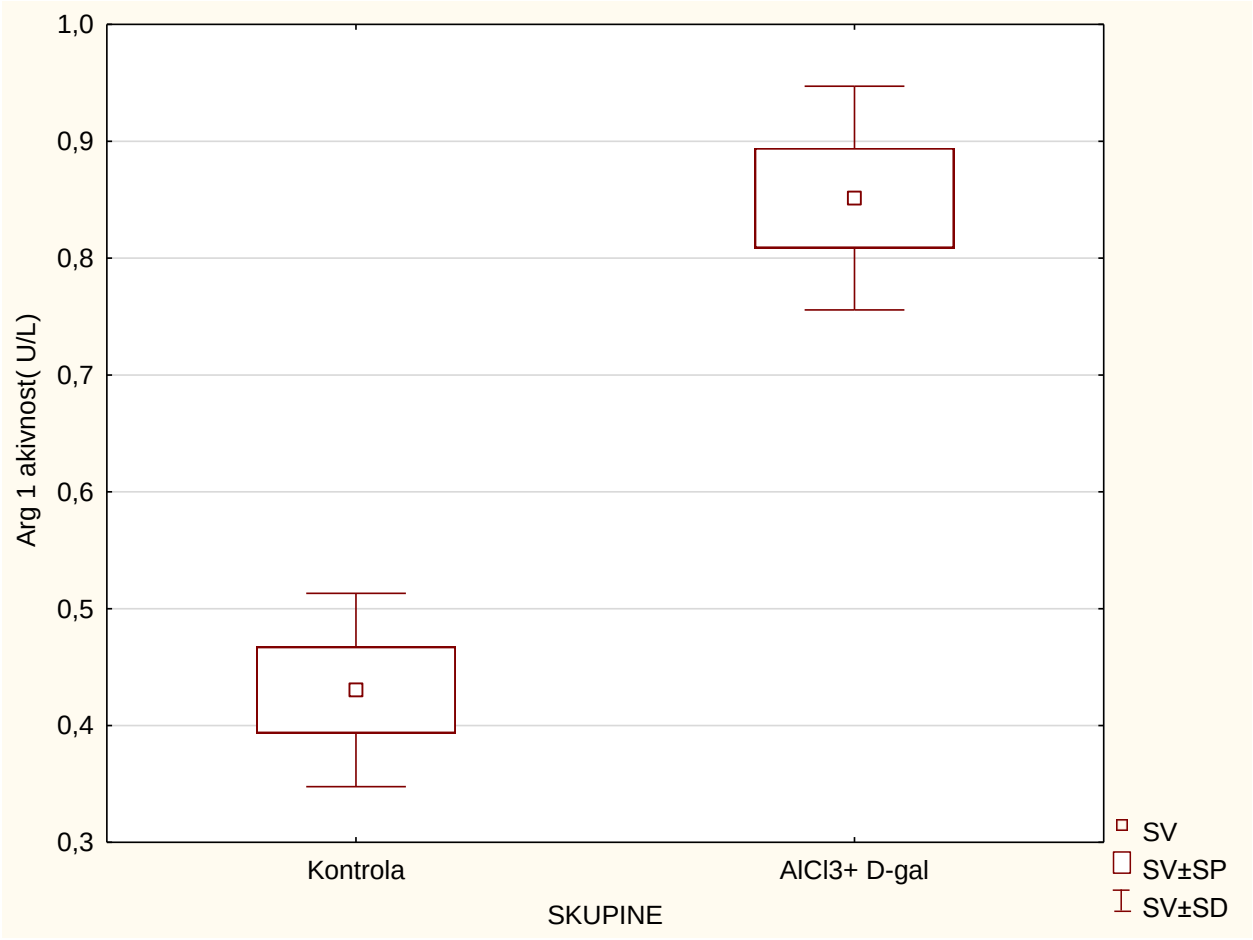
Slika 24. Koncentracija proupalnih citokina u mozgu kontrolne skupine i skupine obrađene $AlCl_3$ i D-galaktozom u soju štakora Y59

Štakori skupine $AlCl_3$ + D-gal (N=6) su injicirani *i.p.* s $AlCl_3$ (10 mg/kg) i D-galaktozom (60 mg/kg) tijekom 28 dana. Kontrolni štakori (N=6) su injicirani *i.p.* s NaCl-om tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SD (SP).

Kratice: IL-1α – interleukin 1α, IL-1β – interleukin 1β, IL-2- interleukin 2, IL-4 – interleukin 4, IL-6- interleukin 6, IL-10 – interleukin 10, IL-12 – interleukin 12, IL-13 – interleukin 13, IFN-γ – interferon γ, TNF-α - čimbenik nekroze tumora α (engl. *tumor* necrosis *factor* - α), GM- CSF- granulocitno-makrofagni čimbenik rasta kolonija (GM-CSF, engl. *granulocyte/macrophage colony stimulating factor*), RANTES- vrsta kemokina (engl. *regulated on activation normal T cell expressed and secreted*)

3.4.2. Aktivnost arginaze I

Iz Slike 25. vidljivo je da je prisutna pojačana aktivnost arginaze 1 u skupini obrađenoj s $AlCl_3$ i D-galaktozom u odnosu na kontrolnu skupinu. Povećanje u aktivnosti arginaze 1 je statistički značajno ($P < 0,01$) u odnosu na kontrolnu skupinu.



Slika 25. Aktivnost arginaze I u mozgu kontrolne skupine i skupine obrađene $AlCl_3$ i D-galaktozom u soju štakora Y59

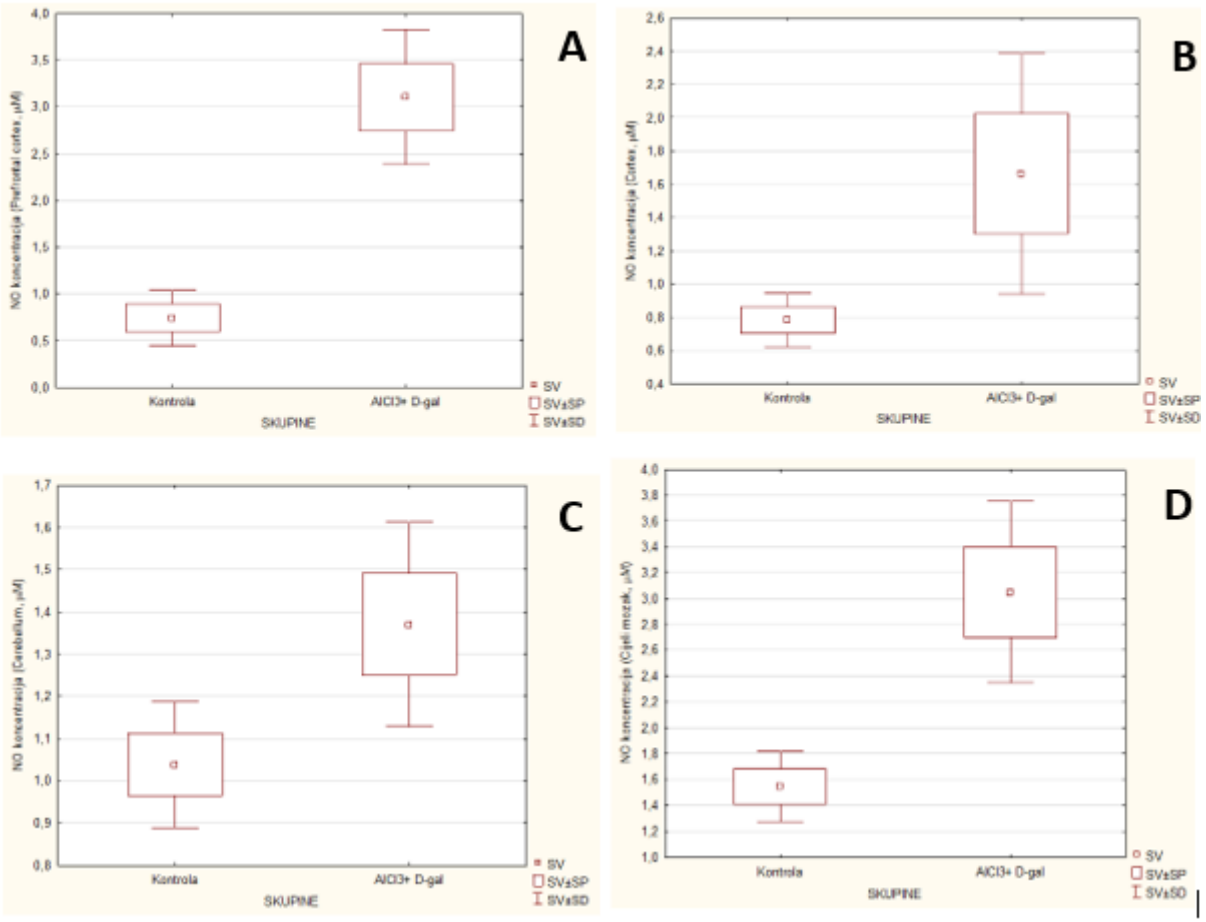
Štakori skupine $AlCl_3$ + D-gal (N=6) su injicirani *i.p.* s $AlCl_3$ (10 mg/kg) i D-galaktozom (60 mg/kg) tijekom 28 dana. Kontrolni štakori (N=6) su injicirani *i.p.* s NaCl-om tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SD (SP).

Kontrola *vs* $AlCl_3$ + D-gal ($P < 0,01$)

Kratice: SV- srednja vrijednost, SP- standardna pogreška, SD- standardna devijacija

3.4.3. Koncentracija dušikovog oksida

Slika 26. pokazuje koncentraciju dušikovog oksida u mozgu kontrolne skupine i skupine obrađene $AlCl_3$ i D-galaktozom u soju štakora Y59. Iz Slike 26. je vidljivo da je koncentracija NO veća u svim izmjerenim regijama mozga (A prefrontalna kora, B kora, C mali mozak i D cijeli mozak) u skupini obrađenoj s $AlCl_3$ i D-galaktozom u odnosu na kontrolnu skupinu. Statistički značajna razlika ($P < 0,05$) izmjerena je samo u prefrontalnoj kori mozga u skupini obrađenoj s $AlCl_3$ + D-gal u odnosu na kontrolnu skupinu.



Slika 26. Koncentracija dušikovog oksida u mozgu kontrolne skupine i skupine obrađene $AlCl_3$ i D-galaktozom u soju štakora Y59. A: koncentracija NO u prefrontalnoj kori (lat. prefrontal cortex) mozga; B: koncentracija NO u kori (lat. cortex) mozga; C: koncentracija NO u malom mozgu (lat. cerebellumu); D: koncentracija NO u cijelom mozgu

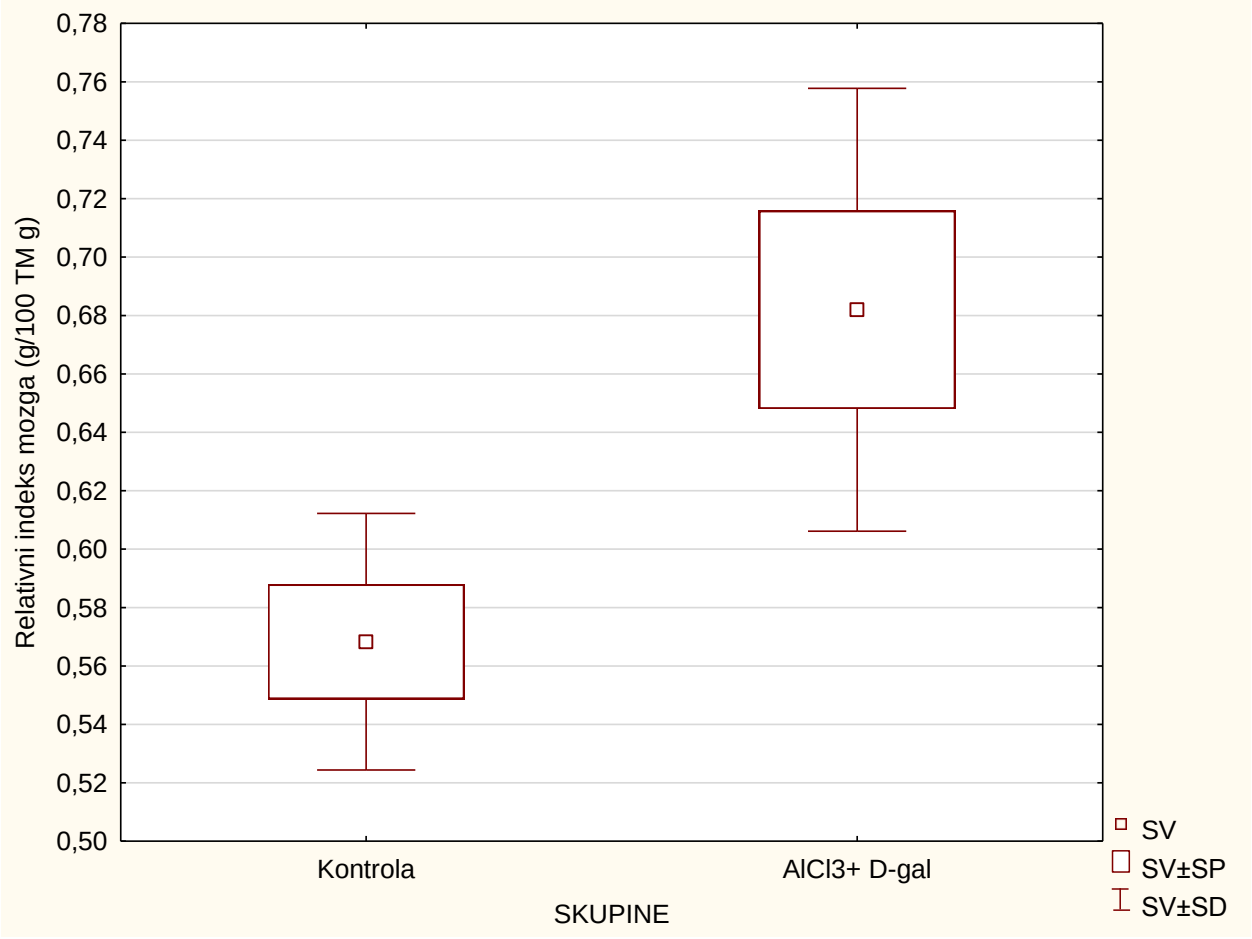
Štakori skupine $AlCl_3$ + D-gal (N=6) su injicirani *i.p.* s $AlCl_3$ (10 mg/kg) i D-galaktozom (60 mg/kg) tijekom 28 dana. Kontrolni štakori (N=6) su injicirani *i.p.* s NaCl-om tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SD (SP).

Kontrola *vs* $AlCl_3$ + D-gal ($P < 0,05$) u prefrontalnoj kori mozga

Kratice: SV- srednja vrijednost, SP- standardna pogreška, SD- standardna devijacija

3.4.4. Relativni indeks mozga

Slika 27. pokazuje relativni indeks mozga gdje je vidljivo da je relativni indeks mozga u skupini obrađenoj s $AlCl_3$ i D-galaktozom veći u odnosu na kontrolnu skupinu, ali bez statističke značajnosti.



Slika 27. Relativni indeks mozga kontrolne skupine i skupine obrađene $AlCl_3$ i D-galaktozom u soju štakora Y59

Štakori skupine AlCl_3 + D-gal (N=6) su injicirani *i.p.* s AlCl_3 (10 mg/kg) i D-galaktozom (60 mg/kg) tijekom 28 dana. Kontrolni štakori (N=6) su injicirani *i.p.* s NaCl-om tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SD (SP).

Kratice: SV- srednja vrijednost, SP- standardna pogreška, SD- standardna devijacija

4. RASPRAVA

Alzheimerova bolest je neurodegenerativna bolest današnjice od koje obolijeva sve više ljudi. AB ima višestruku etiologiju. Razvijene su brojne hipoteze kojima se nastoji objasniti na koji način dolazi do njenog razvoja. Neke od hipoteza su da na razvoj bolesti utječu mutacije u nekim genima, oksidativni stres, poremećaj homeostaze kalcija, hormoni, upala i poremećaj u staničnom ciklusu, što kao rezultat ima poremećaj u neurotransmiterima i smanjenje kognitivnih sposobnosti (Mohandas i sur. 2009). Ovim istraživanjem željelo se vidjeti u kolikoj mjeri oksidativni stres i njime uzrokovana neuroupala doprinose nastanku pokazatelja AB i to kroz praćenje neurotoksičnosti $AlCl_3$ i D-galaktoze.

Naime aluminij je sveprisutan u našem svakodnevnom životu možemo ga naći u zraku, vodi, hrani i lijekovima putem kojih može ući i u naš organizam (Turgut i sur. 2006). Već je 1960. godine predložena hipoteza da aluminij doprinosi patogenezi AB. Ta hipoteza je dodatno učvršćena kada se istraživanjima došlo do zaključka da konformacijske promjene Aβ igraju bitnu ulogu u patogenezi. Metali poput aluminija, željeza, bakra i cinka utječu na oligomerizaciju i konformacijske promjene Aβ. Ipak brojna istraživanja koja su uslijedila pokazala su da aluminij ima daleko veći utjecaj na razvoj patologije u AB. Usprkos brojnim istraživanjima još uvijek u potpunosti ne razumijemo kakav utjecaj aluminij ima na mozak (Kawahara i Kato- Negishi 2011).

D-galaktoza je monosaharid koji se u velikom postotku nalazi u mlijeku, tj. nastaje razgradnjom laktoze. Za D-galaktozu se pokazalo da uzrokuje starenje mozga kod eksperimentalnih životinja ukoliko im se unosi u organizam kroz duže vrijeme. Starenje mozga karakterizira disfunkcija mitohondrija koju obilježava smanjena aktivnost respiratornog lanca enzima i produkcije ATP-a i povećana proizvodnja slobodnih radikala, te mutacije u mDNA. Kod D-galaktozom uzrokovanog starenja dolazi i do upale, apoptoze, te smanjene količine BDNF-a. Sve to dovodi do smanjenja kognitivnih funkcija (Shwe i sur. 2017).

Naši rezultati potvrđuju poznate značajke $AlCl_3$ i D-galaktoze u proizvodnji oksidacijskog stresa, neurotoksičnih i neuroupalnih promjena u mozgu, te pokazatelja značajki Alzheimerove bolesti (Slike 14-27). Tijekom pokusa pratili smo postotak promjene mase životinja kao mogućeg pokazatelja toksičnosti $AlCl_3$ ili mogućeg povećanja mase životinja zbog unosa D-galaktoze. Veći rast u masi tijekom 28 dana imala je grupa $AlCl_3$ + D-gal, tome je vjerojatno uzrok D-galaktoza koja je kao šećer doprinijela bržem dobivanju na masi (Slika

13.). Da bi utvrdili da li je došlo do nastanka pokazatelja AB u $AlCl_3$ + D-gal eksperimentalnoj grupi životinja, napravili smo tri testa. Mjerili smo koncentraciju BDNF-a, aktivnost acetilkolinesteraze i napravili imunohistokemijsku analizu mozga kako bi utvrdili postojanje Aβ. Dobiveni rezultati pokazali su statistički značajno manju ($P < 0,05$) koncentracija BDNF-a u $AlCl_3$ + D-gal skupini u odnosu na kontrolnu skupinu. Smanjenju BDNF-a doprinose oba primjenjena spoja $AlCl_3$ i D-galaktoza što je u sukladu s podacima Said i Abd Rabo (2017) i Shwe i suradnici (2017). BDNF je jako važan za normalnu funkciju centralnog i perifernog živčanog sustava, jer spriječava odumiranje postojećih neurona, te potiče neurogenezu i sinaptogenezu. Istraživanjima je pokazano da je važan za učenje i pamćenje, te da je pojačano eksprimiran u hipokampusu za vrijeme učenja. Iz toga razloga njegove smanjene količine povezuju se s različitim neurološkim poremećajima i bolestima pa tako i s Alzheimerovom bolešću. Također poznato je da je mozak sa smanjenom koncentracijom BDNF podložniji oštećenjima od oksidativnog stresa (Binder i Scharfman 2004) što je u sukladu s našim rezultatima (Slike 14-20).

Aktivnost acetilkolinesteraze, enzima koji katalizira razgradnju neurotransmitera acetilkolina na acetil i kolin, u našim rezultatima (Slika 21.) je povećana u skupini obrađenoj s $AlCl_3$ + D-gal u odnosu na kontrolnu skupinu. Povećana aktivnost može ukazivati na prisutnost Aβ. Naime istraživanja su pokazala da Aβ utječe na ekspresiju AchE što sugerira da je povećanje AchE oko plakova direktna posljedica nakupljanja Aβ. AchE može doći u više oblika, u obliku tetramera (u najvećoj mjeri prisutan u zdravom mozgu) i u obliku dimera i monomera. Omjer ovih vrsta je značajno promijenjen u AB, gdje imamo manje tetramera, a više monomera. Pokazano je i da se aktivnost i to posebno monomera u blizini plakova povećava. AchE igra ulogu u Aβ fibrilogenezi i modulira amiloidni metabolizam. Povećano stvaranje AchE dovodi do niza poremećaja u ponašanju i do kolinergičke disregulacije (Garcia-Ayllon i sur. 2007). Acetilkolinesteraza je važna u kontroli prijenosa signala acetilkolinom. A acetilkolin je neurotransmiter važan i u centralnom i u perifernom živčanom sustavu. U mozgu acetilkolin mijenja ekscitabilnost neurona, utječe na sinaptički prijenos akcijskog potencijala, stvara sinaptičku plastičnost i koordinira aktivacijom grupa neurona. Na taj način mijenja stanje neuronske mreže u mozgu kako bi mogli odgovoriti na vanjske i unutarnje podražaje (Picciotto i sur. 2012). Ukoliko dođe do poremećaja u prijenosu akcijskog potencijala acetilkolinom, na što može utjecati i količina i aktivnost acetilkolinesteraze može doći do problema s učenjem i pamćenjem, što nalazimo i kod oboljelih od Alzheimerove bolesti.

Imunohistokemijska analiza pokazala je prisutnost Aβ plakova u obje skupine životinja (Slike 22. i 23.). Ipak u kontrolnoj skupini (u zdravom mozgu) prisutni su u manjoj količini. Također vidjeli smo da su nakupine Aβ u zdravom mozgu prisutne uglavnom uz krvne žile što ukazuje na podatke Murphy i LeVine III (2010) koji u svom istraživanju sugeriraju da se dio Aβ prenosi putem LRP proteina preko krvo-moždane barijere u krvotok, te da i poremećaj u prijenosu Aβ u krv zajedno s poremećajem u njegovoj razgradnji može dovesti do prekomjernog nakupljanja Aβ u mozgu. Povećano nakupljanje Aβ (veći broj plakova i jači intenzitet signala) vidljiv u skupini obrađenoj s $AlCl_3$ i D-galaktozom vjerojatno je uzrokovano u većoj mjeri $AlCl_3$, budući da su dosadašnja istraživanja pokazala da Al može uzrokovati promjene u konformaciji $A\beta_{40}$, prijelaz iz nasumične spiralne strukture u strukturu β ploče koja potiče stvaranje netopljivih amiloidnih fibrila i njihovu akumulaciju (Zhang i sur. 2015).

Analizom dobivenih parametara oksidacijskog stresa vidimo da je oksidativni stres prisutan u skupini obrađenoj s $AlCl_3$ i D-galaktozom (Slike 14-19) na što ukazuje povećana koncentracija MDA i karboniliranih proteina, te NO-a i pojačana aktivnost CAT i SOD dok je koncentracija GSH snižena.

SOD i CAT su endogeni antioksidativni enzimi važni u obrani organizma od slobodnih radikala. SOD katalizira razgradnju superoksida u vodikov peroksid i molekularni kisik, a CAT katalizira razgradnju vodikova peroksida na vodu i kisik (Hacioglu i sur. 2016). Povećana aktivnost SOD i CAT koju smo dobili kod skupine $AlCl_3$ + D-gal sugerira na povećanu koncentraciju superoksidnog radikala, a potom i vodikovog peroksida. Reducirani oblik glutationa (GSH) također je važan antioksidans u stanicama sisavaca. Svaki put dok reagira s nekom od reaktivnih kisikovih vrsta prelazi u oksidirani oblik glutationa (GSSG), te je jako važna glutation reduktaza koja ga ponovno reducira u GSH. Mi smo u našem istraživanju dobili da je koncentracija GSH manja u skupini $AlCl_3$ + D-gal u odnosu na kontrolu (Slika 17.). Razlog navedenom je brza potrošnja GSH u neutralizaciji radikala ROS-a i nemogućnost dostatne sinteze zbog visoke koncentracije ROS-a. Ali moguće i da su reaktivne kisikove vrste dovele do modifikacije gena koji kontroliraju njegovu ekspresiju, što navode kao mogućnost Naidu i sur. (2013) u svojem radu. Povećana količina ROS-a i smanjena koncetracija GSH vjerojatno su dovele do pojačane lipidne peroksidacije u skupini $AlCl_3$ + D-gal (Slika 15.) čiji je konačni proizvod povećanje koncentracije MDA. MDA pripada u sekundarne glasnike lipidne peroksidacije, te služi kao biomarker oksidacijskog stresa (Hacioglu i sur. 2016). Povećanje MDA prati i statistički značajno ($P< 0,05$) povećanje

koncentracijae proteinskih karbonila u skupini $AlCl_3$ + D-gal. To također ukazuje na povećanu koncentraciju ROS-a u mozgu. Naime ROS kao vrlo reaktivne molekule lako dovode do nespecifične oksidacije proteina koja ima negativan učinak na njihovu strukturu i funkciju. U oksidaciju proteina ubrajamo cijepanje polipeptidnih lanaca, modifikaciju postranih lanaca aminokiselina i prelazak proteina u derivate jako osjetljive na proteolitičku razgradnju. Navedene promjene doprinose i promjeni funkcije pojedinih proteina kao i poremećaju signalnih puteva (Oršolić i sur. 2016).

Derivati karbonila mogu nastati na više načina ali najčeće nastaju u reakcijama kataliziranim s metalima (MCO, engl. *metal catalyzed oxidation*). U MCO reakcijama na specifične aminokiseline postranih lanaca proteina vežu se oksidirani lipidi ili šećeri koji sadrže karbonilnu skupinu. Istraživanja su pokazala da su prolin, arginin i lizin među najvažnijim metama MCO reakcija. Oksidacijom arginina i prolina nastaje glutaminski semialdehid, a oksidacijom lizina aminoadipinski semialdehid. To su ujedno dva kvantitativno najvažnija produkta reakcije karbonilacije (Requena i sur. 2003).

Koncentracije NO mjerili smo u prefrontalnoj kori, kori, malom mozgu, te u cijelom mozgu (Slika 26.). Bez obzira o kojoj je regiji riječ svugdje smo dobili veću koncentraciju NO u odnosu na kontrolnu skupinu, ali statistički značajno ($P < 0,05$) povećanje bilo je samo u prefrontalnoj kori koja je jako važna u pamćenju i učenju (Siddiqui i sur. 2008). Do pojačanog stvaranja ROS-a vjerojatno je došlo jer je $AlCl_3$ prošao krvo-moždanu barijeru kao L-glutamatni kompleks, te se taložio u mozgu kao što je to bio slučaj u radu Naidia i suradnika (2013).

Prisutnost neuroupale utvrdili smo određivanjem koncentracije proupalnih citokina, aktivnosti arginaze 1 i relativnim indeksom mozga. Kod $AlCl_3$ + D-gal skupine bila je veća koncentracija proupalnih citokina, posebno IL-1β, IL-6, i INF-γ, ali zapaženo je i povećanje antiupalnih citokina kao što su IL-10 i IL-13 (Slika 24.). Na temelju koncentracija citokina možemo pretpostaviti kako su u mozgu u najvećoj mjeri prevladavale M1, M2b i M2c aktivirane mikroglija- stanice. M1 aktivirani oblik mikroglija- stanica karakterizira stvaranje proupalnih citokina (IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, TNFα). M2b oblik obilježava velika količina arginaze, IL-1β, IL-6 i TNFα, te mala količina IL-12, a M2c velike količine IL-10 (Latta i sur. 2015). Istraživanjima je pokazano da izlaganje mikroglije $A\beta_{42}$ dovodi do povećanog lučenja proupalnih citokina IL-1β, IL- 6 i TNFα, te MIP-1α i M-CSF-a (Heneka i sur. 2015), pa je

moguće da su i nakupine Aβ, uz ROS te koje su pojačano aktivirale mikroglija-stanice u mozgu skupine štakora obrađene s $AlCl_3$ + D-gal.

Arg 1 se često koristi kao marker M2 aktiviranih mikroglija-stanica. Arg 1 u najvećoj mjeri je izražen kod mikroglije, ali mogu ga proizvoditi i druge stanice primjerice neutrofili. Arg 1+ mikroglija doprinosi razgradnji Aβ plakova za vrijeme IL-1β neuroupale. M1 mikroglija slabo fagocitira Aβ, neka su istraživanja pokazala da mogu uvući Aβ, ali ga ne mogu dovoljno razgraditi. Redukcija plakova je primijećena samo kad su bile prisutne Arg+ stanice. *In vivo* je primijećeno i da povećana razina Arg 1 i smanjena razina iNOS-a dovodi do povećane fagocitoze. Ne zna se zašto je to točno tako, no M2 aktivirane mikroglija- stanice inducirane s IL-4 imaju niži pH u lizosomima, što im vjerojatno daje veći proteolitički kapacitet (Cherry i sur. 2015). S obzirom da smo dobili statistički značajno veću ($P < 0,01$) aktivnost arginaze 1 u $AlCl_3$ + D-gal skupini možemo zaključiti da je u mozgu bilo dosta M2b stanica. Odnosno da je mikroglija bila aktivirana upravo u tom obliku jer su postojali Aβ plakovi koje je trebalo razgraditi. Međutim, čini se da upalna i protuupalna svojstva mikroglije nisu strogo ograničena samo na M1 ili M2 polarizirane stanice; umjesto toga, M1 i M2 mikroglia-stanice su samo na ekstremnim krajevima spektra mikroglialnih fenotipa (Mosser i Edwards 2008), jer većina nedavnih dokaza pokazuje da je mješoviti fenotip M1/M2 realniji (Sudduth i sur. 2013) na što upućuju i naši podaci (Slike 24. i 25.). Međutim, tamo gdje cijela populacija mikroglija-stanica prvenstveno podržava upalu proizvodnjom proupalnih medijatora, smatra se da bi mogla diktirati ishode bolesti u odnosu na populaciju koja prvenstveno proizvodi protuupalne medijatore (Kigerl i sur. 2009).

Relativni indeks mozga je veći u $AlCl_3$ + D-gal skupine. Razlog tome je vjerojatno neuroupala koja je bila prisutna u mozgu. ROS koji je nastao zbog injiciranja $AlCl_3$ i D-galaktoze, pokrenuo je neuroupalu za vrijeme koje je došlo do stvaranja velikog broja proupalnih medijatora, ali i nakupljanja stanica, te do nastanka edema. Sve to pridonijelo je povećanju mase mozga kod obrađenih životinja.

Ono što se još primjećuje nakon svih ovih analiza jest da je kora mozga podložnija oksidacijskom stresu i nakupljanju Aβ plakova. Naime kod analize koncentracije NO najveća koncentracija je bila u prefrontalnoj kori, dok je najveći broj plakova zabilježen u prefrontalnoj kori i kori općenito što ukazuje na prisutnost ROS-a, posebice $O_2^{\bullet -}$ koji reagira s NO i stvara peroksinitrite ($ONOO^-$), kojima je poluživot 0,9 s. Stabilnost NO omogućava njegovo prolaženje kroz staničnu membranu i prijenos signala u stanicama. NO se uklanja

konjugacijom pomoću glutationa; niske razine glutationa dovode do starenja moždanih stanica, a prekomjerna razina NO može nitrozilirati proteine, te dovesti do njihove disfunkcije ili reagirati s drugim reaktivnim molekulama pri čemu nastaju RNS. Peroksinitriti zajedno s drugim reaktivnim dušikovim vrstama (RNS) nastalim od dušikovog monoksida (NO), primjerice, dušikovim dioksidom (NO_2 ·) i nitritnom kiselinom (HNO_2) mogu prouzročiti veći citotoksični učinak od HO· i O_2 ·⁻ jer imaju duži poluživot, na to ukazuju i naši rezultati (Slike 26., 22., 23.). Ipak pri normalnim fiziološkim koncentracijama, NO ima ulogu unutarstaničnog glasnika za gvanilat ciklazu i protein kinazu.

5. ZAKLJUČAK

Temeljem dobivenih rezultata možemo zaključiti:

1. $AlCl_3$ i D-galaktoza uzrokuju oksidativni stres u mozgu
   a) Povećavaju lipidnu peroksidaciju (MDA)
   b) Povećavaju karboksilaciju proteina
   c) Povećavaju koncentraciju NO
   d) Posljedično dovode do povećane aktivnosti SOD i CAT, te smanjene koncentracije GSH
2. Budući da uzrokuju oksidativni stres dovode i do razvoja neuroupale
   a) Preko slobodnih radikala koje stvaraju aktiviraju mikroglija-stanice koje ovisno o tipu aktivacije stvaraju različite upalne medijatore
   b) Nakupljanje stanica imunološkog sustava i medijatora upale dovodi do svaranja edema na što ukazuje i relativni indeks mozga
3. Preko oksidativnog stresa i neuroupale $AlCl_3$ i D-galakotoza potpomažu razvoju obilježja Alzheimerove bolesti
   a) Potiču stvaranje i nakupljanje Aβ
   b) Smanjivanjem koncentracije BDNF-a remete normalnu funkciju mozga
   c) Utječući na aktivnost acetilkolinesteraze remete prijenos akcijskog potencijala

6. LITERATURA

1. Aebi H. (1984): Catalase in vitro. Methods Enzymology **105**: 121-6.

2. Alzheimer's Association (2014): Alzheimer's disease facts and figures. Alzheimer's & Dementia **10**: 2.

3. Babusikova E., Evinova a., Hatok J., Dobrota D., Jurecekova J. (2013): Oxidative changes and possible effects of antioxidant enzymes in neurodegenerative disease. U: Kishore U. Neurodegenerative disease. London, InTech, str. 421- 455.

4. Bharathi, Vasudevaraju P., Govindaraju M., Palanisamy A. P., Sambamurti K., Rao K. S. J. (2008): Molecular toxicity of aluminium in relation to neurodegeneration. Indian Journal of Medical Research **128**: 545-556.

5. Binder D. K., Scharfman H. E. (2004): Brain-derived neurotrophic factor. Growth Factors **22**: 123- 131.

6. Birben E., Sahiner U.M., Sackesen C., Erzurum S., Kalayci O. (2012): Oxidative stress and antioxidant defense. WAO Journal **5**: 9-19.

7. Bird T.D. (2008): Genetic aspects of Alzheimer disease. Genetics in medicine 1**0**(4): 231-239.

8. Chauhan V., Chauhan A. (2006): Oxidative stress in Alzheimer's disease. Pathophysiology **13**: 195-208.

9. Chen P., Miah M. R., Aschner M. (2016): Metals and neurodegeneration. F1000 Research **5**: 366.

10. Cherry J. D., Olschowka J. A., O'Banion M. K. (2015): Arginase 1+ microglia reduce Aβ plaque deposition during IL-1β- dependent neuroinflammation. Journal of Neuroinflammation **12**: 203.

11. Dillon C., Leguizamon P. P., Heisecke S., Castro D. M., Camelo J. L., Lon L., Serrano C. M., Guelar V., Taragano F. E. (2016): Biomarkers in mild stages of Alzheimer's disease: utility in clinical practice and their relation with nutritional and lifestyle factors. Functional Foods in Health and Disease **6**: 627-649.

12. Di Meo S., Reed T. T., Venditti P., Victor V. M. (2016): Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions. Oxidative Medicine and Cellular Longevity **2016**: 44.

13. Dong S., Duan Y., Hu Y., Zhao Z. (2012): Advances in the pathogenesis of Alzheimer's disease: a re-evaluation of amyloid cascade hypothesis. Translational Neurodegeneration **1**: 18.

14. Duan Y., Dong S., Gu F., Hu Y., Zhao Z. (2012): Advances in the pathogenesis of Alzheimer's disease: focusing on tau-mediated neurodegeneration. Translational Neurodegeneration **1**: 24.

15. Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V. Jr., Featherstone R. M. (1961): A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology **7**: 88-95.

16. Finkel T. (2011): Signal transduction by reactive oxygen species. The Journal of Cell Biology **194**: 7-15.

17. Finosh G. T., Jayabalan M. (2013): Reactive oxygen species- Control and management using amphiphilic biosynthetic hydrogels for cardiac applications. Advances in Bioscience and Biotechnology **4**: 1134- 1146.

18. Heneka M. T., Carson M. J., Khoury J. E. et al. (2015): Neuroinflammation in Alzheimer's disease. The Lancet Neurology **14**: 388-405.

19. Hippius H., Neundörfer G. (2003): The discovery of Alzheimer's disease. Dialogues in Clinical Neuroscience **5**:101-108.

20. Hua X., Lei M., Zhang Y., Ding J., Han Q., Hu G., Xiao M. (2007): Long-term D-galactose injection combined with ovariectomy serves as a new rodent model for Alzheimer's disease. Life Sciences **80**: 1897-1905.

21. Iqbal K., Liu F., Gong C., Grundke-Iqbal I. (2010): Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. Current Alzheimer Research **7**: 656-664.

22. Islam M. T. (2017): Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. Neurological Research **39**: 73-82.

23. Kawahara M., Kato-Negishi M. (2011): Link between aluminium and the pathogenesis of Alzheimer's disease: the integration of the aluminium and amyloid cascade hypotheses. International Journal of Alzheimer's Disease **2011**: 17.

24. Kigerl K. A., Gensel J. C., Ankeny D. P., Alexander J. K., Donnelly D. J., Popovich P. G. (2009): Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. Journal of Neuroscience **29**: 13435- 13444.

25. LaFerla F. M., Green K. N. (2012): Animal models of Alzheimer disease. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine **2**: a006320.

26. Latta C. H., Brothers H. M., Wilcock D. M. (2015): Neuroinflammation in Alzheimer's disease; a source of heterogeneity and target for personalized therapy. Neuroscience **302**: 103-111.

27. Levine R. L. (2002): Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging and disease. Free Radical Biology & Medicine **32**: 790- 796.

28. Maes M., Galecki P., Chang Y.S., Berk M. (2011) A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry **35**: 676-692.

29. Mohandas E., Rajmohan V., Raghunath B. (2009): Neurobiology of Alzheimer's disease. Indian Journal of Psychiatry **51**: 55- 61.

30. Mosser D. M., Edwards J. P. (2008): Exploring the full spectrum of macrophage activation. Nature Reviews Immunology **8**: 958-969.

31. Murphy M. P., LeVine III H. (2010): Alzheimer's disease and the β-amyloid peptide. Journal of Alzheimer's disease **19**: 1-17.

32. Oršolić N., Kunštić M., Kukolj M., Gračan R., Nemrava J. (2016): Oxidative stress, polarization of macrophages and tumour angiogenesis: Efficacy of caffeic acid. Chemico-Biological Interactions **256**: 111-124.

33. Picciotto M.R., Higley M.J., Mineur Y.S. (2012): Acetycholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. Neuron **74**: 116- 129.

34. Requena J. R., Levine R. L., Stadtman E. R. (2003): Recent advances in the analysis of oxidized proteins. Amino Acids **25**: 221-226.

35. Ristov A. A. (2007): Metode u molekularnoj biologiji. Institut Ruđer Bošković, Zagreb

36. Said M. M., Abd Rabo M. M. (2017): Neuroprotective effects of eugenol against aluminium- induced toxicity in the rat brain. Archives of Industrial Hygiene and Toxicology **68**: 27- 37.

37. Serpell L. C. (2000): Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly. Biochimica et Biophysica Acta **1502**: 16-30.

38. Shwe T., Pratchayasakul W., Chattipakorn N., Chattipakorn S. C. (2017): Role of D-galactose-induced brain aging and its potential used for therapeutic interventions. Experimental Gerontology

39. Siddiqui S. V., Chatterjee U., Kumar D., Siddiqui A., Goyal N. (2008): Neuropsychology of prefrontal cortex. Indian Journal of Psychiatry **50**: 202- 208.

40. Sudduth T. L., Greenstein A., Wilcock D. M. (2013): Intracranial injection of gammagard, a human IVIg, modulates the inflammatory response of the brain and lowers Aβ in APP/PS1 mice along a different time course than anti- Aβ antibodies. Journal of Neuroscience **33**: 9684- 9692.

41. Tietze F. (1969): Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. Analytical Biochemistry **27**: 502- 522.

42. Turgut G., Enli Y., Kaptanoglu B., Turgut S., Genc O. (2006): Changes in the levels of MDA and GSH in mice serum, liver and spleen after aluminium administration. Eastern Journal of Medicine **11**: 7-12.

43. Uttara B., Singh A. V., Zamboni P., Mahajan R. T. (2009): Oxidative stress an neurodegenerative disease: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. Neuropharmacology **7**: 65-74.

44. Vandal M., Bourassa P., Calon F. (2015): Can insulin signaling pathways be targeted to transport Aβ out of the brain? Frontiers in Aging Neuroscience **7**: 114.

45. Xiao F., Li X., Zhang X., Hou J., Lin L., Gao Q., Luo H. (2011): Combined administration of D-galactose and aluminium induces Alzheimer-like lesions in brain. Neuroscience Bulletin **27**: 143-155.

46. Yamada K., Nabeshima T. (2000): Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs. Pharmacology & Therapeutics **88**: 93-113.

47. Yi J., Horky L. L., Friedlich A. L., Shi Y., Rogers J. T., Huang X. (2009): L-arginine and Alzheimer's disease. International Journal of Clinical and Experimental Pathology **3**: 211-238.

48. Yuan C., Lee Y., Hsu G. W. (2012): Aluminium overload increases oxidative stress in four functional brain areas of neonatal rats. Journal of Biomedical Science **19**: 51.

49. Zhang Q., Zhang F., Ni Y., Kokot S. (2015): Effects of aluminum on amyloid-beta aggregation in the context of Alzheimer's disease. Arabian Journal of Chemistry X: XX-XX.

50. Zimmer E. R., Leuzy A., Benedet A. L., Breitner J., Gauthier S., Rosa-Neto P. (2014): Tracking neuroinflammation in Alzheimer's disease: the role of positron emission tomography imaging. Journal of Neuroinflammation **11**: 120.

51. Øvrevik J., Refsnes M., Låg M., Holme J. A., Schwarze P. E. (2015): Activation of proinflammatory responses in cells of the airway mucosa by particulate matter: oxidant- and non-oxidant-mediated triggering mechanisms. Biomolecules **5**: 1399-1440.

SLIKE S INTERNETA

52. https://www.biolegend.com/tau

7. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Anamarija Mojzeš

Datum rođenja: 16. 07. 1993., Virovitica (Hrvatska)

Adresa: Ljudevita Gaja 298, 33405 Pitomača

Obrazovanje:

2015.- 2018. Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu – Biološki odsjek, diplomski studij Eksperimentalna biologija, smjer: Fiziologija i imunobiologija

2012.- 2015. Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu – Biološki odsjek, preddiplomski studij Biologije

2008.- 2012. Katolička klasična gimnazija s pravom javnosti u Virovitici

Laboratorijska stručna praksa:

- 2016. Institut Ruđer Bošković, Zavod za molekularnu medicinu, Laboratorij za istraživanje neurodegenerativnih bolesti (pod vodstvom doc.dr.sc. Silve Katušić Hećimović)

- 2015. PMF - Biološki odsjek, Zavod za animalnu

  fiziologiju (pod vodstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić)

Sažeci u zbornicima skupova:

Ledinski M., Oršolić N., Kukolj M., Odeh D., Mojzeš A., Uroić K., Pavunc L., Pamučar B., Nikolić B., Mateševac J., Paparić E., Mišić A., Đirlić N., Gaćina L. „ Analysis of intestine microbiome in the Alzhemer's didease rat model“ 2017 Annual Meeting of Croatian Immunological Society, Zagreb 20.-21.10.2017.

Radno iskustvo:

2015., 2016., 2017. – razni studentski poslovi