

Modulacija crijevnoga mikrobioma kvercetinom u štakorskomu modelu Alzheimerove bolesti

Kukolj, Marina

Doctoral thesis / Disertacija

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:707173>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-18**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Marina Kukolj

**MODULACIJA CRIJEVNOGA
MIKROBIOMA KVERCETINOM U
ŠTAKORSKOMU MODELU
ALZHEIMEROVE BOLESTI**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2020.



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Marina Kukolj

**MODULACIJA CRIJEVNOGA
MIKROBIOMA KVERCETINOM U
ŠTAKORSKOMU MODELU
ALZHEIMEROVE BOLESTI**

DOKTORSKI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Nada Oršolić

Zagreb, 2020.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Marina Kukolj

**MODULATION OF INTESTINAL
MICROBIOME WITH QUERCETIN IN THE
RAT MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor: Nada Oršolić, PhD, Full Professor

Zagreb, 2020

Ovaj je doktorski rad izrađen u *Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu*, pod vodstvom *prof. dr. sc. Nade Oršolić*, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog dokorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Rad je dijelom financiran iz projekta *Analiza crijevnog mikrobioma u štakorskom modelu Alzheimerove bolesti* (2017. / br. projekta 20282313) Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu (voditelj: *prof. dr. sc. Nada Oršolić*).

Dio rada financiran je u sklopu projekta *Hiperfosforilacija, agregacija i transsinaptički prijenos tau proteina u Alzheimerovoj bolesti: analiza likvora i ispitivanje potencijalnih neuroprotektivnih spojeva* (MB HRZZ IP 2014 09 9730) te izrađen u *Laboratoriju za razvojnu neuropatologiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga u Zagrebu*, uz stručnu pomoć voditelja projekta *prof. dr. sc. Gorana Šimića* i kolegice *Lee Langer Horvat, mag. biol. mol.*

INFORMACIJE O MENTORU: dr. sc. Nada Oršolić, profesor u trajnom zvanju

Dr. sc. Nada Oršolić rođena je 1960. godine u Tolisi (Orašje), BiH gdje je završila osnovnu školu i gimnaziju. Diplomirala je 1984. na smjeru Biologija s ekologijom te 1985. na profesorskom smjeru Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Na istom je fakultetu magistrirala 1991. (smjer Molekularna biologija) s radom „Karakteristike progenitora B-limfocita induktora kimerizma u miševa CBA/N” (voditelj prof. dr. sc. Dušan Volf) i doktorirala 1999. s radom „Protutumorski učinci pčelinjeg otrova i propolisa” (voditelj prof. dr. sc. Ivan Bašić). Boravila na postdoktorskom usavršavanju u MD Anderson Cancer Center (Department of Leukemia), Division of Cancer Medicine, Houston, Texas (2001.-2002.). Zaposlena u Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu od 1987. do danas (08. ožujka 2016. izbor u trajno zvanje redoviti profesor).

Nastavna djelatnost (nositelj kolegija)

Preddiplomski studij: Animalna fiziologija, Laboratorijske životinje u biološkim istraživanjima; **Inegrirani preddiplomski i diplomski sveučilišni studij Biologija i kemija:** Biologija tumora, Imunologija; **Diplomski studij:** Imunologija i imunogenetika, Komparativna imunologija, Imunologija tumora i metastaza, Opća onkologija, Molekularna Onkologija, Metode u imunologiji, Fiziologija oksidativnog stresa u ljudi i životinja, Fiziološki mehanizmi toksina; **Postdiplomski studij:** Kemoprevencija i bioterapija tumora, Mutageni i antimutageni, Animalni modeli glodavaca u eksperimentalnoj onkologiji.

Mentorstvo: voditelj završnih radova – 52; voditelj diplomskih radova – 207; voditelj radova za nagradu Rektora – 7; voditelj magistarskih radova – 6; voditelj specijalističkog rada – 1; voditelj doktorskih radova – 17.

Znanstveni projekti: nositelj istraživanja – 3; voditelj istraživanja – 1; nositelj projekta – 5; suradnik na projektu – 6.

Znanstvena aktivnost: 169 radova (CC – 74, SCI – 23, druge baze 60, editor 1 knjige) 116 domaćih i 103 internacionalnih kongresnih sažetaka.

Članstvo u znanstvenim organizacijama i tijelima: Hrvatskog imunološkog društva; Hrvatskog fiziološkog društva; Hrvatskog društva za znanost o laboratorijskim životinjama; Hrvatskog biološkog društva. **Član uredničkog tima za časopise:** Journal of api product and api medical science; Bioinfo publications, Advances in bioscience and clinical medicine; Molecular and experimental biology in medicine.

Ovaj rad posvećujem mojoj majci i zahvaljujem joj na bezuvjetnoj ljubavi, molitvama te nesebičnoj podršci i žrtvi tijekom svih godina studija.

„Prava snaga se ne mjeri po tome koga si pobijedio, nego po tome koliko si ljudi zaštitio, ohrabrio i utješio. Jak si onda kada naučiš nikoga ne povrijediti.“ (NN)

Zahvaljujem prof. dr. sc. Nadi Oršolić na mentorstvu i stručnom vodstvu tijekom studija, nesebičnoj pomoći tijekom izrade doktorske disertacije, na prenošenju znanja i iskustva, beskrajnom strpljenu, uloženom vremenu i uvažavanju mojih prijedloga.

Zahvalu upućujem svim profesorima, znanstvenicima i suradnicima Zavoda za animalnu fiziologiju Biološkog odjeka PMF-a u Zagrebu na konstruktivnim savjetima i stručnoj pomoći. Posebno zahvaljujem doc. dr. sc. Duji Lisičiću, dr. sc. Anici Horvat Knežević i doc. dr. sc. Sofiji Blažević za savjete i nesebičnu pomoć u radu s animalnim modelima. Pisana riječ je premalo da bih izrazila zahvale Mariji Potočić jer neki ljudi jednostavno uđu u naš život kao blagoslov.

Ovo putovanje je obogaćeno susretom i radom s kolegama koji su otvorili vrata svojih laboratorija i sa mnom nesebično podijelili svoje bogato znanje. Rad sa svima vama je bio inspirativan i u vama prepoznah veličinu čovjeka u njegovoj jednostavnosti i skromnosti. Stoga zahvaljujem prof. dr. sc. Goranu Šimiću, kolegicama Lei Langer Horvat i Eni Španić s HIIM-a u Zagrebu; doc. dr. sc. Romani Gračan i Zrinki Benčina sa Zoologijskog zavoda Biološkog odjeka PMF-a u Zagrebu; dr. sc. Branku Šoštariću, dr. sc. Karmen Branović Čakanić, Mihaeli Stuparić Komušar, dr. sc. Dunji Vlahović i dr. sc. Svjetlani Terzić s Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu; timu prof. dr. sc. Jagode Šušković iz Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura PBF-a u Zagrebu; prof. dr. sc. Jasni Hrenović sa Zavod za mikrobiologiju Biološkog odjeka PMF-a u Zagrebu te dr. sc. Tatjani Orct iz Jedinica za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam IMI-a u Zagrebu. Posebne zahvale prof. dr. sc. Ivanu Kosalecu sa Zavod za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na dugogodišnjoj suradnji i bezuvjetnoj podršci.

Najveće zahvale kolegicama s ORL Klinike KBC-a Zagreb bez čije podrške, prijateljstva, strpljena i pomoći ovo školovanje bi bilo neizvedivo („Give the world the best you have, and it may never be enough; give the world the best you’ve got anyway.”MT).

S ljubavlju zahvaljujem svojoj braći i prijateljima koji su uvijek tu te su izvor zdravoga razuma, vjere, svega dobrog i pozitivnog i u najtežim trenutcima. Veliko hvala Ivani Zrinščak, Dyani Odeh, Barbari Nikolić, Anamariji Mojzeš i Maji Ledinski koje su neumorno i nesebično radile sa mnom u realizaciji ovoga istraživanja.

I na kraju, veliko hvala dr. sc. Lipi Čičin-Šain, prof. dr. sc. Jasminki Štefulj te kolegicama Marini Horvatiček i Petri Baković iz Laboratorija za neurokemiju i molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković na motivaciji i razumijevanju tijekom pisanja ovoga rada.

**MODULACIJA CRIJEVNOGA MIKROBIOMA KVERCETINOM U
ŠTAKORSKOMU MODELU ALZHEIMEROVE BOLESTI**

MARINA KUKOLJ

Zavod za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu

SAŽETAK

Cilj rada bio je ustanoviti poveznicu između narušene osi crijevna mikrobiota-crijeva-mozak (GBA) i primjene funkcionalne hrane u održavanju mikrobne homeostaze i funkcije središnjeg živčanog sustava (CNS-a) u štakorskomu modelu Alzheimerove bolesti (AD). Rezultati ukazuju da kvercetin, kao funkcionalna sastavnica hrane, uspješno modulira narušene homeostatske i neuropatološke posljedice primjene aluminijevog klorida i D-galaktoze tijekom 28 dana: uspješno regulira razinu oksidacijskog stresa i antioksidanata vodeći do izravne zaštite neurona; inhibirajući aktivnost AChE smanjuje agregaciju $A\beta$; održava razinu BDNF povećavajući preživljavanje, rast i diferencijaciju živčanih stanica; smanjuje razinu nitrita, aktivnosti arginaze i proupalnih citokina regulirajući imunoreaktivnost mikroglia stanica i neuroupalu; održava mikrobnu homeostazu i cjelovitost crijevnoga endotela vodeći očuvanju homeostatskih procesa u CNS-u. Višestruki učinci kvercetina potvrđuju da kvercetin jest funkcionalna sastavnica hrane te može biti primijenjen kao alternativni ne-farmaceutski pristup u održavanju zdravlja i dobrobiti crijeva. Promicanjem crijevne mikrobne homeostaze kvercetin omogućuje održavanje funkcionalnosti CNS-a te cjelokupnog organizma.

Rad sadrži: 271 stranicu, 54 slike, 16 tablica, 595 literaturnih navoda, jezik izvornika hrvatski

Ključne riječi: crijevna mikrobiota, disbioza, aluminijev klorid, kvercetin, Alzheimerova bolest, oksidacijski stres, neuroupala

Mentor: prof. dr. sc. Nada Oršolić

Ocjenjivači: prof. dr. sc. Jasna Hrenović

doc. dr. sc. Romana Gračan

dr. sc. Svjetlana Terzić, znanstvena savjetnica

Zamjena: prof. dr. sc. Goran Šimić

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral dissertation

**MODULATION OF INTESTINAL MICROBIOME WITH QUERCETIN IN THE
RAT MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE**

MARINA KUKOLJ

Division of Animal physiology, Department of Biology, Faculty of Science, Zagreb

ABSTRACT

The aim of this dissertation was to find a link between impaired intestinal microbiome-gut-brain axis (GBA) and the use of quercetin, a functional food component, in maintaining microbial homeostasis and function of central nervous system (CNS) in the rat model of Alzheimer's disease (AD). The results indicate that quercetin successfully modulated impaired homeostatic and neuropathological consequences of aluminium chloride and D-galactose administration over 28 days: it directly protected the neurons by regulating the level of oxidative stress and antioxidants; reduced $A\beta$ aggregation by inhibiting AChE activity; increased nerve cell survival, growth, and differentiation by maintaining BDNF levels; regulated the immunoreactivity of microglia and neuroinflammation by reducing the nitrite levels, arginase activity and proinflammatory cytokines; and maintained microbial homeostasis and intestinal endothelial integrity. The multiple effects confirm that quercetin can be applied as an alternative non-pharmaceutical approach in maintaining intestinal health and microbial homeostasis, which consequently affect the functioning of the CNS and the whole organism.

Ph.D. thesis contains: 271 pages, 54 figures, 16 tables, 595 references, original in Croatian

Key words: intestinal microbiome, dysbiosis, aluminum chloride, quercetin, Alzheimer's disease, oxidative stress, neuroinflammation

Supervisor: Nada Oršolić, PhD, Full Professor

Reviewers: Jasna Hrenović, PhD, Full Professor

Romana Gračan, PhD, Assistant professor

Svjetlana Terzić, PhD, Scientific Advisor

In lieu of: Goran Šimić, PhD, Full Professor

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. POČETNA HIPOTEZA RADA	4
1.2. GLAVNI CILJEVI RADA	4
2. LITERATURNI PREGLED	6
2.1. SREDIŠNJI ŽIVČANI SUSTAV SISAVACA I GLODAVACA.....	7
2.1.1. <i>Anatomska obilježja mozga sisavaca i glodavaca (štakora)</i>.....	7
2.1.2. <i>Histologija mozga</i>.....	13
2.1.3. <i>Histološki specifične regije</i>.....	15
2.1.4. <i>Povezane strukture</i>	19
2.2. ALZHEIMEROVA BOLEST.....	20
2.3. PATOGENEZA ALZHEIMEROVE BOLESTI.....	21
2.4. GENETIČKA OSNOVA ALZHEIMEROVE BOLESTI.....	24
2.4.1. <i>Geni uključeni u nasljedni oblik Alzheimerove bolesti</i>.....	24
2.4.2. <i>Geni uključeni u „sporadični” oblik Alzheimerove bolesti</i>.....	26
2.5. HIPOTEZA AMILOIDNE KASKADE	28
2.5.1. <i>γ-sekretaza</i>	29
2.5.2. <i>β-sekretaza</i>.....	30
2.5.3. <i>Razgradnja Aβ</i>.....	30

2.5.4.	<i>Neurotoksičnost amiloid β-peptida</i>	32
2.6.	TAU HIPOTEZA	33
2.6.1.	<i>Tau protein</i>	33
2.6.2.	<i>Neurotoksičnost proteina tau</i>	34
2.7.	KOLINERGIČNA HIPOTEZA	36
2.8.	OKSIDACIJSKA HIPOTEZA	38
2.8.1.	<i>Hipoteza mitohondrijske kaskade</i>	38
2.9.	HIPOTEZA NEUROUPALE	38
2.9.1.	<i>Mikroglia</i>	39
2.9.2.	<i>Astroglia</i>	41
2.9.3.	<i>Sustav komplementa</i>	42
2.9.4.	<i>Medijatori neuroupale</i>	42
2.10.	ANIMALNI MODELI U ISTRAŽIVANJU ALZHEIMEROVE BOLESTI	44
2.10.1.	<i>Transgenični animalni modeli</i>	44
2.10.2.	<i>Netransgenični animalni modeli</i>	45
2.10.3.	<i>Aluminijev klorid (AlCl₃) + D-galaktoza (D-gal): animalni model za AD</i>	46
2.11.	SLOBODNI RADIKALI I OKSIDACIJSKI STRES	49
2.11.1.	<i>Slobodni radikali i reaktivni spojevi</i>	49
2.11.2.	<i>Antioksidacijski sustav</i>	51
2.11.3.	<i>Oksidacijski stres i neuroupala</i>	52

2.12. ZNAČAJ MIKROBIOTE ZA LJUDSKI ORGANIZAM	53
2.12.1. <i>Uloga mikrobiote probavnog sustava u održavanju homeostaze</i>	<i>53</i>
2.12.2. <i>Os mikrobiota-crijeva-mozak.....</i>	<i>54</i>
2.12.3. <i>Propusnost crijevne barijere</i>	<i>56</i>
2.12.4. <i>Poveznica između propusnosti crijevne i krvno moždane barijere.....</i>	<i>58</i>
2.13. POLIFENOLI	59
2.13.1. <i>Flavonoidi</i>	<i>62</i>
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	70
3.1. MATERIJALI.....	71
3.1.1. <i>Pokusne životinje.....</i>	<i>71</i>
3.1.2. <i>Ispitne komponente</i>	<i>71</i>
3.2. METODE	72
3.2.1. <i>Eksperimentalni dizajn</i>	<i>72</i>
3.2.2. <i>Praćenje tjelesne mase pokusnih životinja.....</i>	<i>73</i>
3.2.3. <i>Uzorkovanje.....</i>	<i>73</i>
3.2.4. <i>Metode za utvrđivanje disbioze</i>	<i>74</i>
3.2.5. <i>Analiza esencijalnih i toksičnih elemenata u uzorku crijevnoga sadržaja, seruma i tkiva mozga metodom induktivno spregnute plazme s masenom spektrometrijom (engl. inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS)</i>	<i>80</i>

3.2.6. Metode za određivanje parametara oksidacijskog stresa i antioksidacijske zaštite u tkivu mozga.....	82
3.2.7. Metode utvrđivanja neuropatologije.....	89
3.2.8. Metode provjere neuroupale.....	94
3.2.9. Neurološki pregled jedinki (engl. neurological screening, NS).....	97
3.3. STATISTIČKA ANALIZA.....	98
4. REZULTATI.....	99
4.1. UČINAK SUBKRONIČNE PRIMJENE $AlCl_3$ + D-GAL I QU NA TJELESNU MASU POKUSNIH ŽIVOTINJA.....	100
4.2. PRAĆENJE UČINKA SUBKRONIČNE PRIMJENE $AlCl_3$ + D-GAL I QU NA CRIJEVNU DISBIOZU.....	101
4.2.1. Učinak subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na pH vrijednosti crijevnog sadržaja kolona.....	101
4.2.2. Određivanje glikolitičke aktivnosti enzima crijevne mikrobiote u uzorku izoliranom iz kolona.....	102
4.2.3. Učinak subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na rast probiotičkih kolonija na selektivnim podlogama i identifikacija roda <i>Lactobacillus</i>	104
4.2.4. Identifikacija sastava crijevne mikrobiote sekvenciranjem.....	105
4.2.5. Učinak subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na koncentraciju zonulina (ZON) u crijevnom sadržaju, serumu i tkivu mozga.....	111

4.3. PRAĆENJE UČINKA SUBKRONIČNE PRIMJENE $AlCl_3$ + D-GAL I QU NA REZULTATE ANALIZE ESENCIJALNIH I TOKSIČNIH ELEMENATA U SERUMU I TKIVU MOZGA METODOM INDUKTIVNO SPREGNUTE PLAZME S MASENOM SPEKTROMETRIJOM (ICP-MS)	113
4.4. PRAĆENJE UČINKA SUBKRONIČNE PRIMJENE $AlCl_3$ + D-GAL I QU NA PARAMETARA OKSIDACIJSKOG STRESA I ANTIOKSIDACIJSKE ZAŠTITE U TKIVU MOZGA	116
<i>4.4.1. Učinak subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na koncentraciju ukupnih proteina u tkivu mozga</i>	<i>116</i>
<i>4.4.2. Učinak subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na koncentraciju karboniliranih proteina (PC) u tkivu mozga.....</i>	<i>117</i>
<i>4.4.3. Učinak subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na lipidnu peroksidaciju (malondialdehid, MDA) u tkivu mozga.....</i>	<i>118</i>
<i>4.4.4. Učinak subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na enzimatsku aktivnost katalaze (CAT) u tkivu mozga.....</i>	<i>119</i>
<i>4.4.5. Učinak subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na ukupni glutation u tkivu mozga</i>	<i>120</i>
<i>4.4.6. Učinak subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na enzimatsku aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u tkivu mozga.....</i>	<i>121</i>
4.5. PRAĆENJE UČINKA SUBKRONIČNE PRIMJENE $AlCl_3$ + D-GAL I QU NA NASTANAK NEUROPATHOLOGIJE	122
<i>4.5.1. Neurohistopatološke promjene</i>	<i>122</i>

4.5.2. Učinak subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na koncentraciju moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF-a) u tkivu mozga.....	133
4.5.3. Učinak subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na aktivnost acetilkolinesteraze (AChE) u tkivu mozga.....	134
4.6. PRAĆENJE UČINKA SUBKRONIČNE PRIMJENE $AlCl_3$ + D-GAL I QU U NASTANKU NEUROUPALE.....	135
4.6.1. Učinka subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na relativni indeksa mozga 135	
4.6.2. Učinka subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na koncentraciju nitrita (NO_2) u tkivu mozga	136
4.6.3. Učinka subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na aktivnosti arginaze (Arg) u tkivu mozga.....	137
4.6.4. Učinka subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na proupalne i protuupalne citokine u tkivu mozga.....	137
4.7. PRAĆENJE UČINKA SUBKRONIČNE PRIMJENE $AlCl_3$ + D-GAL I QU NA MOTORIČKU I SENZORNU PERCEPCIJU KROZ NEUROLOŠKI PREGLED JEDINKI (ENGL. <i>NEUROLOGICAL SCREENING</i> , NS).....	139
5. RASPRAVA.....	140
5.1. PRAĆENJE UČINKA SUBKRONIČNE PRIMJENE $AlCl_3$ + D-GAL I QU NA TJELESNU MASU POKUSNIH ŽIVOTINJA.....	142

5.2. PRAĆENJE UČINKA SUBKRONIČNE PRIMJENE $AlCl_3$ + D-GAL I QU NA RAZVOJ CRIJEVNE DISBIOZE	145
5.2.1. Učinak subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na pH vrijednosti crijevnog sadržaja kolona	146
5.2.2. Učinak subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na glikolitičku aktivnost enzima crijevne mikrobiote u uzorku izoliranom iz kolona	148
5.2.3. Učinak subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na rast probiotičkih kolonija na selektivnim podlogama i identifikacija roda <i>Lactobacillus</i>	151
5.2.4. Identifikacija sastava crijevnoga mikrobioma sekvenciranjem	154
5.2.5. Učinak subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na koncentraciju zonulina (ZON) u crijevnom sadržaju, serumu i tkivu mozga	161
5.3. PRAĆENJE UČINKA SUBKRONIČNE PRIMJENE $AlCl_3$ + D-GAL I QU NA REZULTATE ANALIZE ESENCIJALNIH I TOKSIČNIH ELEMENATA U SERUMU I TKIVU MOZGA METODOM INDUKTIVNO SPREGNUTE PLAZME S MASENOM SPEKTROMETRIJOM (ICP-MS)	164
5.4. PRAĆENJE UČINKA SUBKRONIČNE PRIMJENE $AlCl_3$ + D-GAL I QU NA PARAMETARE OKSIDACIJSKOG STRESA I ANTIOKSIDACIJSKE ZAŠTITE U TKIVU MOZGA	167
5.4.1. Učinak subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na koncentraciju ukupnih proteina u tkivu mozga	168
5.4.2. Učinak subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na koncentraciju karboniliranih proteina (PC) u tkivu mozga	168

5.4.3. Učinak subkronične primjene $AlCl_3 + D-gal$ i <i>Qu</i> na lipidnu peroksidaciju (MDA) u tkivu mozga	169
5.4.4. Učinak subkronične primjene $AlCl_3 + D-gal$ i <i>Qu</i> na enzimatsku aktivnost katalaze (CAT) i superoksid dismutaze (SOD) u tkivu mozga	170
5.4.5. Učinak subkronične primjene $AlCl_3 + D-gal$ i <i>Qu</i> na ukupni glutation u tkivu mozga	171
5.5. PRAĆENJE UČINKA SUBKRONIČNE PRIMJENE $AlCl_3 + D-GAL$ I <i>QU</i> NA NASTANAK NEUROPATHOLOGJE	172
5.5.1. Neurohistopatološke promjene	172
5.5.2. Učinak subkronične primjene $AlCl_3 + D-gal$ i <i>Qu</i> na koncentraciju moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF- α) u tkivu mozga.....	177
5.5.3. Učinak subkronične primjene $AlCl_3 + D-gal$ i <i>Qu</i> na aktivnost acetilkolinesteraze (AChE) u tkivu mozga.....	178
5.6. PRAĆENJE UČINKA SUBKRONIČNE PRIMJENE $AlCl_3 + D-GAL$ I <i>QU</i> U NASTANKU NEUROUPALE.....	179
5.6.1. Učinka subkronične primjene $AlCl_3 + D-gal$ i <i>Qu</i> na relativni indeksa mozga	179
5.6.2. Učinak subkronične primjene $AlCl_3 + D-gal$ i <i>Qu</i> na koncentraciju nitrita (NO_2^-) u tkivu mozga	180

5.6.3. Učinak subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na aktivnosti arginaze (Arg) u tkivu mozga.....	181
5.6.4. Učinak subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na proupalne i protuupalne citokine u tkivu mozga.....	183
5.7. PRAĆENJE UČINKA SUBKRONIČNE PRIMJENE $AlCl_3$ + D-GAL I QU NA MOTORIČKU I SENZORNU PERCEPCIJU	184
6. ZAKLJUČAK.....	186
7. LITERATURA	190
8. POPIS OZNAKA I KRATICA	255
9. ŽIVOTOPIS	265

1. UVOD

Alzheimerova bolest (engl. *Alzheimer disease*, AD) je progresivna neurodegenerativna bolest središnjeg živčanog sustava (engl. *central nervous system*, CNS) koju karakterizira propadanje sinapsi i neurona kortikalnih i subkortikalnih regija mozga te narušavanje funkcije neuroprijenosnih sustava (1, 2). Propadanje sinapsi i neurona posljedično izaziva narušavanje kognitivnih funkcija, gubitak pamćenja, promjene ponašanja kao što su agresivnost i depresivno ponašanje (3), a napredovanjem bolesti simptomi mogu doseći stadij u kojem oboljeli nisu u stanju obavljati svakodnevne aktivnosti (2).

Nijedan od predloženih mehanizama Alzheimerove bolesti (AD) u potpunosti ne objašnjava obrasce raspodjele neuropatoloških promjena na staničnoj i regionalnoj razini, kao ni njihovo kliničko međudjelovanje (2). Jedno gledište ovog problema leži u složenom genetskom, epigenetskom i okolišnom okruženju AD-a: rani početak AD često je povezan s autosomno dominantnim nasljeđivanjem, dok je kasni AD s alelom $\epsilon 4$ APOE gena koji kodira apolipoprotein E za koji se zna da povećava rizik za nastanak AD 5-20 puta s djelomičnim prodorima. Mehanizmi kojima genetske varijante i čimbenici okoliša (široko dostupni neurotoksični spojevi aluminija i prehrana bogata mastima/siromašna vlaknima) utječu na razvoj patoloških AD promjena, posebno neurofibrilarne degeneracije, još nisu poznati (2).

Nasljedni (5%) i sporadični (95%) oblici AD dijele zajednički fenotip koji uključuje neke zajedničke značajke, a to su: nekontrolirani oksidacijski stres (engl. *oxidative stress*, OS), pojačana proupalna signalizacija, promjene u urođenom imunosnom signaliziranju, progresivno nakupljanje neurofibrilarnih lezija (koje sadrže hiperfosforilirane agregate proteina tau, engl. *neurofibrillary tangles*, NFTs) i beta-amiloidnih plakova ($A\beta$), smanjenje sinaptičke signalizacije, atrofija moždanih stanica, progresivna promjena genske ekspresije koja je drugačija od uobičajenog mozga osobe koja stari, progresivna demencija i gubitak kognitivnih funkcija (4).

Starenje je najznačajniji rizični čimbenik za razvoj bolesti, učestalost demencije raste sa starošću, 1% slučajeva demencije javlja se u dobi između 60 i 64 godina nakon čega slijedi gotovo eksponencijalni porast (5). AD je najčešći primarni uzrok sindroma demencije te čini 60-70% od 35,6 milijuna dijagnosticiranih slučajeva demencije u svijetu (2). Procjenjuje se da će se taj broj udvostručiti do 2050., stoga je Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*, WHO) u 2012. godini AD proglasila globalnim prioritetom u javnom zdravstvu (2). Još uvijek ne postoji učinkovit način za sprječavanje ili liječenje AD, trenutno odobreni lijekovi samo u određenoj mjeri ublažavaju neke simptome bolesti. Američka uprava

za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) do sada je odobrila samo pet spojeva. Četiri inhibitora acetilkolinesteraze - kolinomimetici (takrin, rivastigmin, donepezil i galantamin) i jednog antagonista glutamata - memantina, antagonist N-metil-D-aspartat receptora, NMDAR (6).

Nedavno je prepoznata uloga crijevne mikrobiote u regulaciji neurokemijskih i neuro-metaboličkih putova putem osi mikrobiota-crijeva-mozak (engl. *gut-brain axis*, GBA) (3). Budući da je starija dob najvažniji rizični čimbenik za AD, promjene u tijelu do kojih dolazi starenjem mogle bi imati ulogu u razvoju AD i stoga su važne za buduća proučavanja. Većina promjena opaženih u AD, kao što su upala, atrofija moždanih stanica, imunološke aberacije, amiloidogeneza, promijenjena ekspresija gena i kognitivni deficit, također se vide kao posljedica crijevne disbioze (7-10).

Temeljem navedenog pravilna prehrana može utjecati na strukturne i funkcionalne promjene crijevne mikrobiote te sudjelovati u održavanju homeostaze CNS-a kao i cjelokupnog organizma. Pokazano je da flavonoidi, uključujući kvercetin, mogu ispoljiti svoj neuroprotektivni učinak ne samo kroz smanjenje reaktivnih kisikovih spojeva (engl. *reactive oxygen species*, ROS) i povećanje unutarstaničnog glutationa, nego i modulacijom aktivnosti brojnih proteina i lipidnih kinaza (PtdIns, 3K/Akt, PKC i MAPK), PLA2, COX i LOX u prijenosnom signalnom putu (11, 12). Flavonoidi također inhibiraju NADPH oksidaze i ksantin oksidaze (13, 14, 15), potiču aktivnosti antioksidacijskih enzima (superoksid-dismutaza, glutation peroksidaza i katalaze), potiskuju aktivaciju NF- κ B i aktiviraju prilagodbu staničnog odgovora na stres (16, 17, 18). Osim toga, flavonoidi formiraju kemijske komplekse s metalnim ionima (bakra, željeza, aluminijska i cinka) i prijelaznim metalima te inhibiraju proizvodnju ROS-a (19, 20).

Od svih flavonoida, kvercetin (Qu) je najbolji „čistač“ ROS-a, uključujući superoksidni anion, i reaktivnih dušikovih spojeva (engl. *reactive nitrogen species*, RNS) kao primjerice dušikov oksid i peroksinitrit. Ova protuoksidacijska sposobnost pripisuje se prisustvu hidroksilne skupine na poziciji 3-flavonola te dvije hidroksilne skupine na fenilnom prstenu (21). Kvercetin može biti i protuoksidans i prooksidans, ovisno o koncentraciji, pH, prisutnosti metala te o izvoru slobodnih radikala u stanici (22). Višestruka uloga kvercetina može pružiti obećavajući pristup u liječenju AD i drugih neurodegenerativnih bolesti povezanih s oksidacijskim stresom. Međutim, još uvijek nije istražen njegov utjecaj na modulaciju crijevne mikrobiote s utjecajem na središnji živčani sustav putem osi mikrobiota-crijevo-mozak što je zadaća ovoga rada.

1.1. Početna hipoteza rada

Kvercetin ima snažni antioksidacijski, protuupalni, i neuroprotektivni učinak na cijeli sustav domaćina, uključujući i moždane stanice. Nadalje, kvercetin kroz modulaciju mikrobiote crijevnog ekosustava (posebice povećanje probiotičkih rodova te smanjenje rodova „loših“ bakterija i njihove enzimske aktivnosti), antioksidacijski i protuupalni učinak može utjecati na očuvanje čvrstih okludin međustaničnih spojeva (ograničavaju prolazak vode, elektrolita i drugih molekula) unutar crijevnog epitela i krvno-moždane barijere te spriječiti prooksidacijske i neurotoksične posljedice aluminijevog klorida (AlCl_3) i D-galaktoze (D-gal) prema mozgu.

1.2. Glavni ciljevi rada

Cilj rada jest istražiti prooksidacijske, upalne i neurotoksične procese u štakorskom modelu Alzheimerove bolesti prouzročene davanjem AlCl_3 i D-gal te spoznati da li oksidacijski stres i upala prouzročena nazočnošću AlCl_3 i D-gal vode do narušavanje crijevne homeostaze i disfunkcije crijevne mikrobiote. Točnije, ako neravnoteža crijevne mikrobiote jest jedan od uzroka AD, tada primjenom potencijalno funkcionalne hrane bogate kvercetinom možemo modulirati crijevnu mikrobiotu i sačuvati domaćina od brojnih bolesti povezanih s poremećajem homeostaze crijevne mikrobiote. Temeljem navedenog, cilj jest istražiti sustavnu toksičnost AlCl_3 te učinkovitost flavonoida kvercetina na mikrobiotu probavnog sustava te iznaći poveznicu s neurodegenerativnim bolestima, posebice AD te spoznati važnost crijevne mikrobiote u održavanju zdravlja u ljudi te održavanju važnih homeostatskih procesa u CNS-u.

Specifične ciljevi rada jesu:

1. Istražiti prooksidacijsku, upalnu i neurotoksičnu ulogu AlCl_3 i D-gal u organizmu.
2. Istražiti povezanost oksidacijskog stresa i upale s promjenama i disfunkcijom crijevne mikrobiote i narušavanja crijevne homeostaze.
3. Istražiti učinak kvercetina na endogene probiotičke bakterije kolona, enzimsku aktivnost mikrobiote te posljedični tkivni i sustavni antioksidacijski, antigenotoksični, metabolički, upalni i imunosni odgovor domaćina.

4. Iznaci poveznicu između oksidacijskog stresa, neurodegenerativnih oštećenja mozga (broja beta-amiloidnih plakova) i mikrobioma, posebice sastava mikrobiote, enzimske aktivnosti te zaštitnih čimbenika kao neurotrofnog čimbenika rasa.

5. Iznaci funkcionalne sastojke hrane kao alternativni, ne-farmaceutski pristup u održavanju zdravlja i dobrobiti crijeva kroz promicanje crijevne mikrobne homeostaze što doprinosi održavanju funkcionalnosti CNS-a i cjelokupnog organizma.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Središnji živčani sustav sisavaca i glodavaca

Središnji živčani sustav (mozak i leđna moždina) i periferni živčani sustav (gangliji i živci) zajedno kontroliraju somatske (senzomotorički sustav) i autonomne (simpatički i parasimpatički sustav) funkcije (23, 24). Neuroanatomske usporedbe između glodavaca i ljudi komplicirane su filogenetskom udaljenošću vrsta. Opća sličnost anatomije, biokemije i fiziologije živčanog sustava kod sisavaca omogućuje da se prvenstveno miševi i štakori koriste kao modeli ljudske neurološke funkcije i bolesti (23). Međutim, ekstremna složenost i veličina ljudskog mozga i leđne moždine u odnosu na jednostavan oblik i primitivniju funkciju kod glodavaca mogu potencijalno spriječiti napore translacijske medicine. Najbolje sredstvo da se ekstrapolacija podataka od glodavaca do čovjeka provede na racionalan način, je razumijevanje ekvivalentnih i divergentnih značajki CNS-a glodavaca.

2.1.1. Anatomska obilježja mozga sisavaca i glodavaca (štakora)

Anatomski gledano, najočitija je razlika u veličini mozga koji kod štakora teži ~ 2 g (kod miša ~0,4g), lisencefalni je (nemaju brazde, lat. *sulci* i vijuge, lat. *gyri*) i ima malo bijele tvari. Suprotno tome, mnogo veći ljudski mozak (otprilike 1300 g) ima lako vidljivu lobularnu organizaciju (čeonni, lat. *lobus frontalis*; slijepočni, lat. *lobus temporalis*; tjemeni, lat. *lobus parietalis*; i zatiljni režanj, lat. *lobus occipitalis*), istaknute brazde i vijuge te veliku količinu bijele tvari (23). Gledajući dorzalnu (superiornu) površinu mozga glodavaca *in situ*, jasno je vidljiv veliki mozak, srednji mozak i mali mozak, dok se istim pregledom kod ljudi vidi samo kora velikoga mozga. Procjena ventralnih površina mozga glodavca otkriva nekoliko istaknutih orijentacija, uključujući (ali ne ograničavajući se na) olfaktorne (njušne) tuberkule, optičku hijazmu, hipofizu, piriformnu koru, most i leđnu moždinu. Slični ventralni orijentiri mogu se primijetiti u mozgu ljudi, iako se veličine određenih struktura bitno razlikuju od identičnih značajki kod glodavaca. Mozak kod glodavaca i ljudi je s dorzalne strane razdijeljen na dvije polutke (lat. *hemispheria*) s uzdužnom pukotinom (lat. *fissura longitudinalis*) koje međusobno povezuje žuljevito tijelo (lat. *corpus callosum*) (23).

Raspored glavnih tipova stanica na mikroskopskoj razini je sličan kod štakora i ljudi, iako veći stupanj funkcionalne raznolikosti kod ljudi može rezultirati očiglednijom citoarhitektonskom raznolikošću osnovnih tipova stanica. Cerebralni korteks ima vanjski sloj sive tvari (tj. područje bogato neuronima) i središnju jezgru bijele tvari (tj. zone koje se sastoje uglavnom od

mijeliniziranih neurona i potpornih stanica, neuroglija). Debljina sive tvari i količina bijele tvari mnogo je veća kod ljudi u odnosu na štakore kao posljedica veće cerebrokortikalne intra/inter hemisferičke povezanosti potrebne za potporu kognitivnih procesa (23).

Bazalnu jezgru čine *striatum* (*nucleus caudatus* i *putamen*), *globus pallidus*, *subthalamus* i *substantia nigra*. Ova područja mozga su dio sive tvari krajnjeg mozga (*telencephalon*) i srednjeg mozga (*mesencephalon*: *substantia nigra*), čiji neuroni uglavnom služe kao motorički kontrolni centri. U ljudskom mozgu su *caudatus* i *putamen* odvojene strukture razdvojene unutarnjom kapsulom, dok su kod glodavaca ujedineni. *Substantia nigra* (crna tvar) vidljiva je u adolescenata i odraslih ljudi zbog lokalnog nakupljanja neuromelanina, dok je u glodavaca blijeda jer neuroni glodavaca ne akumuliraju neuromelanin (23).

Međumozak (lat. *diencefalon*), dio mozga koji se nalazi ispod srednjeg moždanog korteksa, najprimitivniji je dio moždane kore. Sadrži mnoštvo usko povezanih moždanih centara (nazvanih „limbički sustav“) koji zajedno reguliraju emocije i ponašanje što je važno za socijalizaciju, preživljavanje (hranjenje, borbu i bježanje) te sjećanje. Limbički sustav također utječe na više visceralnih funkcija preko eferentnih živaca autonomnog živčanog sustava (engl. *autonomic nervous system*, ANS). Centri koji sudjeluju u limbičkom sustavu uključuju: hipokampus, amigdalnu, limbički fortteks i forniks, septum i rostralno (prednje) talamičko jedro koje podržava razne funkcije, uključujući disanje i ponašanje, kratkoročnu memoriju i ukus. Od njih su najčešće hipokampus, talamus, hipotalamus i amigdala podvrgnuti neuropatološkoj analizi kod glodavaca i ljudi zbog poznatih funkcionalnih korelacija (23).

Hipokampus ima izražen nagibni oblik u obliku slova C u tri dimenzije, koji se gleda više dorzalno u mozgu glodavaca, a više ventralno kod ljudi. Anatomski profil hipokampusa pomiče se u odnosu na središnju srednju liniju, krećući se bočno i ventralno u više kaudalnih regija mozga. Prepoznatljive zone hipokampusa Amonov rog, *dentati gyrus* i *subiculum* oblikuju tzv. hipokampalnuformaciju. Amonov rog (lat. *cornu ammonis*, CA) podijeljen je u regije CA1-CA4 (24) kod ljudi te kod glodavac u CA1-CA3 (25).

Talamus čini središnji dio međumozga i sjedište je višestrukih, često nerazrijeđenih jezgri koje prenose osjetilne informacije između donjih moždanih centara i moždane kore. Različite jezgre služe specifičnim funkcijama. Veze između talamusa i moždane kora je recipročna. Veliki dio anatomske povezanosti talamusa i ostalih domena CNS-a sačuvan je kod glodavaca i ljudi. Hipotalamus, koji leži ventralno (inferiorno) u odnosu na talamus, smješten je u blizini spojnice mnogih glavnih neuronskih putova, kao i stabljike hipofize. Integrira homeostatske funkcije

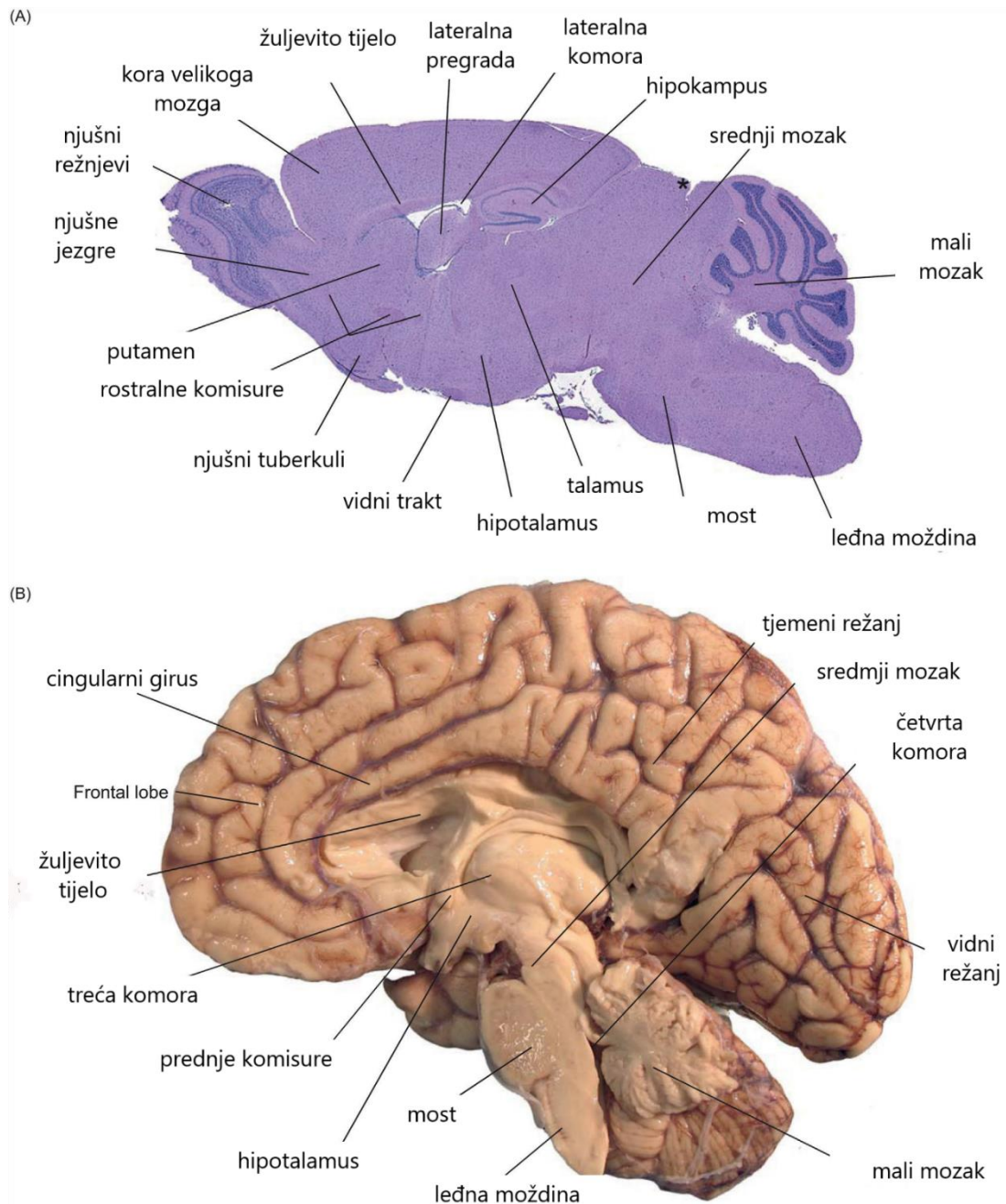
autonomnog, endokrinog i somatosenzornog sustava. Nukleusi u ovome području slabo su razgraničeni kod glodavaca i ljudi (23).

Mali mozak (lat. *cerebellum*) se može podijeliti na tijelo, koje koordinira pokrete mišića i tonus, i flokulonodularno područje, koje kontrolira ravnotežu. Makroskopski gledano u odnosu na glodavce, ljudi posjeduju proširenje bočne polutke mozga kao prilagodbu koja je povezana s dobro razvijenim udovima, sposobnim za ekstenzivno neovisno kretanje, posebno prstiju. Režnjevi (lobusi) maloga mozga puno su veći kod ljudi nego glodavaca zbog povećanja duljine i broja njihovih „listova“. Duboke jezgre mozga kod glodavaca relativno su manje i manje definirane u usporedbi s onima kod ljudi. Unatoč tim kvantitativnim razlikama u moždanoj strukturi, kvaliteta osnovnih funkcija slična je kako za ljude tako i za glodavce (23).

Moždano deblo (lat. *truncus cerebri*) uključuje srednji mozak i most rostralno te produženu moždinu kaudalno. Radeći zajedno, jezgre moždanog debla integriraju i moduliraju aktivnosti drugih moždanih centara, koordiniraju autonomne putove i reguliraju bazalne homeostatske funkcije. Jezgre moždanog debla su raspoređene u uzdužnim stupovima koji predstavljaju rostralne ekstenzije funkcionalnih zona koje se nalaze u sivoj tvari leđne moždine. Kao i kod malog mozga, anatomija moždanog debla očuvana je između ljudi i glodavaca (23). Jezgre ovalnih tjelešaca, najizraženiji agregat stanica u ovome području kod svih vrsta sisavaca, prenosi aferentna vlakna iz viših i donjih moždanih centara u mali mozak.

Ventrikularni sustav u glodavaca i ljudi je niz od četiri međusobno povezane šupljine ispunjene cerebrospinalnom tekućinom (engl. cerebrospinal fluid, CSF) i intersticijskom tekućinom (engl. *interstitial fluid*, ISF) te spojene sa kanalom leđne moždine. U glodavaca veličina ovih prostora može varirati ovisno o naprezanju. Specifični elementi ovog sustava uključuju: dva bočna ventrikula (klijetke) smještena ispod moždane kore; treći ventrikul koji se nalazi unutar međumozga (*diencephalon*) na srednjoj liniji i povezana je s bočnim ventrikulima putem interventrikularne foramine; mezencefalni akvadukt koji prolazi kroz srednji mozak; četvrti ventrikul, koja se nalazi između maloga mozga dorzalno i mosta ventralno; i središnji kanal unutar leđne moždine (23). CSF nastao iz kapilara koroidnog spleta (engl. *choroid plexus*, CP) u bočnim i četvrtim ventrikulima komunicira sa subarahnoidnim prostorom meninga (moždanih ovojnica) pomoću uparenih bočnih otvora, koji „isušuju“ četvrti ventrikul u glodavaca i primata te srednji otvor koji povezuje četvrti ventrikul primata, ali ne i glodavaca, s *cisterna magna*. Stope proizvodnje i apsorpcije CSF-a razlikuju se među vrstama. ISF nastaje ekstravazacijom tekućine iz kapilara (uglavnom u mozgu) prije nego što teče kroz neuropil da bi ušao u perivaskularne „glifatske“ kanale formirane procesima astrocita. CSF-a i ISF nose brojne

čimbenike (npr. hormone, metabolite formirane u mozgu) i pomažu u uravnoteženju pH neuropila. CSF oblaže mozak i leđnu moždinu te ih štiti od izravnog doticaja s koštanim strukturama i mehaničkih trauma (23, 24).



slika 1. Parasagitalni presjek mozga (A) glodavca i (B) čovjeka (preuzeto i prilagođeno prema 23). Hipokampus nije vidljiv na sagitalnom presjeku kod čovjeka, a zvjezdica na presjeku kod glodavca označava približan položaj epifize.

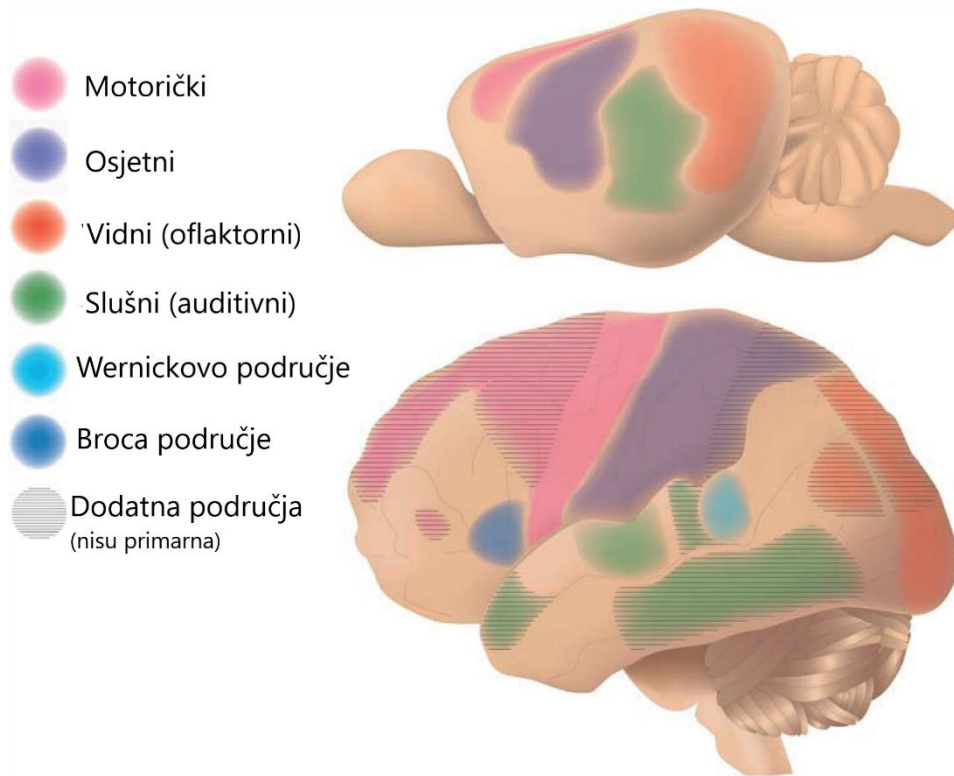
Vaskularna opskrba mozga kod glodavaca i ljudi je relativno očuvana. Krv dopire do mozga glodavaca putem unutarnjih karotidnih arterija (engl. *internal carotid arteries*, IC) i u manjoj mjeri do kralježaka (engl. *vertebral arteries*, VA). IC dostavljaju krv u kortikalne i subkortikalne prostore izravno i putem svojih glavnih grana, dok VA opskrbljuju arterije moždanog debla i maloga mozga. Struktura arterijskog sustava može varirati ovisno o naporu glodavaca: npr. kaudalna komunikacijska arterija vidljiva je u CBA miševa, ali odsutna ili je slabo formirana u C57BL / 6 miševa. U ljudi su iste velike arterije uključene u perfuziju mozga. Međutim, složenost strukture ljudskog mozga u odnosu na mozak glodavaca dovodi do malo drugačijeg arterijskog obrasca. Imena odgovarajućih arterija i vena često nose različita imena kod glodavaca i ljudi (23).

Dva endokrina organa unutar CNS-a su hipofiza i pinealna žlijezda. Hipofiza je smještena pri bazi lubanje u turskom sedlu (lat. *sella turcica*), a povezan je s mozgom preko infundibularne stabljike. Tri glavna reznja hipofize: adenohipofiza (lat. *pars distalis*, prednji reznj), intermedijarni reznj (lat. *pars intermedia*) i neurohipofiza (lat. *pars nervosa*, posteriorni reznj) morfološki su diskretniji kod glodavaca nego kod ljudi. Pinealna žlijezda je jedan od cirkumventrikularnih organa (engl. *circumventricular organs*, CVO), koji su skupine specijaliziranih neurona i potpornih glija koji se nalaze u malim, visoko vaskulariziranim, srednjim strukturama smještenim u zidovima ventrikularnog sustava (23). Zbog svoje stanične i/ili porozne strukture, CVO-i imaju tendenciju da ih neiskusni morfolozi tumače kao lezije (23, 24).

Putem neuralnih i humoralnih (hormoni hipofize) mehanizama hipotalamus nadzire cjelokupni endokrini i reproduktivni sustav, uravnoteženost elektrolita, razinu glukoze, bazalnu temperaturu, razinu metabolizma, tonus autonomnog živčanog sustava, cirkadijane i druge bioritmive, imunološki status te modulira iskustvo i izražaj instinktivnih i nagonskih oblika ponašanja što su usmjereni na preživljavanje i razmnožavanje (gladi, agresije, straha, bijega od opasnosti, žeđi, libida). Ukorak s navedenim funkcijama hipotalamusa, limbički korteks ima ključnu ulogu u regulaciji pamćenja, emocija i motivacije. Navedene funkcionalne specijalizacije limbičkih struktura povezane su održanjem homeostaze organizma i s njom povezanih djelovanja neophodnih za održanje jedinke i vrste (26).

Na strani „suprotnoj“ limbičkom korteksu nalaze se citoarhitektonski visoko diferencirana i funkcionalno visoko specijalizirana primarno osjetna i motorička područja. Ovi dijelovi moždane kore najbliže su povezani s izvantjelesnim prostorom. Primarni osjetni korteks omogućuje neophodni ulazak informacija iz okoline u neuronske krugove moždane kore, dok

primarni motorički korteks predstavlja zajednički završni put svih motoričkih djelovanja koja omogućuju manipulaciju okoline i promjenu pozicije unutar te okoline (26).



Slika 2. Funkcionalne zone mozga (preuzeto i prilagođeno prema 23). Shematski prikazi mozga koji prikazuju približne granice većih funkcionalnih zona kako su projicirane na površini moždane kore glodavaca (miš) (vrh) i čovjeka (dno). Wernickovo područje – razumijevanje govora; Broca područje – produkcija govora; dodatna područja kore – ne postoje kod glodavaca.

U odnosu na druge životinjske vrste, slijedeća su obilježja ponašanja jedinstvena za čovjeka: lokomocija se temelji na nogama, tako da su ruke oslobođene za druge složene funkcije; palac je odmaknut, a fina motorika šake omogućuje razvitak oruđa i tehnologija; govor i jezik podloga su naprednih oblika komunikacije i simboličkog mišljenja; razvijene socijalne međureakcije i kultura; produljeno razdoblje odrastanja; individualni umjetnički i duhovni izričaj. Sva navedena obilježja izravno ovise o moždanoj kori, pa se i neurobiologija ponašanja čovjeka u najvećem dijelu odnosi na proučavanje moždane kore. Od epohalnog otkrića da je lijeva polutka

mozga čovjeka superiorna za jezične funkcije (Broca, 1865. godine), otkrivene su i brojne druge strukturalne i funkcionalne asimetrije ljudskog mozga. Svrha asimetrije nije potpuno jasna, ali vjerojatno predstavlja odraz biološke prednosti u smislu koncentriranja kontrole pojedinih dijelova mreža u istoj polutki, s ciljem minimaliziranja zaostajanja u procesiranju uslijed prijenosa informacija u suprotnu polutku (26).

S obzirom na zadivljujuću složenost moždane kore ljudi, naročito one čeonog režnja, ne iznenađuje činjenica da različite bolesti, poremećaji i ozljede što zahvaćaju moždanu koru mogu dovesti do iznimno složene simptomatologije.

2.1.2. Histologija mozga

Stanice CNS-a mogu se podijeliti u dvije kategorije na temelju njihovog embrionalnog podrijetla: neuroektodermalne i mezenhimske. Stanice koje nastaju iz neuroektodermalnog sloja uključuju neurone, astrocite, oligodendrocite i endodimalne stanice (23, 24). Stanice mezenhinskog podrijetla uključuju meningealne fibroblaste, vaskularni endotel i mikroglija stanice (stanice s makrofagnom funkcijom).

Funkcionalna jedinica živčanog sustava je neuron. Neuroni imaju jedan ili više dendrita preko kojih primaju informacije od drugih neurona i jedan aksona koji sinapsira na druge neurone ili ne-neuralne efektorske organe, poput mišićne mase. Unutar ljudskog mozga postoji oko 130 milijardi neurona koji tvore 150 trilijuna sinapsi (23). Neurone možemo kategorizirati na više načina, ali glavna obilježja koja se koriste za razlikovanje populacije neurona su fenotip neurotransmitera i njihov morfološki izgled. Neuroni obično izdaju jedan neurotransmiter male molekule, najčešće glutamat (u ekscitacijskim stanicama) ili γ -aminobutansku kiselinu (engl. γ -aminobutyric acid. GABA; inhibitorne stanice), kao i jedan ili nekoliko malih peptidnih neurotransmitera, poput enkefalina ili parvalbumina. Neuroni dolaze u raznim veličinama i oblicima, ali dva su uobičajena tipa sa specifičnim funkcionalnim implikacijama: velike piramidalne stanice i male granulirane stanice. Piramidalni neuroni, poput onih moždane kore i motornih neurona ventralnih rogova leđne moždine, imaju relativno velika stanična tijela i obilnu Nissl supstancu (tj. hrapavi endoplazmatski retikulum); imaju tendenciju da se šire u regijama u kojima se pojavljuju (23). Granulirani neuroni, čine populaciju koja naseljava unutarnji sloj moždanog korteksa i CA područje hipokampalne formacije, imaju manju jezgru s oskudnom citoplazmom i čvrsto su „upakirani“ u svoje domene. Piramidalne stanice obično

djeluju kao projekcijski neuroni (tako se nazivaju jer se njihovi dugi aksoni povezuju s udaljenim područjima CNS-a ili perifernim efektorskim organima), dok granularne stanice služe kao interneuroni koji povezuju obližnja područja CNS-a. Međutim, ovaj obrazac nije univerzalan; u *striatumu* su neki interneuroni veći od prevladavajućih GABAergičnih srednje šiljastih neurona. Općenito, neuroni su manji i naseljuju neuropilu gušće kod glodavaca u odnosu na iste strukture ljudskog živčanog tkiva (23).

Za razliku od neurona, glija stanice imaju samo jednu vrstu nastavaka (nemaju aksona), nemaju naponskih Na kanala, nego jedino naponske kanale za prolaz kalijevih iona, ne stvaraju akcijske potencijale i mogu se dijeliti cijelog života (24). Glija stanice središnjeg živčanog sustava dijelimo na dvije glavne skupine: makroglija (astrociti i oligodendrociti) i mikroglija.

Astrociti su najčešće glijalne stanice. Njihov broj premašuje broj neurona u većini područja mozga. Astrociti podržavaju neuronsku funkciju stvaranjem antioksidanata (glutation), recikliranjem neuroprijenosnika (glutamat i GABA) i održavanjem BBB-a (za održavanje ravnoteže mikro-okoliša). Astrocitna „stopala“ također su glavne komponente BBB i limfnih kanala (24). Citoarhitektura astrocita je karakteristična. Njihove jezgre su približno iste veličine kao i mnoge jezgre neurona, ali su veće od jezgara oligodendrocita. Astrocitne jezgre su okrugle do ovalne i imaju male ili nejasne jezgrice. Citoplazmatski procesi nereaktivnih astrocita neprimjetni su u odjeljcima obojenim hemalaun eozinom (HE), dok astrociti koji reagiraju na ozljede razvijaju povećanu citoplazmatsku masu i istaknute zvjezdane procese s vidljivim granicama (gemistocitni astrociti). Metoda koja se najčešće koristi za identifikaciju astrocita je imunohistokemijsko otkrivanje glijalnog fibrilarnog kiselog proteina (engl. *glial fibrillary acidic protein*, GFAP) (24).

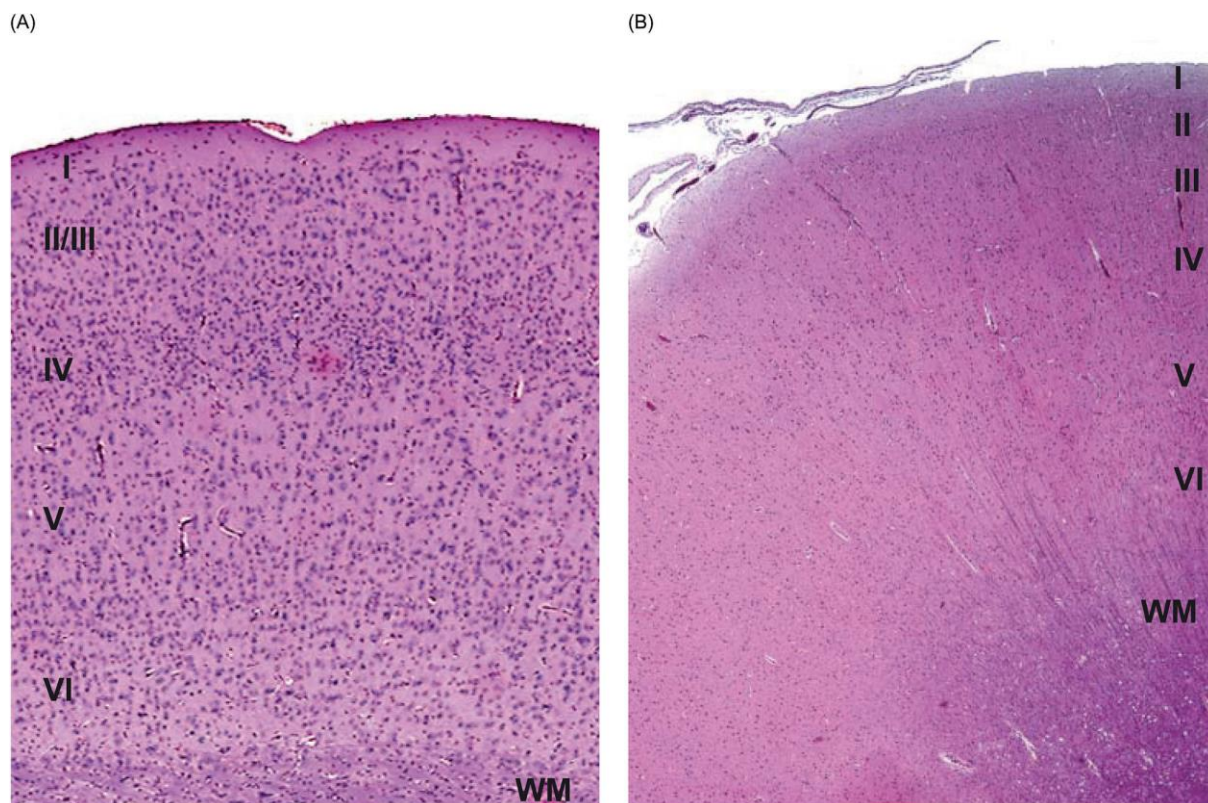
Oligodendrociti tvore i održavaju mijelin koji okružuje procese neurona CNS-a. Svaki oligodendrocit obuhvaća više aksona, dok nekoliko oligodendrocita može poslužiti kao „satelitske stanice“ pored neurona u sivoj tvari. Oligodendrociti imaju okruglu jezgru s kondenziranim kromatinom, koja se boja tamnije od jezgri astrocita i neurona (obično pokazuju jasan „halo“ artefakt u tkivima CNS-a fiksiranih uranjanjem, ali ne i perfuzijom) i nedostaje bazalna lamina. Oligodendrociti se često vide u linearnim redovima između živčanih vlakana trakta bijele tvari. Uobičajeni biljezi za oligodendrocite uključuju ugljičnu anhidrazu II, CNPazu (2', 3'- cikličku nukleotidnu 3'- fosfohidrolazu), osnovni protein mijelina (MBP) i glikoprotein mijelin oligodendrocita (MOG) (23). Oštećenja oligodendrocita koja dovode do gubitka CNS mijelina ne podliježu popravljanju kod glodavaca i ljudi (23).

Mikroglije su urođene imunološke stanice CNS-a. Te rezidencijalne stanice slične histiocitima dijelom nastaju iz žumanjčane vreće i koloniziraju CNS tijekom razvoja, a dijelom iz monocita koji potiču iz koštane srži i cirkulacijom dopijevaju na oštećena mjesta u CNS-u. Mikroglija obojana HE je malobrojna; takve stanice u mirovanju imaju neupadljivu citoplazmu i tamnu jezgra u obliku šipke koja je manja od astrocita. Aktivirane mikroglije imaju lagano ovalnu jezgra. Biljezi koji se koriste za označavanje mikroglija su CD68 i CD11b kod ljudi te ionizirana molekula adaptera za vezanje kalcija 1 (Iba-1) kod glodavaca (23).

2.1.3. Histološki specifične regije

Siva tvar kore velikoga mozga sadrži dvije glavne vrste neurona: stanice s malim granulama, koje djeluju kao intrakortikalni interneuroni, i velike piramidalne stanice, koje služe kao efektivni projekcijski neuroni koji putuju unutar moždane kore ili se protežu do potkortikalnih struktura. Cerebrokortikalni neuroni tvore šest paralelnih slojeva u sivoj tvari, svaki označen rimskim brojem. Molekularni sloj (I), superficijalni sloj ispod moždanih ovojnica, sadrži neuropile i tijela glija stanica. Sljedeći slojevi su vanjski zrnati sloj (II) i vanjski piramidalni sloj (III) stanica. Ovi slojevi su prilično različiti u ljudskom mozgu, ali ih je moguće lako uočiti u mnogim dijelovima moždane kore glodavaca. Najdublje razine su unutarnji zrnati sloj (IV), unutarnji piramidalni sloj (V) i multiformni sloj (VI) stanica. Aferenti nastaju u ipsilateralnom i kontralateralnom korteksu (koji završava uglavnom u slojevima II i III), kao i u talamusu (koji završava u slojevima I, IV i VI). Kortikokortikalni eferenti nastaju iz sloja III, kortikostrijatalni eferenti iz sloja V, a kortikotalamični eferentima iz sloja VI. Širina i izrazitost ovih slojeva varira između regija; za usporedive regije slojevitost je uglavnom vidljiva u ljudskom korteksu u odnosu na korteks glodavaca (23, 24).

Poluorganizirani agregati sive tvari koji sadrže bazalne jezgre naseljeni su projekcijskim neuronima i kortikalnim interneuronima, koji se uglavnom pojavljuju kao zrnate stanice. Prolazak bijele tvari kroz striatum daje mu prugasti izgled. Snopovi mijeliniziranih aksona malog promjera prelaze striatum prema *lobusu pallidusu*, tzv. Wilsonove olovke. Humani *substantia nigra* neuroni akumuliraju neuromelanin - grubi, tamni citoplazmatski pigment formiran kao nus-produkt sinteze katekolamina (dopamina). Suprotno tome, *substantia nigra* neuroni u glodavaca pokazuju bazofilne vijence i pojaseve duž citoplazmatskih granica, ali im nedostaje neuromelanin (23).



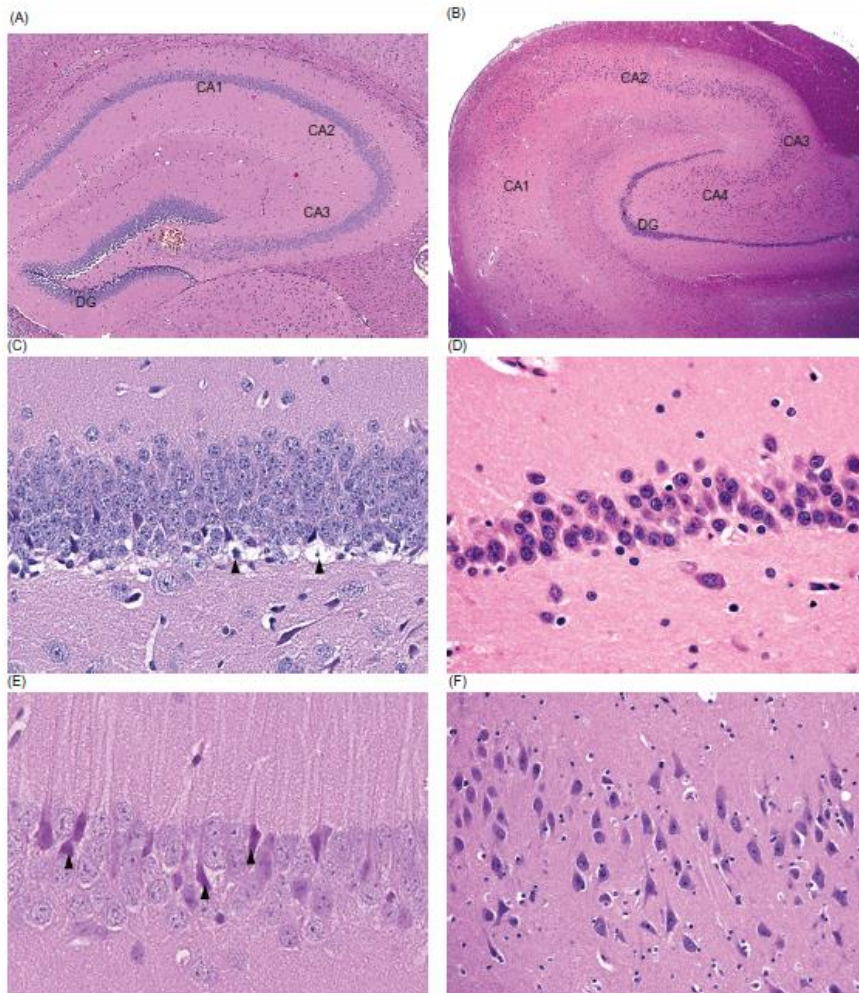
Slika 3. Organizacija neurona moždane kore glodavca (A) i čovjeka (B) (preuzeto i prilagođeno prema 23).

Korteks sadrži šest slojeva, mada su kod glodavaca (miš/štakor) slojevi II i III spojeni zajedno kao sloj II / III. Sloj I (molekularni sloj) leži ispod meninga i sadrži neuropil i nekoliko tijela neuronskih stanica. Preostali slojevi su: II - vanjski zrnati (granulirani) stanični sloj, III - vanjski piramidalni stanični sloj (sastavljen od malih piramidalnih stanica), IV - unutarnji zrnati stanični sloj, V - unutarnji piramidalni stanični sloj (sadrži velike piramidalne stanice) i VI (višeformni sloj, s izduženim fusiformnim neuronima). Kako bi se istaknuo stanični detalj svakog od njih, slika glodavca predstavljena je većim uvećanjem. Kratice: WM, engl. *white matter*, bijela tvar.

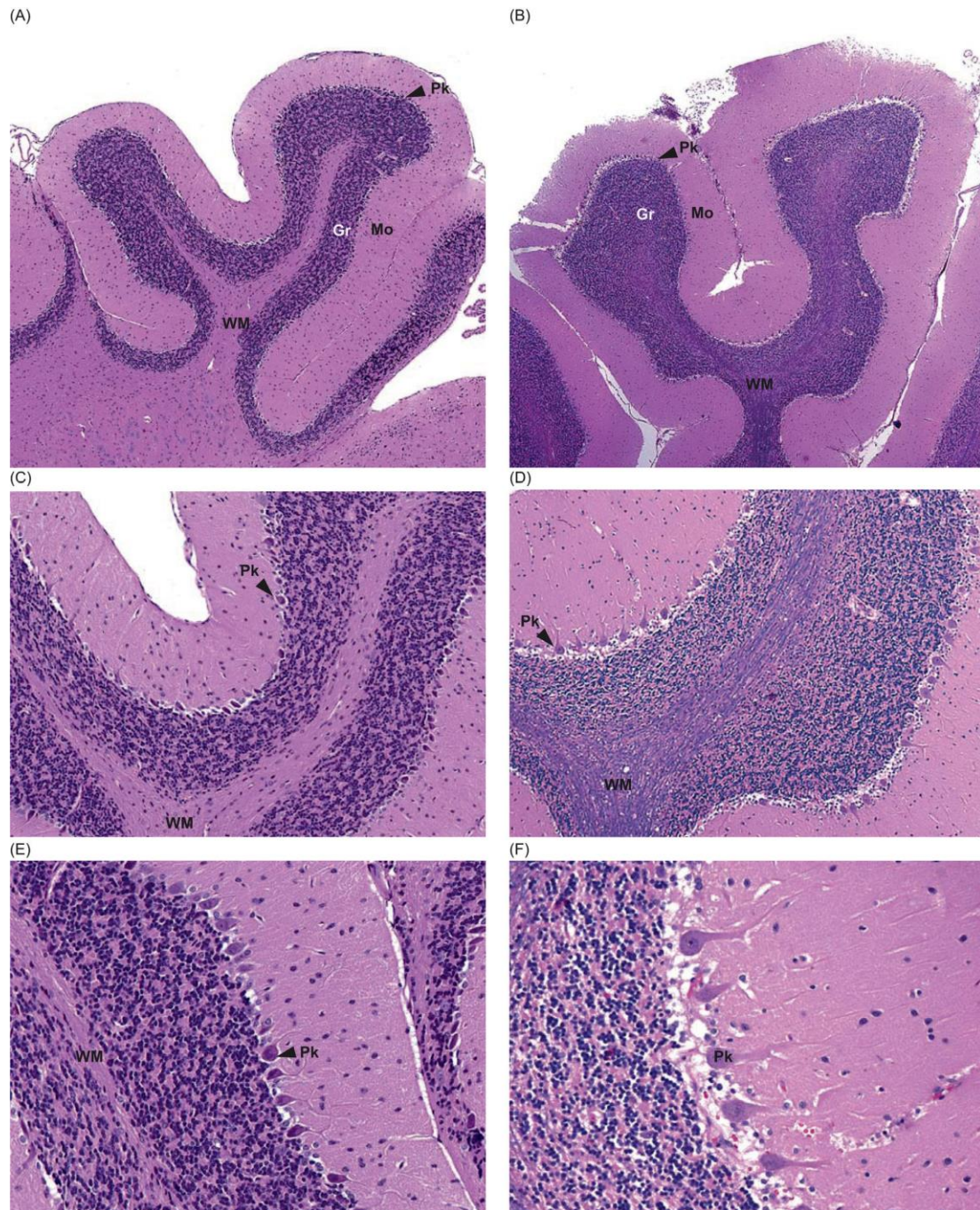
Amonov rog hipokampusa sadrži piramidalne neurone koji pokazuju različite količine citoplazme i dendritičnih izdanaka. Dentati gyrus sadrži zrnate neurone i gušće je naseljen kod glodavaca nego ljudi. Amonov rog podijeljen je na regije CA1 – CA4 kod ljudi (24) i CA1-CA3 kod glodavaca (sukladno novijim radovima) (25).

Korteks maloga mozga sadrži tri sloja; granularni sloj, koji se proteže od bijele tvari do kortikalne površine; sloj Purkinjeovih stanica; i molekularni sloj. Zrnati sloj sadrži brojne granulirane neurone čiji se aksoni površno šire u molekularni sloj; zrnati sloj glodavaca manje je naseljen od ljudskog zrnatog sloja (23). Sloj Purkinjeovih stanica kod ljudi i glodavaca sastoji se od jednog niza velikih Purkinjeovih neurona s jednim aksonom koji se proteže duboko u mali mozak i brojnih dendrita koji strše u molekularni sloj i široko se uklapaju u njega.

Purkinjejeve stanice glodavaca su manje i imaju manje citoplazme u odnosu na ljudske. Dakle, obilna neuropilna mreža molekularnog sloja sastoji se uglavnom od aksona granularnih stanica i dendrita Purkinjeovih stanica. Stanične jezgre unutar molekularnog sloja uglavnom čine glijalne stanice.



Slika 4. Organizacija hipokampusa (preuzeto i prilagođeno prema 23). Glodavci (miš) (A, C i E) i ljudi (B, D i F). Miševi (A): DG koji sadrži guste zrnate stanice i CA1 – CA3 regije koje sadrže piramidalne neurone. Ljudi (B): regije CA1 – CA4 i visoki površinski sloj DG. Stanice DG su mnogobrojnije i gušće nabijene u miševa (C) u odnosu na ljude (D). CA1 piramidalni neuroni kod miša (E) su gušće pakirani, manji i imaju manje citoplazme od svojih humanih CA1 kolega (F). Vidljiva je prisutnost „tamnih neurona“ (E; cstrelice) - uobičajenog histološkog artefakta, karakterizirana intenzivno bazofilnim obojenjem tijela neurona kod glodavaca. Smatra se da je taj artefakt rezultat *postmortem* manipulacije ili traume ishemijskog tkiva mozga; ne treba ga tumačiti kao dokaz neuronske degeneracije ili smrti. Čista traka vakuoliranih stanica je još jedan uobičajeni artefakt u obradi koji se opaža u hipokampusu mozgova glodavaca fiksiranih uranjanjem (C; strelice). Mikrografske snimke miša i ljudi prikazane su u različitim veličinama kako bi se bolje prikazale citoarhitektonske značajke svake vrste. Kratice: DG (lat. *girus denatus*) i CA1-CA4 (dio hipokampalne fornacije, tzv. Amonov rog – *cornu Ammonis*).



Slika 5. Mali mozak (lat. *cerebellum*) (preuzeto i prilagođeno prema 23). Glodavci (miš) (A, C i E) i ljudi (B, D i F). Regije su jednoliko organizirane u tri sloja, izvana prema unutra: molekularni sloj (Mo), Purkinjeov stanični sloj (Pk, sa strelicama) i zrnati sloj (Gr). Molekularni sloj široko je područje gusto nabijenih neuronskih procesa s nekoliko neuronskih tijela. Pk je jedan sloj velikih, torpednih stanica s istaknutim apikalnim procesima koji se protežu u molekularni sloj; stanice u miševa su manje i imaju manje citoplazme (E) u odnosu na ljudske stanice (F). Zrnati sloj je nabijen malim, tamnim, okruglim stanicama i bogatiji je stanicama kod čovjeka nego miša. Jezgra bijele tvari u obliku cerebelarnog folija (što znači „list“) vidljiva je u obje vrste. Mikrografske snimke miša i ljudi prikazane su u različitim veličinama kako bi se bolje prikazale citoarhitektonske značajke svake vrste.

2.1.4. Povezane strukture

Središnji živčani sustav ovijaju tri vezivne ovojnice (meninge): unutarnja ovojnica, pija (lat. *pia mater*); srednja ovojnica, arahnoideja (lat. *arachnoidea mater*); i vanjska čvrsta, dura (lat. *dura mater*). Kako CNS dijelimo u dva temeljna dijela (kralješničnu moždinu i encefalon (mozak)), tako i ovojnice dijelimo u ovojnice kralješnične moždine (*pia mater spinalis, arachnoidea spinalis, dura mater spinalis*) i ovojnice mozga (*pia mater encephali, arachnoidea encephali, dura mater encephali*). Kako su pija i arahnoideja slične građe, sličnog razvojnog podrijetla i uz to su povezane brojnim vezivnim mostićima, često ih se opisuje kao jednu, “meku” ovojnicu – *leptomeninx*; onda se čvrsta dura opisuje kao “tvrda” ovojnica – *pachymeninx* (24). Te ovojnice moždano tkivo mehanički zaštićuju i ujedno oblikuju pregrade što odvajaju (i održavaju u određenom položaju) temeljne dijelove središnjeg živčanog sustava, a sudjeluju (sadržeći krvne žile i likvorske prostore) i u prehrani moždanog tkiva (24). Vrlo tanke leptomeninge glodavaca vidljive su na površini. One su deblje i bogatije krvnim žilama u ljudi zbog povećane površine te povećane potrebe tkiva za kisikom. Meningi su građene od kolagenih i elastičnih vlakana te od stanica prevladavaju fibroblasti unutar strome i vaskularnog endotela (23,24). Opseg stvaranja kolagena veći je u duri i relativno manji u dva leptomeningealna sloja. Povremeno se može vidjeti nekoliko leukocita (tipično limfocita) u blizini površinskih krvnih žila meninga (23).

Krvno moždana barijera (engl. *blood-brain barrier*, BBB) i krvno-živčana barijera predstavljaju dinamično, čvrsto regulirano sučelje koje odvaja živčano tkivo od mnogih tvari koji se prenose krvlju. BBB se sastoji uglavnom od specijaliziranih endotelnih stanica kapilara u kojima su prisutni čvrsti međustanični spojevi, nedostatak pora i niska endocitna aktivnost rezultira smanjenom propusnošću. Procesi glijalnih stanica (uglavnom astrocitični) također su uključeni u regulaciju, održavanje i popravak ovih barijera. Kao što je prethodno napomenuto, barijera ne postoji u CVO-ima mozga, ali i u autonomnim ganglijima. Kod miševa, BBB postaje funkcionalna 16 embrionalni dan (E16), gdje je E0 dan začeca (23).

2.2. Alzheimerova bolest

Bolest je prvi opisao dr. Alois Alzheimer 1906. godine u Tübingenu u pacijentice Auguste Deter, pacijentice koja je u 51. godini počela pokazivati znakove demencije, naglog slabljenja pamćenja, gubitka orijentacije, nije mogla samostalno obavljati svakodnevne aktivnosti, a s godinama su se simptomi znatno pogoršali. Nakon njene smrti u 55. godini, dr. Alzheimer je proveo biopsiju mozga i ustanovio kako je cerebralni korteks promijenjen te opisao dotad nepoznate histopatološke pojave u mozgu, danas definirane kao senilne plakove (SP) i neurofibrilarne snopiće (engl. *neurofibrillary tangles*, NFTs) (27, 9). Alzheimer se smatra prvim koji je povezoao navedene kliničke simptome bolesti s prisutnošću senilnih plakova (SP) i posebice neurofibrilarnih snopića u moždanoj kori oboljelih. Navedene patološke promjene prikazao je metodom srebrne impregnacije po Bielschowskom, a brojne modifikacije te metode se i danas rabe u svrhu vizualizacije navedenih promjena. Nakon što je Alzheimer u mozgu pacijenta Johanna F. koji je umro 1910. godine također, pored SP, uočio i opisao veliku brojnost NFT u moždanoj kori, Kraepelin je bio uvjeren kako se radi o posebnoj bolesti te je u svojoj knjizi iz psihijatrije 1912. godine tu bolest nazvao Alzheimerovom bolešću (28, 29).

Pretpostavlja se kako svakih pet godina broj oboljelih od AD naraste za 12%. S obzirom na to, bilo koji oblik pristupa liječenja koji bi barem malo usporio progresiju Alzheimerove bolesti imao bi ogroman učinak na javno zdravstvo uopće (30). U svijetu je 2015. godine utvrđeno 46,8 milijuna slučajeva sindroma demencije. Ukupni svjetski trošak na liječenje i njegu oboljelih od demencije je u 2015. godini iznosio oko 818 milijardi US\$ (31). Nijedna zemlja nije odgovarajuće pripremljena za suočavanje s krizom ovakvih razmjera. Učestalost Alzheimerove bolesti (AD) i drugih, manje čestih primarnih uzroka sindroma demencije, u svjetskoj populaciji je (32): Alzheimerova bolest – 62%; vaskularna demencija (VaD) – 17%; miješani tip demencije (najčešće AD + VaD, ali mogu biti i druge kombinacije) – 10%; demencija s Lewyjevim tjelešcima – 4%; frontotemporalna demencija – 2%; demencija u Parkinsonovoj bolesti – 2% i ostali uzroci demencije – 3%.

Za kliničku dijagnozu AD najčešće se koriste kriteriji NINCDS-ADRDA (engl. *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*) objavljeni 1984. godine koji su 2011. godine prilagođeni današnjim saznanjima i uključuju širi pogled patogeneze AD. Grupe oformljene od strane NIA (engl. *National Institute on Aging*) i *Alzheimer's Association* upotpunile su kriterije iz 1984. godine te podijelili progresiju AD u tri stadija: 1. rani, pretklinički stadij; 2. srednji stadij s

blagim kognitivnim poremećajima; i 3. stadij sa simptomima demencije. Novi kriteriji jasnije definiraju razlike između demencije uzrokovane AD i ostalih demencija i povezanost s poremećajima koji mogu utjecati na razvoj AD kao što su npr. krvožilne bolesti. Dijagnoza se postavlja temeljem testiranja kognitivnih sposobnosti, u te svrhe koristi se Mala ljestvica mentalnih sposobnosti, MMSE ljestvica (engl. *Mini Mental Status Examination*) i neurološkog pregleda. On može uključivati i snimanje mozga kompjutoriziranom tomografijom (engl. *computed tomography, CT*), magnetskom rezonancijom (engl. *magnetic resonance imaging, MRI*) ili pozitronskom emisijskom tomografijom (engl. *positron emission tomography, PET*). Time se može vidjeti postoji li atrofija moždane kore (CT i MRI), odnosno smanjena aktivnost (PET) pojedinih moždanih regija. Važna nadopuna dijagnostičkih kriterija je upotreba biljega u dijagnosticiranju AD (33-35). Provodi se i analiza biljega kao što su koncentracija amiloida β ($A\beta$) te ukupnog i fosforiliranog proteina tau u cerebrospinalnoj tekućini te vizualizacija amiloida β radioaktivnim biljezima. Upotreba takvih biljega upotpunjuje kliničku sliku pokazujući da se primjenom ovog testa mogu diferencijalno dijagnosticirati osobe s AD, kao i nedementne osobe te osobe s blagim kognitivnim poremećajem koje će u budućnosti napredovati u AD (30).

Smatra se da bolest započinje godinama prije pojave prvih simptoma. Stoga je krajnji cilj upotreba biljega u svrhu što ranijeg otkrivanja bolesti, prije razvoja prvih kliničkih znakova kako bi se mogle poduzeti eventualne preventivne mjere i usporiti daljnje napredovanje bolesti. Na žalost dosad poznati biljezi nisu primjenjivi u tu svrhu (36). Nadamo se da će različita gledišta istraživanja Alzheimerove bolesti pridonijeti razvoju novih oblika liječenja i/ili prevencije ove još uvijek neizlječive bolesti (30).

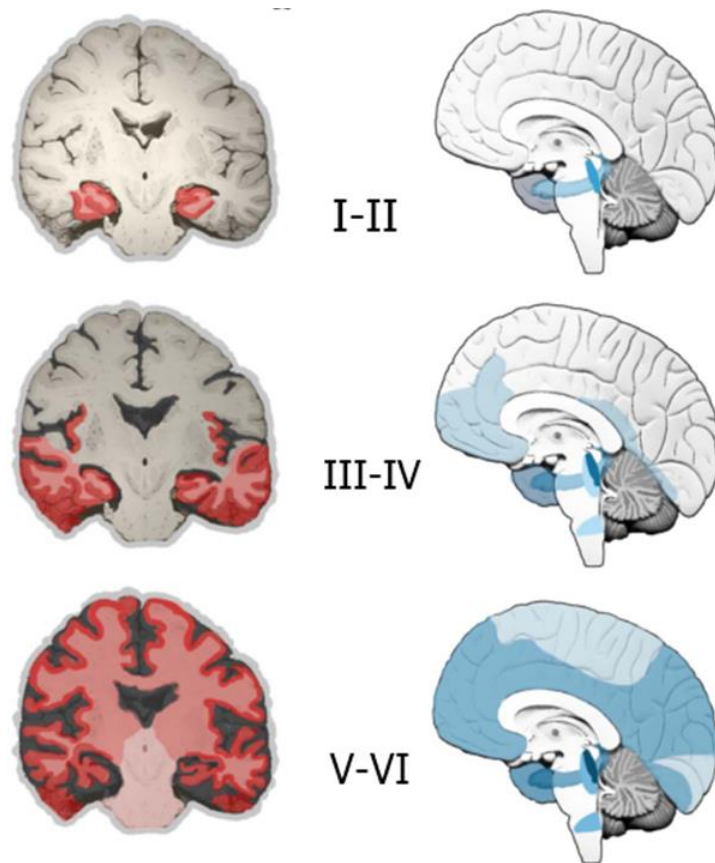
2.3. Patogeneza Alzheimerove bolesti

Na mikroskopskoj razini glavna histopatološka obilježja AD su izvanstanično nakupljanje amiloida β ($A\beta$), najprije u obliku difuznih depozita, a zatim i amiloidnih plakova (37), unutarstanična akumulacija hiperfosforiliranog proteina tau te gubitak neurona, prvenstveno kolinergičkih, noradrenergičkih i serotonergičkih. Morfološki gledano, najranjiviji su piramidalni neuroni (38-40).

Nakon otkrića $A\beta$ kao glavnog strukturnog proteina amiloidnih plakova (41) nastala je hipoteza amiloidne kaskade. Prema toj hipotezi glavni patološki proces koji dalje pokreće sve druge patološke promjene, koje u konačnici rezultiraju neurodegeneracijom, je neravnoteža između proizvodnje i uklanjanja $A\beta$ u mozgu (42). $A\beta$ je protein koji nastaje cijepanjem amiloidnog prekursorskog proteina (engl. *amyloid precursor protein*, APP). Ovisno o mjestu cijepanja i enzimima koji ga posreduju mogu nastati produkti različite duljine. Ukoliko se APP pocijepa β -sekretazom i zatim γ -sekretazom, nastaje $A\beta$. Ako pak APP najprije pocijepa α -sekretaza nastaje drugi produkt koji ne sudjeluje u formiranju plakova (43, 44). U plakovima se najčešće može naći $A\beta$ sastavljen od 42 aminokiseline koji ima veću sklonost agregacije u nakupine. Hipotezu potkrepljuju istraživanja mutacije gena APP, gena za presenilin, PSEN1 i PSEN2, povezanih s nastankom nasljednog tipa AD. Mutacije u genu APP dovode do prekomjerne produkcije $A\beta$ pa s time i njegovog nakupljanja (45, 46), a mutacije u genima PSEN1 i PSEN2 do nastajanja $A\beta_{42}$. Točan mehanizam pokretanja daljnjih patoloških procesa je i dalje ne razjašnjen, poznato je da prisustvo plakova narušava homeostazu kalcija, povećavajući njegovu unutarstaničnu koncentraciju. Fosforilacija proteina tau može biti kontrolirana unutarstaničnim kalcijem, pa je to jedan od mogućih mehanizam kojim plakovi potiču stvaranje neurofibrilarnih snopića (37, 42).

Amiloidni plakovi imaju jezgru sačinjenu od fibrila amiloida koju okružuju distrofični neuriti, reaktivne mikroglija stanice i astrociti. Oprečno tome, difuzne nakupine amiloida nisu združene s distrofičnim neuritima i mikroglija stanicama, a smatra se da su one početni stadij nastajanja plakova (47).

Unutarstanična akumulacija hiperfosforilanog proteina tau u obliku neurofibrilarnih snopića (NFT), drugo je glavno histopatološko obilježje AD (48). NFT se sastoje od dvije duge, nerazgranate podjedinice koje čine zavojnicu (engl. *paired helical filament*, PHF). U fiziološkim uvjetima tau je vezan za mikrotubule i kontrolira njihovo formiranje te ih čini stabilnima. Fosforilacija igra važnu ulogu u regulaciji aktivnosti proteina tau, a prema tau hipotezi o nastanku AD hiperfosforilacija je glavni korak koji vodi ka formiranju NFT (49) jer uzrokuje razgradnju mikrotubula i nakupljanje proteina tau. Dokazano je da nastanak NFT bolje korelira s gubitkom kognitivnih sposobnosti i progresijom AD, nego nakupljanje $A\beta$ (39). Usporedbom patoloških uzoraka različitih stadija AD vidjelo se da progresijom bolesti NFTs zahvaćaju dijelove mozga najčešće po istom uzorku. Stoga je napravljena shema topografske progresije bolesti. S obzirom na dijelove mozga zahvaćene NFT-om, pa posljedično i propadanjem moždanih stanica, bolest se dijeli na šest Braakovih stadija (**Slika 6**) (2, 49).



Slika 6. Topografska progresija patoloških promjena neurofibrilarnih snopića (NTF) u Alzheimerovoj bolesti (AD) kroz 6 Braakovih stadija (preuzeto od 2). Inicijalni stadiji bolesti I i II nazivaju se još i transentorinalni stadiji jer se patološke promjene u mozgu šire iz entorinalne regije do hipokampalne formacije. Klinički se stadiji I i II manifestiraju kao gubitak pamćenja nedavnih događaja, blaga prostorna dezorijentacija i minimalne poteškoće u svakodnevnim aktivnostima. Opće kognitivne funkcije ostaju sačuvane. U stadijima III i IV bolest zahvaća sljepoočnu, tjemenu i čeonu moždanu regiju. Klinički se javljaju poteškoće s prisjećanjem, otežano pronalaženje adekvatne riječi, vremenska i prostorna dezorijentacija, otežana koncentracija, razumijevanje i konceptualizacija. U završnim stadijima V i VI degeneracija zahvaća osjetna i motorička područja neokorteksa što rezultira poteškoćama prepoznavanja objekata i drugih perceptivskih i motoričkih vještina (2, 38).

Pretpostavlja se da je posljedica stvaranja i širenja amiloidnih plakova i neurofibrilarnih snopića gubitak neurona. Najranjiviji tip neurona u AD su piramidalni neuroni, a njihovi glavni neuroprijenosnici su ekscitatorne aminokiseline (engl. *excitatory amino acid*, EAA) glutamat i aspartat koje imaju važnu ulogu u procesu pamćenja. Pamćenje je proces koji nastaje promjenom jakosti sinapsi između neurona, a neurokemijska podloga učvršćenja sinaptičkih veza, pa s time i pamćenje je dugotrajna potencijacija (engl. *long-term potentiation*, LTP). Ukratko, uslijed frekvencije stimulacije sinapsi povećana je učinkovitost sinaptičkog prijenosa (50). Istraživanja koja su uključivala antagoniste receptora za EAA i modele miševa s delecijom gena za te receptore pokazala su otežano pamćenje kod modelnih organizama, što potvrđuje

ulogu EAA u procesima koji omogućuju pamćenje (51, 52). Gubitak kognitivnih funkcija povezan je i s odumiranjem kolinergičnih neurona (53, 54), a promjene ponašanja, raspoloženja, poteškoće sa spavanjem i usmjeravanjem pažnje osnovu imaju u propadanju serotonergičnih i noradrenergičnih neurona (55, 56).

Ne zna se sa sigurnošću zašto su određeni neuroni i regije mozga podložniji patologiji AD, dok drugi ostaju pošteđeni sve do krajnjih faza bolesti. Opisana je povezanost između selektivne osjetljivosti pojedinih neurona i slijeda mijelinizacije tijekom razvoja mozga. Područja koja mijeliniziraju kasnije razvijaju NFT ranije i u većoj koncentraciji. Osim toga, neuroni koji imaju duge, tanke aksone s tanjim mijelinskim omotačem podložniji su nastajanju NFT od bogatije mijeliniziranih neurona s kraćim aksonima (57).

2.4. Genetička osnova Alzheimerove bolesti

Alzheimerova bolest uključuje nasljedne i sporadične oblike bolesti. U 1-6% slučajeva AD javlja se ranije u životu (prije 65. godine), od toga 60% je tip AD koja se javlja obiteljski (engl. *familial AD*, FAD), a 13% se nasljeđuje na autosomno dominantan način (30). Čvrstu granicu između Alzheimerove bolesti koja se javlja ranije u životu (prije 65. godine) i kasnije (poslije 65. godine) nije moguće utvrditi (58). No bez obzira o kojem se tipu bolesti radi, obilježava ga između ostaloga abnormalno stvaranje, razaranje i nakupljanje $A\beta$, koji dovodi do dijela neuropatologije.

2.4.1. Geni uključeni u nasljedni oblik Alzheimerove bolesti

Nasljedna AD prenosi se na autosomno dominantan način, a prvi simptomi javljaju se prije 65. godine starosti. Zbog toga se ovaj oblik bolesti još naziva rani oblik AD (engl. *early-onset Alzheimer's disease*, EOAD). Mutacije u genu za APP koji se nalazi na kromosomu 21 prve su otkrivene mutacije koje uzrokuju nasljedni oblik AD (30). No, mutacije u genu za APP odgovorne su za nasljedni oblik AD u svega nekoliko obitelji. Većinu slučajeva nasljednog oblika AD uzrokuju mutacije u genima za presenilin 1 (PSEN1) i presenilin 2 (PSEN2) (30). Obitelji u kojima se javlja nasljedni oblik AD vrlo su rijetke te je pojavnost takvog oblika AD

ispod 0,1%. Otkriće mutacija u genima APP, PSEN1 i PSEN2 pridonijelo je razumijevanju molekularnog mehanizma nastanka Alzheimerove bolesti. Zanimljivo je kako više od 200 otkrivenih mutacija u ovim genima ima jednak učinak na povećanje omjera peptida $A\beta_{42}/A\beta_{40}$, ukazujući na jedinstven mehanizam nastanka ovog oblika AD (30).

2.4.1.1. Geni za prekursor proteina amiloid- β (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 AD-a. Osobe oboljele od Downovog sindroma imaju mnogo $A\beta$ plakova građenih samo od $A\beta_{42}$ i to već u njihovim dvadesetima, ali nemaju NFT. Potpunu AD 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 AD (glutamin zamijenjen s glutamičnom kiselinom na kodonu 692 APP770) javlja se u obiteljima s nasljednom cerebralnom hemoragijom s amiloidozom Dutch tipa. Mutacija na kodonu 692 u nekim slučajevima vodi do AD, a u nekim do cerebralne hemoragije i angiopatije. U obiteljskom obliku AD pronađena su tri tipa supstitucija u kodonu 717 (V717I, V717G, V 717F). Rana pojava AD u Švedskoj populaciji povezana je s mutacijama u kodonima 670 i 671. Mutacije APP-a u AD koje dovode do povećane razine $A\beta_{42}$ su APP692, APP716 i APP717 mutacije, a do ukupnog povećanja $A\beta$ dovodi APP670/671 (59).

2.4.1.2. Geni za presenilin 1 i 2 (PSEN1 i PSEN2)

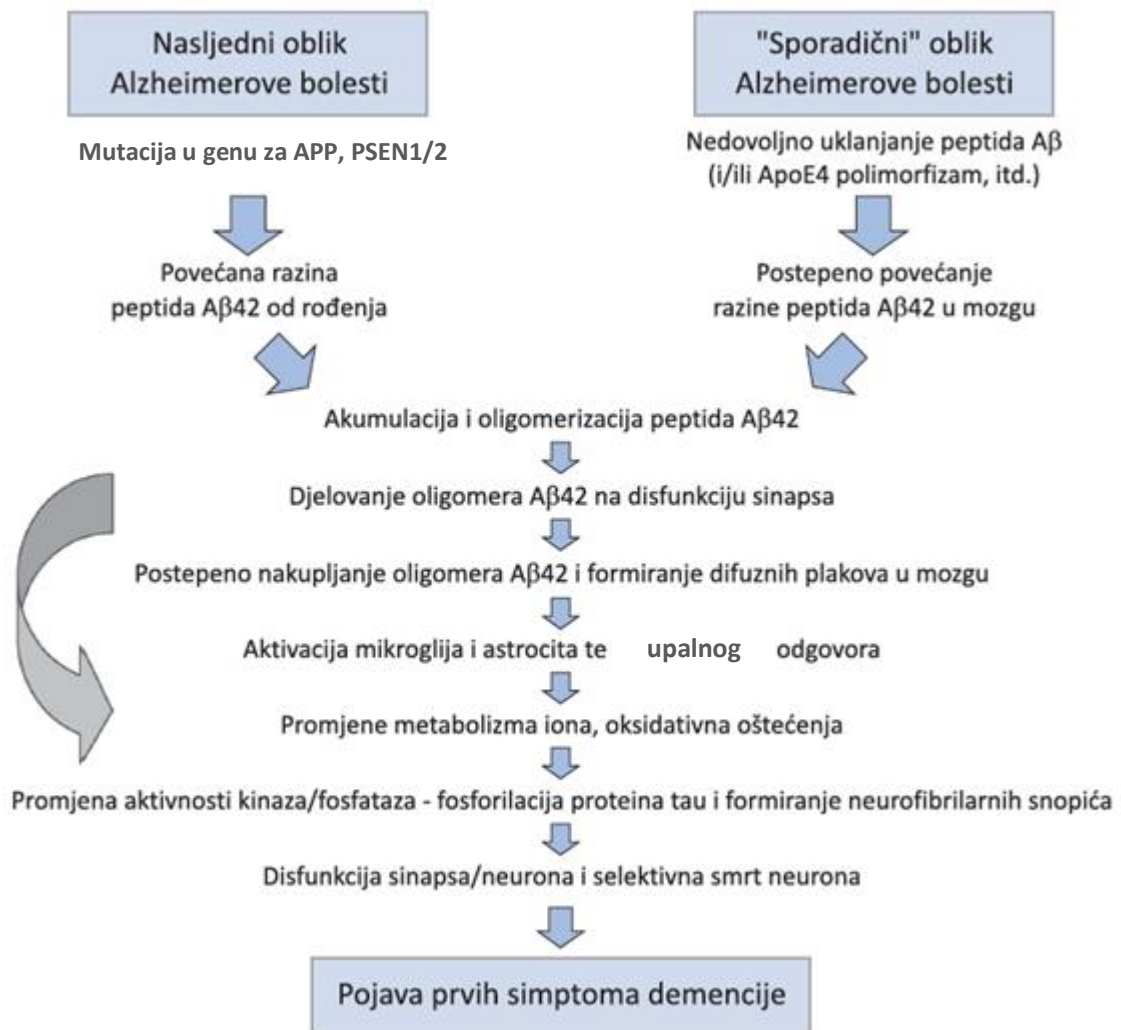
Gen za PSEN1 nalazi se na kromosomu 14, a za PSEN2 na kromosomu 1 (59). Mutacije u PSEN1 genu smatraju se najčešćim genskim uzrokom rane pojavnosti obiteljskog tipa AD. Opisano je više od 100 mutacija PSEN1 gena od kojih se neke povezuju s vrlo ranim (prije 30 godine života) smanjenjem kognitivnih sposobnosti. Mnoge mutacije u PSEN1 genu dovode do povećanog stvaranja $A\beta_{42}$ (60).

Proteini presenilin 1 i 2 (PS1 i PS2) su visoko homologni politopički proteini (59). Imaju važnu ulogu u mnogim fiziološkim funkcijama koje možemo podijeliti na funkcije ovisne o γ -

sekretazi (npr. cijepanje APP) i funkcije neovisne o njoj. Smatra se da mutacije PSEN gena, koje su povezane s FAD, smanjuju γ -sekretaznu proteolizu nekih supstrata poput Notch unutarstanične domene, N-kadherina i tirozinaze jer eksprimirani promijenjeni PS ne može vršiti svoju funkciju. Neke mutacije PSEN gena pronađene u FAD utječu i na neke druge funkcije neovisne o γ -sekretazi kao što su regulacija β -katenin-ovisnog signalnog puta, fosfatidilinozitol, 5-bisfosfatnog metabolizma, otpuštanja kalcijevih iona (Ca^{2+}) iz endoplazmatskog retikuluma, regulacija neurozaštite ovisne o PI3K/Akt (fosfoinozitol-3-kinaze-protein kinaza B/Akt) signalnom putu, sinaptičke homeostaze i brzog aksonalnog prijenosa APP-a. Produkti PSEN gena sudjeluju i u regulaciji razgradnje $A\beta$ neprilizinom (60).

2.4.2. Geni uključeni u „sporadični” oblik Alzheimerove bolesti

Sporadični oblik AD javlja se nakon 65. godine života te se još naziva kasni oblik AD (engl. *late-onset Alzheimer's disease*, LOAD) (30). Za razliku od nasljednog oblika Alzheimerove bolesti (FAD) koji je vrlo rijedak, ovaj oblik AD je najčešći. Iako se ovaj oblik AD naziva sporadičnim, novija genetska istraživanja ukazuju na to kako on vrlo vjerojatno nije sporadičan, već se javlja kao posljedica zajedničkog djelovanja nekoliko gena i nekoliko čimbenika rizika te da postoji genetska predisponiranost za nastanak ovog oblika AD. Brojna asocijacijska istraživanja kao i „*linkage*“ analize utvrdile su postojanje velikog broja gena koji bi mogli biti uključeni u nastanak ovog oblika AD (2, 30). Dobiveni se rezultati, međutim, nisu uspjeli ponoviti u istraživanjima na drugim populacijama, što ukazuje na činjenicu kako još uvijek nije utvrđen gen(i) koji bi direktno mogao biti odgovoran za nastanak najčešćeg oblika AD. Jedini do sada sa sigurnošću utvrđen rizični čimbenik za nastanak sporadičnog oblika AD je polimorfizam $\epsilon 4$ apolipoproteina E (ApoE). Dok je ovaj polimorfizam prisutan u 15% zdrave populacije, u grupi AD prisutan je u čak 65% bolesnika. Heterozigoti za $\epsilon 4$ alel imaju tri puta veći rizik nastanka AD, dok se u homozigota taj rizik povećava 15 puta. Osim toga, ApoE4 alel utječe na raniju pojavu simptoma bolesti i to svaka kopija alela za 10-ak godina (30).



Slika 7. Shematski prikaz slijeda događaja amiloidne hipoteze nastanka Alzheimerove bolesti (preuzeto i prilagođeno prema 30).

2.4.2.1. Gen za apolipoprotein E (ApoE)

ApoE gen smješten je na kromosomu 19 (59) 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 (60). Kod obiteljske AD s kasnijom pojavnošću i sporadične AD primijećena je značajno povećana frekvencija ApoE4 alela, u usporedbi s općom populacijom (59) te se smatra da je on jedan od glavnih čimbenika rizika za obolijevanje od AD s obzirom na prisutnu razinu kolesterola, homocisteina i nekoliko metalnih iona (Al, Cu, Fe) (61). Najveća korelacija između ApoE4 alela i pojavnosti AD primijećena je

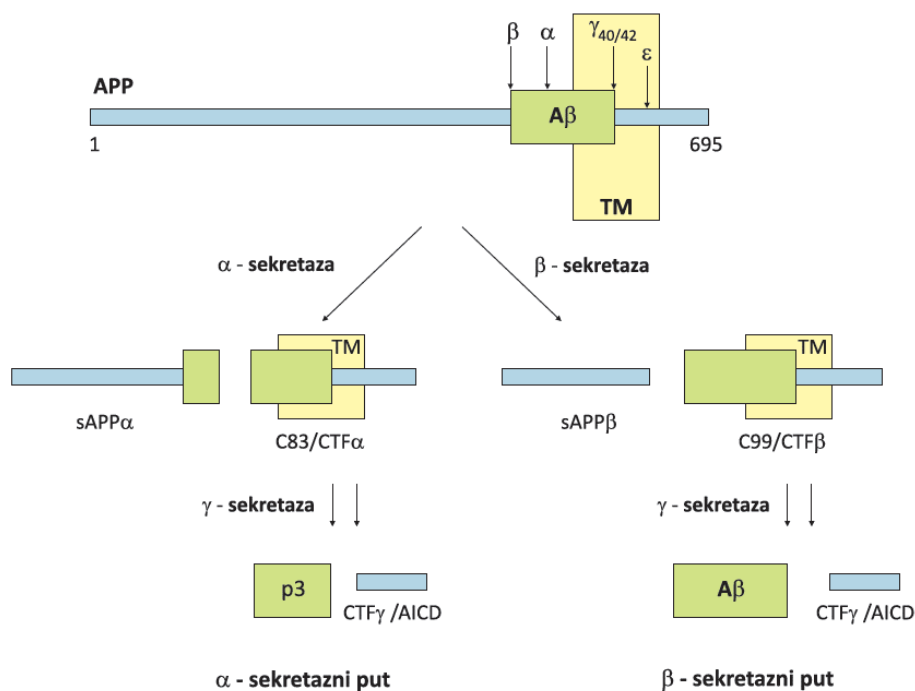
u slučaju kada je prisutan genotip $\epsilon 4/\epsilon 4$. ApoE glikoprotein je glavni serumski protein uključen u pohranu, prijenos i metabolizam kolesterola (59) te kakav će biti njegov utjecaj ovisi o razini kolesterola (60). Astrociti ga stvaraju i ispuštaju u središnji živčani sustav te se akumulira u senilnim plakovima i NFT. *In vitro* je pokazano kako se ApoE veže za topljivi $A\beta$ i potiče nastanak fibrila (59). Treba naglasiti kako polimorfizam ApoE4 predstavlja samo rizični čimbenik nastanka Alzheimerove bolesti, a ne njegov uzrok (30).

2.5. Hipoteza amiloidne kaskade

Hipoteza amiloidne kaskade smatra se vrlo vjerojatnim mehanizmom nastanka Alzheimerove bolesti (**Slika 8**). Ova hipoteza pretpostavlja da $A\beta$ ima središnju ulogu u patogenezi AD, odnosno da je promijenjen metabolizam/razina ovog peptida začetnik kaskade događaja koja u konačnici rezultira neurodegeneracijom i Alzheimerovom bolesti (30). $A\beta$ nastaje iz APP-a koji je kodiran genom na 21. kromosomu, a alternativnim izrezivanjem (engl. *alternative splicing*) APP-a nastaju tri glavne izoforme (APP695, APP751 i APP770). 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. Izrezivanje APP uglavnom se odvija kroz α - i β -put.

U α -putu (ne-amiloidni put) α -sekretaza (skupina metaloproteinaznih enzima ADAM10) reže APP kod lizina 16 i nastaje topljivi oblik (engl. *soluble APP*, sAPP) N-terminalni α -APP ulomak (29, 60). Nastali C-terminalni dio APP-a (engl. *C-terminal fragment*, CTF) 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 CTF γ . AICD je citosolni element za koji se smatra da ima ulogu u prijenosu signala (62). 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 (59).

U β -putu (amiloidni put) β -sekretaza (BACE/Asp2) reže APP na N-terminalni topljivi APP ulomak (β -APP) koji se otpušta i β CTF (engl. *β -C-terminal fragment of APP*) ulomak veličine 99 aminokiselina koji ostaje vezan za membranu. β CTF tada reže γ -sekretaza i nastaje $A\beta$.



Slika 8. Shematski prikaz procesiranja prekursora proteina amiloid- β (APP) (preuzeto i prilagođeno prema 30). Peptid amiloid- β ($A\beta$), koji se smatra glavnim uzrokom nastanka Alzheimerove bolesti, nastaje cijepanjem proteina APP enzimima β -sekretaza i γ -sekretaza, tzv. β -sekretaznim putem.

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 $A\beta$. Druga najčešća vrsta $A\beta$ 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 $A\beta$ koja se nakuplja u mozgu (59). Isprva se mislilo da je β -put abnormalni način izrezivanja APP-a, ali je kasnije dokazano da je prisutan i u zdravih ljudi (61).

2.5.1. γ -sekretaza

γ -sekretaza je enzim kompleks koji se sastoji od četiri zasebna proteina: PS1 (presenilin 1), nicastrin, APH-1 (engl. *anterior pharynx-defective 1*) i PEN-2 (engl. *presenilin enhancer 2*). 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 PS1 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 supstrat, već se prepoznavanje odvija putem mnogih drugih čimbenika, pa tako i prepoznavanjem duljine transmembranske domene. U AD γ -sekretazna aktivnost se ne povećava već dolazi do promjena u njezinom djelovanju što za posljedicu ima stvaranje dužih oblika $A\beta$. Do njene promjene dolazi zbog genskih promjena. Sve to dovodi do rane pojavnosti bolesti i razvoja FAD oblika (59).

2.5.2. β -sekretaza

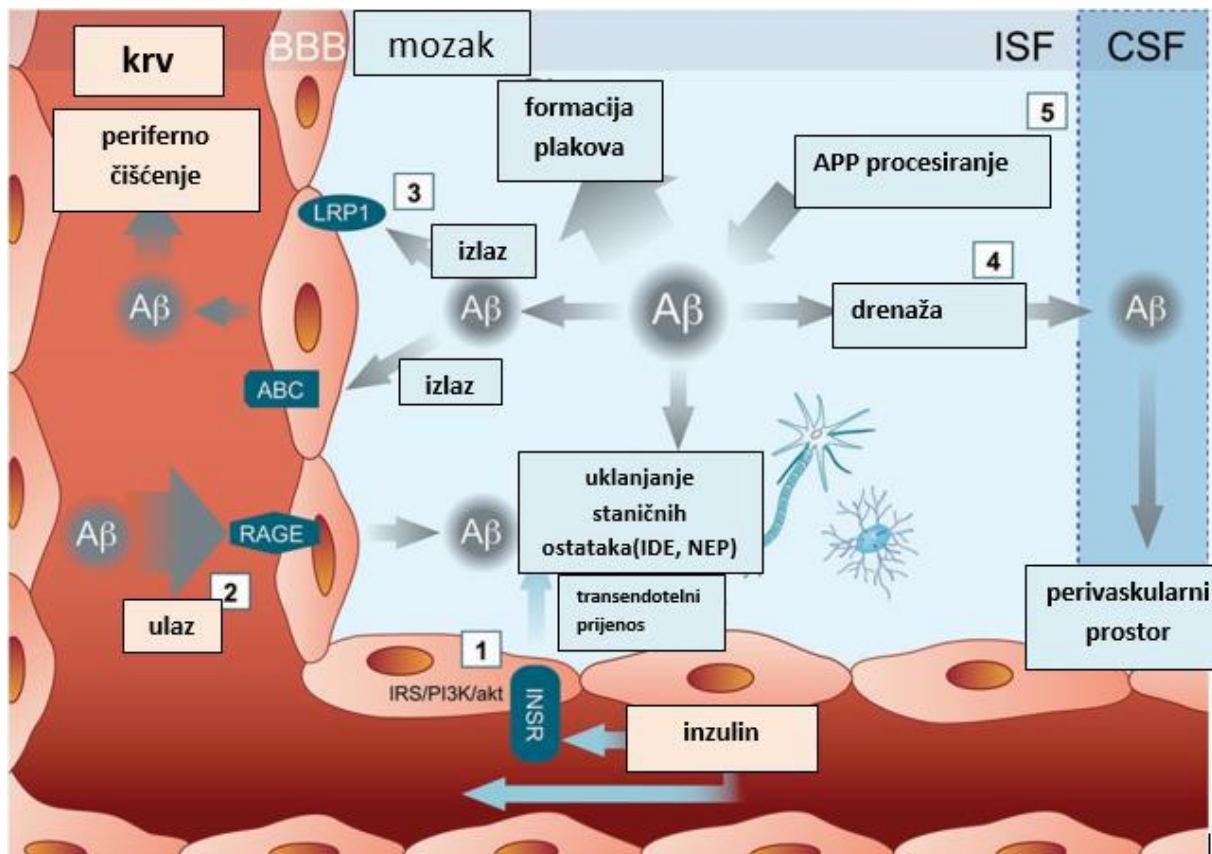
β -sekretaza je za membranu vezana aspartilna proteaza, koja reže svoje supstrate izvan lipidnog dvosloja. β -sekretazu kodira gen BACE1 i BACE2 (engl. *β -site APP-cleaving enzyme*). BACE1 je najviše eksprimiran u mozgu, ali je u manjoj mjeri prisutan i u drugim organima. Odgovoran je za stvaranje $A\beta$. 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 AD značajno je povećana β -sekretazna aktivnost (59).

2.5.3. Razgradnja $A\beta$

U normalnim uvjetima peptid $A\beta$ razgrađuje se i uklanja iz moždanih stanica. Danas među znanstvenicima prevladava hipoteza kako je upravo neravnoteža između proizvodnje i razgradnje/uklanjanja $A\beta$ peptida u mozgu primarni događaj koji naposljetku dovodi do neurodegeneracije i nastanka Alzheimerove bolesti.

Neprilizin (engl. *nepriylisin*, NEP) i inzulin razarajući enzim (engl. *insulin degrading enzyme*, IDE) su dva glavna enzima odgovorna za razaranje $A\beta$. NEP 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 $A\beta$, ali daleko sporije hidrolizira inzulin. Inzulin se na taj način ponaša kao inhibitor razgradnje $A\beta$ putem IDE. U AD smanjena je količina i NEP i IDE. Uz ova dva navedena enzima ulogu u razaranju $A\beta$ imaju i lizosomi pomoću enzima katepsina B. Ipak velike količine $A\beta$ ostaju nerazgrađene te postoje stanični mehanizmi kojima se $A\beta$ prenosi preko krvo-moždane barijere (engl. *blood brain barrier*, BBB) u krvotok. Ukoliko dođe do promjene u tim mehanizmima, dolazi do zaostajanja velikih količina $A\beta$ u mozgu. Topljivi $A\beta$ se prenosi BBB 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 $A\beta$ kroz krvno-moždanu barijeru (Slika 9) (59).



Slika 9. Dvosmjerni protok $A\beta$ kroz krvno-moždanu barijeru preko LRP i RAGE receptora (preuzeto i prilagođeno prema 63): BBB – krvno moždana barijera; ISF – intersticijska (međustanična) tekućina; CSF – cerebro spinalna tekućina (likvor); INSR –inzulinski receptor; NEP - neprilizin; IDE - inzulin razarajući enzim; IRS/PI3/akt - supstrat receptora inzulina (IRS)/fosfoinozid-3-kinaza (PI3)/Akt put; RAGE - receptor za krajnje produkte uznapredovale glikozilacije; ABC – ATP prijenosnik; LRP1 - protein povezan sa lipoproteinima niske gustoće; APP - β -amiloidni prekursor protein.

2.5.4. Neurotoksičnost amiloid β -peptida

Oligomeri $A\beta$ nastaju u mnogo većoj mjeri od $A\beta_{42}$ nego od $A\beta_{40}$. C kraj $A\beta_{42}$ je nužan kako bi došlo do sinteze oligomera. Poznato je da su topljivi oligomeri biološki aktivni i mogu dovesti do stanične smrti u određenim fiziološkim uvjetima, ipak još uvijek je nerazjašnjen način (59). Da bi $A\beta$ peptidi postali toksični moraju tvoriti fibrile, ukoliko ih ne tvore već ostanu u amorfnom stanju nisu neurotoksični. Za konformacijski promijenjeni oblik $A\beta$ koji može potaknuti razvoj fibrila vjeruje se da nastaje u unutarstaničnim kolesterolom bogatim domenama (61). Prvi korak u nastanku fibrila jest nukleacija odnosno formiranje nukleusa agregacije. Pokazano je kako fibrile može stvoriti nukleus od dimera $A\beta$. U fazi elongacije na nukleus se vežu monomeri ili oligomeri $A\beta$ (64). Povećan rizik od AD imaju oni ljudi koji imaju ApoE4 alel koji doprinosi metalom-induciranoj agregaciji $A\beta$, posebice u prisutnosti bakra i cinka. *In vitro* je pokazano da agregaciju potiče i enzim acetilkolinesteraza (AChE). Primijećeno je i da je $A\beta$ /AChE kompleks još toksičniji od samih $A\beta$ fibrila. $A\beta$ u neuronima dovodi do brzog stvaranja vodikovog peroksida i lipidne peroksidacije, tj. oksidacijski stres je uključen u $A\beta$ neurotoksičnosti. $A\beta$ destabilizira homeostazu Ca^{2+} te su neuroni osjetljivi na ekcitoloksičnost, mijenja staničnu ionsku aktivnost na način da stupa u međureakciju s postojećim ionskim kanalima ili potiče stvaranje novih. Za neurotoksičnost $A\beta$ važna je i MAP kinaza (engl. *mitogen-activated protein kinase*) koja mnogobrojnim putevima povećava $A\beta$ neurotoksičnost (nakupljanjem unutarstaničnog Ca^{2+} , reaktivnim kisikovim vrstama, fosfo-tau imunoreaktivnošću i apoptozom). Neurotoksičnost $A\beta$ u konačnici dovodi do apoptoze neurona. $A\beta$ 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-3 β i dovodi do smanjene sinteze ACh (acetilkolin). Također pokazano je da inhibira visoko afinitetni unos kolina i otpuštanje ACh u hipokampusu štakora. $A\beta$ 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 AD. Te se smatra da kolinergična hipofunkcija koju je uzrokovao topljivi $A\beta$ dovodi do osjetljivosti kolinergičnih neuronskih populacija i kognitivnih poteškoća u ranoj fazi AD. $A\beta$ aktivira i mikroglija stanice koje otpuštaju proteolitičke enzime, citokine, slobodne radikale i NO koji djeluju neurotoksično. Dokazane su dvije vrste mikroglijalnih receptora za $A\beta$, to su receptori čistači (engl. *scavenger receptors*) za fibrile i receptor za krajnje produkte uznapredovale glikozilacije (engl. *receptor for advanced glycation end products*, RAGE) za topljivi $A\beta$ (61).

2.6. Tau hipoteza

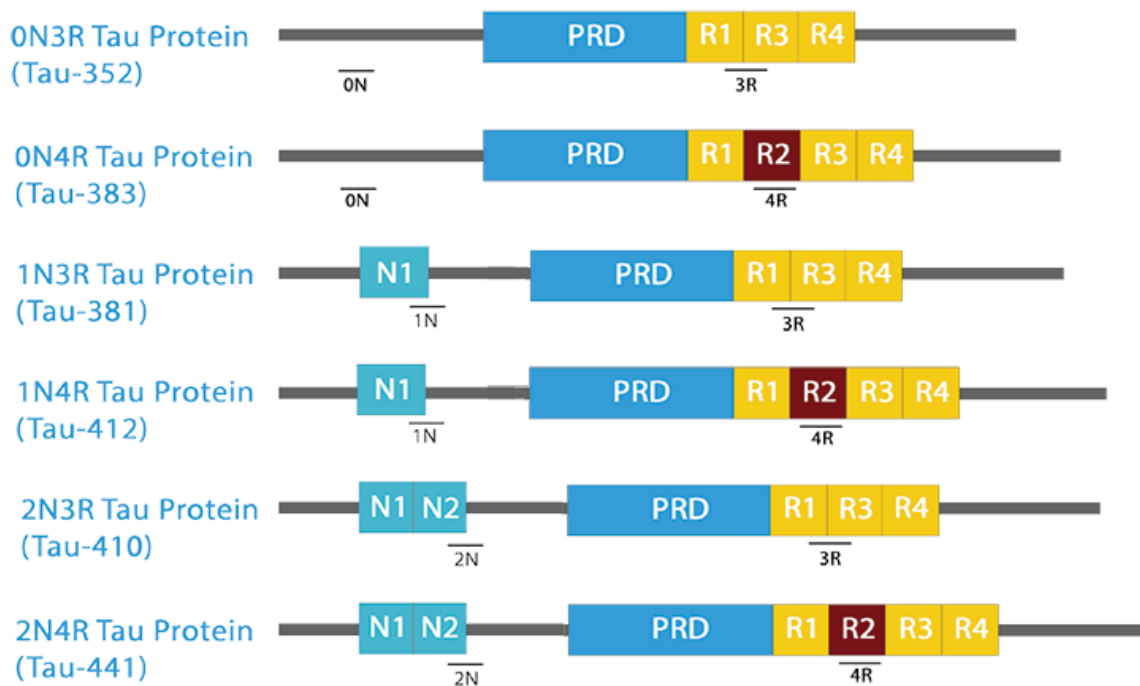
Usporedo s hipotezom amiloidne kaskade istraživali su se i uzroci nastanka nakupina NFT. Protein tau normalan je protein aksona neurona koji se veže na mikrotubule čime potiče njihovo sastavljanje i stabilnost. Hiperfosforilacija proteina tau uzrokuje razgradnju mikrotubula te nakupljanje hiperfosforiliranog oblika proteina unutar stanice zajedno s drugim proteinima vezanim za mikrotubule (30). Posljedica toga je poremećen prijenos unutar aksona i naposljetku smetnje u sinaptičkoj funkciji neurona. Međutim, ostaje nepoznanica je li hiperfosforilacija proteina tau i njegovo unutarstanično nakupljanje uzrok ili posljedica Alzheimerove bolesti. Naime, dok je nakupljanje peptida $A\beta$ i stvaranje senilnih plakova specifično za AD, nakupljanje i porast fosforiliranog oblika proteina tau prisutno je i u drugim oblicima demencija kao i u drugim neurodegenerativnim bolestima (30).

2.6.1. Tau protein

Tau protein pripada skupini proteina pridruženih mikrotubulima (engl. *microtubule-associated proteins*, MAPs) koji ima imaju dva zajednička obilježja: otporni su na obradu visokim temperaturama i kiselinom (ne gube funkciju). Biofizička istraživanja otkrila su da je tau prototip „*natively unfolded*” proteina zbog čega je vrlo fleksibilan i ima nekoliko izoformi. 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 10**) (65).

U svome fosforiliranom obliku tau sudjeluje u izgradnji i stabilizaciji mikrotubula, što znači da mu je kao fosfoproteinu aktivnost 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 AD nalazimo u netopljivom obliku, obliku oligomera i fibrila. U mozgu oboljeloga od AD 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 AD, već se smatra da ga u stanicama ima više jer se ne razgrađuje u mjeri u kojoj bi trebao. Hiperfosforilirani tau je rezistentan na kalcijem aktivirane proteaze, kalpain i ubikvitinski proteosomski put razgradnje. Kod oboljelih od AD nisu pronađene mutacije u genu za tau (66).

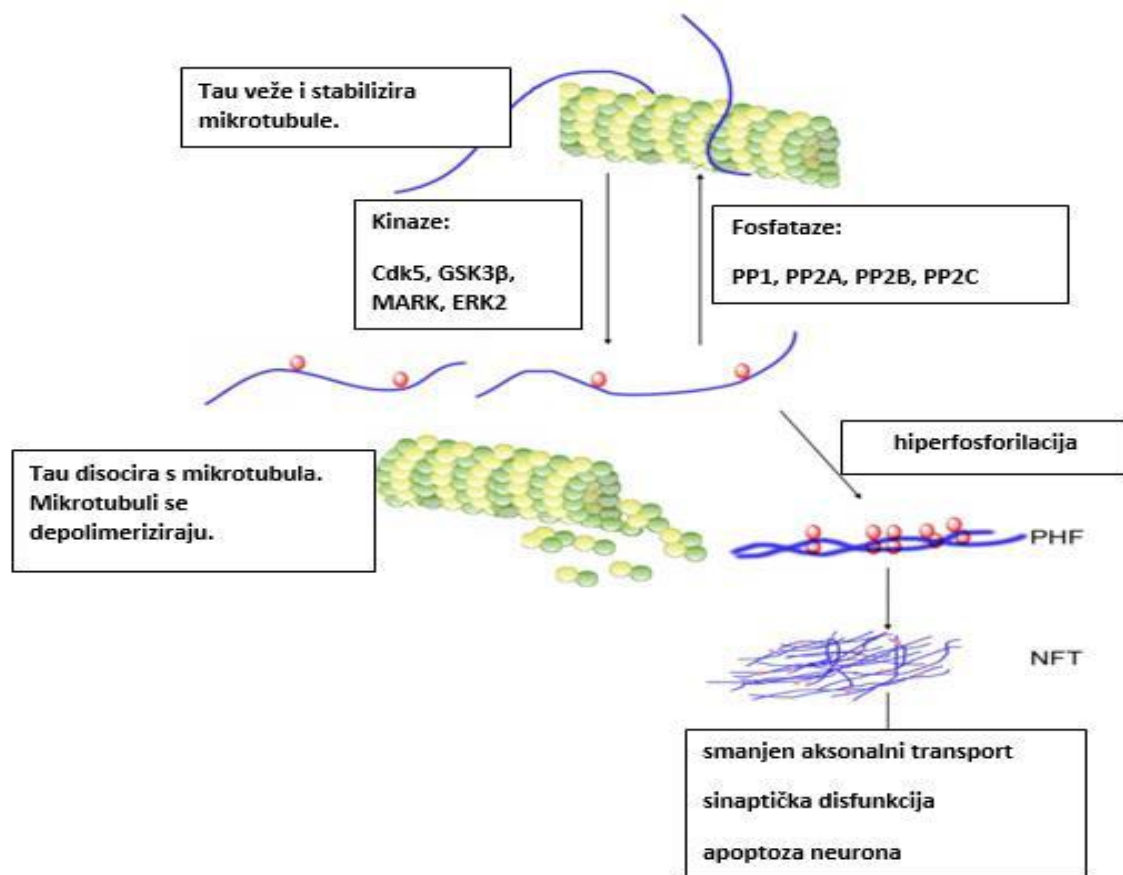


Slika 10. Izoforme Tau proteina (preuzeto i prilagođeno prema 65).

2.6.2. 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 11).

Hiperfosforilirani tau dovodi do smanjenja količine normalnog tau proteina kao i do smanjenja druga dva važna mikrotubulina 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 AD. Istraživanja na staničnoj kulturi neurona i na transgeničnim miševima su pokazala da takav tau potiče fragmentaciju Golgija (66).



Slika 11. Funkcija Tau proteina i promjene do kojih dolazi zbog njegove hiperfosforilacije (preuzeto i prilagođeno prema 67).

Smatra se i da kronično nakupljanje nepravilno smotanog, hiperfosforiliriranog tau proteina može dovesti do neurodegeneracije i zbog dugotrajnog stresa koji nastaje u endoplazmatskom retikulumu (66). Istraživanja su pokazala da postoji poveznica između senilnih plakova i NFT-a. Naime $A\beta$ snopići potiču fosforilaciju tau proteina te dolazi do gubitka sposobnosti

mikrotubularnog vezanja i somatsko-dendritične akumulacije. Tau može fosforilirati više protein kinaza (GSK-3 β , MAP kinaza, ciklin-ovisna kinaza-5) uključujući i protein kinazu A, koja regulira afinitet mikrotubula (engl. *microtubule-affinity-regulating kinase*). Istovremeno A β može povećati aktivnost više vrsta proteinskih kinaza, primjerice GSK-3 β koja tada pojačano fosforilira tau protein (61) te sve zajedno pridonosi patologiji AD.

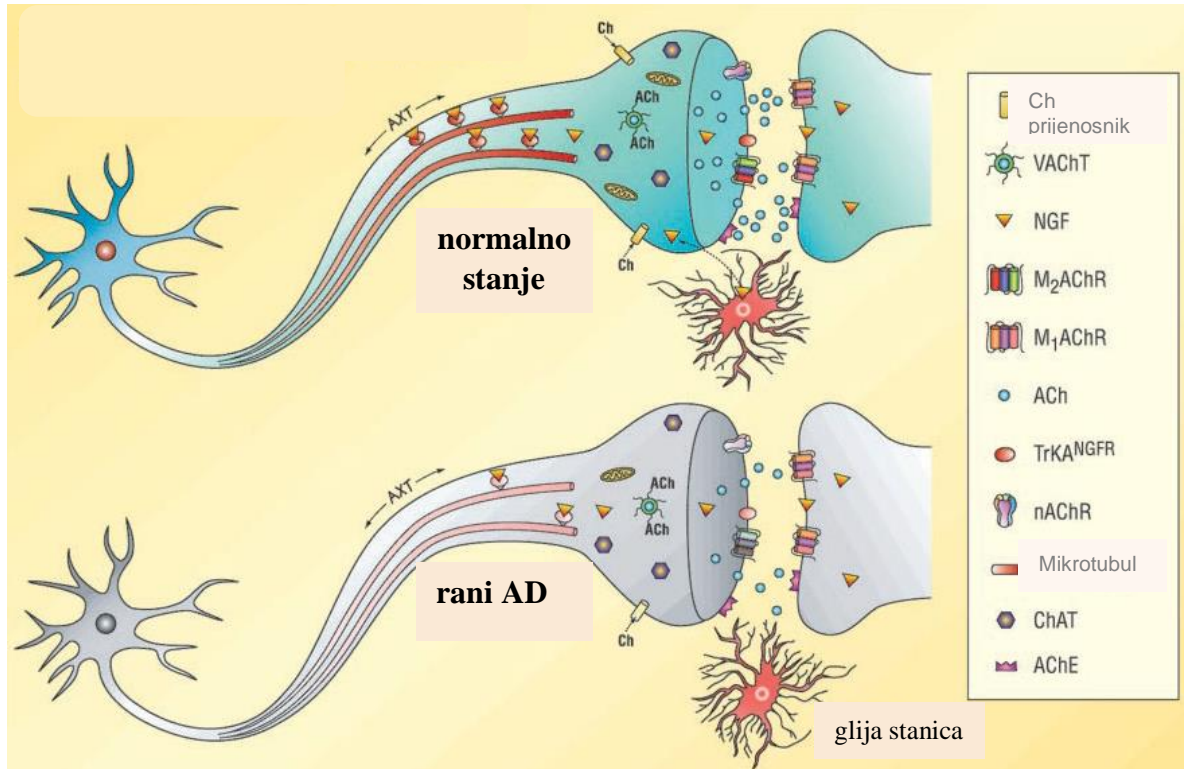
2.7. Kolinergična hipoteza

Jedna od najstarijih hipoteza o nastanku AD je kolinergična hipoteza koja kaže da propadanju kolinergičnih neurona značajno doprinosi pogoršanje kognitivnih sposobnosti. Potvrda toj hipotezi je važna uloga acetilkolina (ACh) u procesima pamćenja (68) i pronađena pozitivna korelacija između stupnja kognitivnih poremećaja i smanjenja koncentracije acetilkolina. Sintaza acetilkolina posredovana je kolin acetiltransferazom (AChE), a smanjena aktivnost tog enzima zamijećena je u AD (53, 69). Smatra se da se povećanjem njegove koncentracije može utjecati na ublažavanje simptoma AD, stoga većina današnjih lijekova su rezultat ove hipoteze. Takrin, donepezil, rivastigmin i galantamin su inhibitori AChE odobreni za kliničku uporabu kod liječenja bolesti.

Jedan od najvećih izazova pojašnjenju AD etiologija je poteškoća u proučavanju najranijih promjena neuronskih funkcija u mozgu i povezanosti tih promjena s kognitivnom i bihevioralnom funkcijom *ante mortem*. Prepreka u razumijevanju uzroka bolesti su i nedostupni uzorci tkiva pacijenata s ranom AD. Stoga je mali broj istraživanja koji je proveden na ovim uzorcima potaknuo nova pitanja vezana uz kolinergičku hipotezu (69). Odgovarajuće rješenje bi mogle ponuditi *in vivo* tehnike snimanja neuroprijenosnih sustava mozga živih bolesnika, koje trenutno još uvijek nisu pouzdane i dostupne za pučanstvo.

Izraženi gubitak kolinergičkih enzima u relevantnim regijama mozga, za koje se dobro zna da se javljaju u kasnoj fazi AD, nije očit u ranoj fazi AD. Prema dosadašnjim istraživanjima vidljivo je da postoje ciljane neuronske lezije tijekom starenja i u najranijim fazama AD-a koje utječu na dinamiku kolinergičke funkcije bez izraženog gubitka ovog enzima. Zapravo, anatomsko selektivna regulacija aktivnosti ChAT-a (kolin-acetiltransferaza, enzim koji katalizira sintezu acetilkolina u citoplazmi iz acetyl-koenzima A i kolina) utvrđena u obdukcijским tkivima mozga subjekata s blago kognitivnim oštećenjima, može predstavljati

pokušaj kolinergičnih neurona da nadoknade funkcionalna oštećenja tijekom otpuštanja signala (69).



Slika 12. Shematski prikaz poznatih i predloženih promjena u kolinergičkim neuronima (preuzeto i prilagođeno prema 69). Promjene u visokom afinitetnom unosu kolina (Ch), oslabljeno oslobađanje acetilkolina (ACh), deficit u ekspresiji nikotinskih (nAChR) i muskarinskih receptora (M_1 AChR i M_2 AChR), disfunkcionalna neurotrofinska potpora (tj. NGF receptori) i deficit u aksonskom prometu predstavljen je u ranom AD neuronu smanjenjem broja predstavljenih simbola ili smanjenim intenzitetom boje. Kratice: VACHT (engl. *vesicular acetylcholine transporter*) - vezikularni prijenosnik acetilkolina; NGF (engl. *nerve growth factor*) - čimbenik rasta živaca; $TrKA^{NGFR}$ (engl. *tropomyosin receptor kinase A - nerve growth factor receptor*) – tropomiozinski receptor kinaze A s afinitetom za receptor NGF-a; nAChR (engl. *nicotinic acetylcholine receptor*) – nikotinski receptor za ACh; ChAT (engl. *choline acetyltransferase*) – kolin acetiltransferaza; AChE (engl. *acetylcholinesterase*) – acetilkolinesteraza.

2.8. Oksidacijska hipoteza

Hipoteza podrazumijeva nastanak neurodegenerativnih patoloških promjena pod utjecajem povišene koncentracije ROS-a. Niže koncentracije antioksidacijskih enzima i velika potreba za kisikom čine mozak osjetljivijim na oštećenja uzrokovana ROS-om što ide u prilog hipotezi. Ta hipoteza dobro se upotpunjuje s hipotezom mitohondrijske kaskade i upalnom hipotezom jer povećane koncentracije ROS mogu nastati uslijed disfunkcije respiratornog lanca unutar mitohondrija, nakupljanja $A\beta$ koji dalje pokreće upalne reakcije i aktivaciju mikroglia stanica koje također proizvode ROS. Uz to, nakupine $A\beta$ mogu vezati metale koji potiču nastajanje vodikovog peroksida (70).

2.8.1. Hipoteza mitohondrijske kaskade

Ta hipoteza podrazumijeva da snižene stope oksidacijske fosforilacije u mitohondrijima, povećano oslanjanje na anaerobnu glikolizu i visoka stopa proizvodnje ROS u konačnici dovode do histopatoloških promjena u AD. Znanstvenici predlažu da prekomjerna proizvodnja ROS u neuronima može poticati stvaranje $A\beta$ iz APP-a što nadalje dodatno reducira aktivnost enzima prijenosnog lanca elektrona. Osim toga, neravnoteža proizvodnje ROS i stope oksidacijske fosforilacije, pokreće u neuronima proces apoptoze. Smatra se da je prekomjerna produkcija ROS u mitohondrijima i disfunkcija stanične energetike poveznica između hipoteze amiloidne kaskade i hipoteze mitohondrijske kaskade nastajanja sporadičnog oblika AD, ali na način da promijene metabolizma u mitohondrijima nastaju ranije i zatim uzrokuju daljnje promjene predložene hipotezom amiloidne kaskade (71).

2.9. Hipoteza neuropale

Već je dugo poznato da patogeni mogu uzrokovati kronične progresivne bolesti CNS-a. Znanstvenici danas sa sigurnošću mogu opovrgnuti zastarjelo mišljenje da je živčani sustav izuzet od međudjelovanja perifernog imunskog sustava organizma i obrnuto, da živčani sustav nema utjecaj na periferni imunski sustav. Poznati su neki od mehanizama njihove međusobne komunikacije, kako u fiziološki uobičajenom okruženju, tako i tijekom patoloških stanja.

Komunikacija se ostvaruje putem autonomnog živčanog sustava, hormona, neuropeptida i citokina. Takva povezanost važna je za bolje i lakše održavanje homeostaze (72).

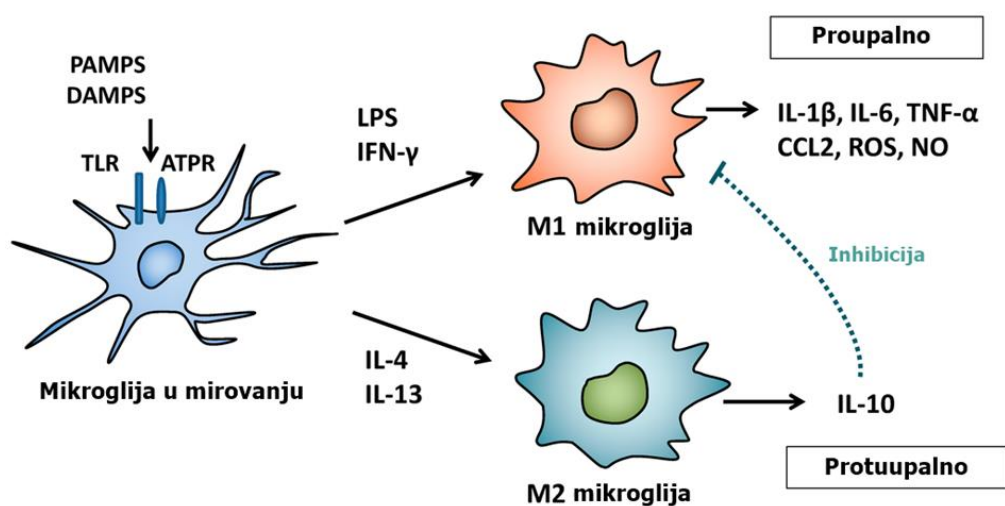
Upale na periferiji mogu utjecati na aktivnost živčanog sustava, često izazivajući upale CNS-a, posebice ako je riječ o produženim kroničnim sustavnim upalama. Upalni procesi u mozgu posljedično izazivaju opadanje kognitivnih sposobnosti kao rezultat odumiranja neurona, a teži oblici dovode i do pojave demencije. Svaka upala započinje lučenjem proupalnih citokina koji zatim reguliraju daljnji proces. Ulazak patogena ili ozljeda pokreću kaskadu lokalnih i sustavnih događaja. Jedan od glavnih proupalnih citokina je interleukin-1 β (IL-1 β). On pojačava proliferaciju T- i B-limfocita te inducira lučenje drugih važnih proupalnih citokina (TNF- α , IL-6). Citokini mogu ući u središnji živčani sustav u području cirkumventrikularnih organa, gdje je BBB propusnija, posredovanim nosačima u slučaju narušene BBB. Osim direktnim djelovanjem u mozgu, citokini mogu djelovati i na aferentne neurone na periferiji (72). Najviše se proučavao IL-1. Osim što utječe na lučenja hormona iz hipotalamusa, ima i važnu ulogu kod upalnih procesa u mozgu. Receptori za IL-1 nađeni su u različitim regijama mozga, a za proučavanje negativnih utjecaja upale na kognitivne sposobnosti važno je spomenuti one u području hipokampusa (73). Kada glasnici upale dođu cirkulacijom do mozga mogu inducirati proizvodnju citokina u parenhimu mozga što rezultira daljnjim razvojem upalnih procesa. Također, zabilježeno je da blokiranje produkcije citokina na periferiji modulira imunski odgovor u središnjem živčanom sustavu (74).

Glavne stanice odgovorne u upali u CNS-u su aktivirane mikroglia stanice. Buduće mikroglia stanice počinju ulaziti i „naseljavati“ središnji živčani sustav tijekom ranog embrionalnog razvitka, već od 4. tjedna gestacije (75). Njihova uloga je dvojaka: 1) zaštita mozga od patogena i 2) popravak moždanog tkiva nakon ozljede mozga. Međutim, mikroglia stanice mogu promijeniti uobičajeni obrazac aktivacije i time postaju štetne za okolne neurone (76).

2.9.1. Mikroglia

Glavni posrednici neuroupalnog odgovora u mozgu su mikroglia stanice. One u svojem mirujućem stanju uklanjaju patogene, stanične ostatke i toksine iz mikrookoliša neurona (77). Također mikroglia stanice su važne u održavanju plastičnosti neuronskog kruga, doprinoseći zaštiti i remodeliranju sinapsi (78). Jednom kada su aktivirane mikroglia stanice proliferiraju i odlaze na mjesto ozljede kako bi svojom fagocitnom funkcijom i otpuštanjem različitih

proupalnih posrednika ponovno povratile homeostazu tkiva. Razičitim istraživanjima je pokazano kako mikroglia stanice ne otpuštaju samo neurotoksične molekule već i neuroprotektivne citokine poput transformirajućeg čimbenika rasta- $\beta 1$ (engl. *transforming growth factor- $\beta 1$* , TGF- $\beta 1$) (79). 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 TNF- α iz stanica T, antigen predočnih stanica ili stanica NK (engl. *natural killer cell*) mikroglia stanice će započeti stvarati proupalne citokine (IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, TNF- α) te kisikove i dušikove radikale. U ovom slučaju govorimo o M1 aktivaciji, koja ima proupalnu ulogu. M2 mikroglia stanice potiču popravak i zaštitu te zaustavljaju imunosti odgovor. M2 mikroglia stanice ovisno o citokinima prelazi u M2a, M2b ili M2c oblik. Ukoliko su mikroglia 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 oblika potiču imunokompleksi (IgG antitijelo-antigen kompleks), Toll-like receptori (TLR) i IL-1 receptorski ligandi. M2b oblik karakterizira velika količina arginaze, IL-1 β , IL-6 i TNF- α te mala količina IL-12. I konačno u M2c oblik prelaze u prisutnosti IL-10, a karakterizira ga ekspresija TGF- β i velike količine IL-10.



Slika 13. M1 i M2 fenotipovi mikroglia stanica (preuzeto i prilagođeno prema 80). PAMPS (engl. *pathogen-associated molecular pattern*) - molekularni uzorci povezani s patogenom; DAMPS (engl. *damage-associated molecular pattern*) - molekularni uzorci povezani s oštećenjem; TLR - Toll-like receptori; ATPR - ATP receptor; LPS - lipopolisahard; IFN- γ - interferon gama; CCL2 (engl. *chemokine (C-C motif) ligand 2*) – kemokinski ligand 2 s C-C motivom; IL – interleukini; ROS – reaktivni spojevi kisika; NO – dušikov oksid.

U istraživanju provedenom na transgeničnom mišjem modelu kod kojega dolazi do nakupljanja $A\beta$ vidjelo se da se mikroglia u neuroupali ne javlja samo u M1, već i u M2 obliku (77). Naime za vrijeme neuroupale mikroglia 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 (79). U AD mikroglia stanica se može vezati za otopljene $A\beta$ oligomere i $A\beta$ fibrile svojim površinskim receptorima: SCARA1, CD36, CD14, $\alpha 6\beta 1$ integrin, CD47 i Toll-like receptorima (TLR2, TLR4, TLR6 i TLR9). Nakon vezanja mikroglia stanica se aktivira i počinje stvarati proupalne citokine i kemokine. Također započinje proces fagocitoze $A\beta$, topljivi $A\beta$ podliježe razaranju izvanstaničnim proteazama dok je $A\beta$ u obliku fibrila često rezistentan na enzimatsku razgradnju. U mikroglia-stanicama najvažnije su proteaze NEP i IDE. Povišene koncentracije citokina i smanjena ekspresija $A\beta$ fagocitnog receptora smatraju se glavnim uzrokom nedovoljnog fagocitnog kapaciteta mikroglia-stanica. Tu hipotezu da mikroglia stanice 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 AD. TREM2 u velikoj mjeri eksprimira mikroglia stanica, a kontrolira fagocitozu staničnih ostataka (78). U AD nekoliko mehanizama među kojima su stvaranje $A\beta$ i pozitivna povratna petlja između upale i procesiranja APP-a dovele su do pojavnosti kronične upale. Stalna izloženost $A\beta$, kemokini, citokini i drugi upalni medijatori odgovorni su za poremećenu funkciju mikroglie u senilnim plakovima (78).

2.9.2. Astroglia

Astrociti su vrsta glija stanica koje u međureakciji s neuronima upravljaju brojnim signalnim putovima i formiranjem sinapsi. Kao i mikroglia mogu se aktivirati na brojne stimulanse. Kod AD je primjećena povećana ekspresija kiselog proteina glijalnih vlakana (engl. *glial fibrillary acidic protein*, GFAP) u tkivu mozga posmrtno (lat. *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 $A\beta$, čini se da uz nju dovode i do amplifikacije amiloidnih nakupina u korteksu na način da potiču izvanstanične kalcijске valove (79). Do aktivacije astrocita dolazi vjerojatno već u ranim fazama AD, prije početka nakupljanja $A\beta$. U animalnim modelima AD rani odgovor je vidljiv iz astroglialne 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. Astroцити такође производе цитокине, интерлеукине, NO и друге потенцијално цитотoksične молекуле након што су изложени $A\beta$. ApoE протеин је важан за уклањање $A\beta$ астрцитима. Lipidacija ApoE узрокована астрцитима повећава способност микроглија-станица да разарају $A\beta$. Такође астрцити потичу повећану експресију изванстаничних протеаза које разарају $A\beta$ као што су: невилizin, IDE, ECE2 (енгл. *endothelin-converting enzyme-2*) и ACE (енгл. *angiotensin converting enzyme*). Astroцити имају улогу и у уклањању отопљеног $A\beta$ из паренхима паравенозном дренажом гдје велику улогу има астрцитни водени канал аквапорин 4 (78).

2.9.3. Sustav komplementa

U mozgu proteine komplementa najviše proizvode mikroglia stanice, a u manjoj mjeri astroцити (78). Brojnim istraživanjima primjećeno je da je u mozgu oboljelih od AD povećana količina proteina komplementa C1q, C4 i C3 u amilodnim plakovima. Proteini komplementa имају велику улогу у покретању неуропале, наиме C1q има способност везања $A\beta$ на њиховим N крајевима и покретање неуропале класичним путем активације комplementa (79). На важност комplementa у развоју AD указује и то што кластерин (топливи инхибитор система комplementa) и CR1 (рецептор за комplement који је укључен у уклањање опсонизираних имунокомплекса и у регулацију C3 конвертазне активности) могу утијецати на развој болести (78).

2.9.4. Medijatori neуропале

Istraživanja su pokazala da je akumulacija $A\beta$ glavni uzrok покретања неуропалног одговора у AD. Izlaganje микроглије $A\beta_{42}$ доводи до повећаног луčenja проупалних циткина IL-1 β , IL-6 и TNF- α те MIP-1 α и M-CSF-a. На мишем моделу AD примjećeno је и да микроглија у неким увјетима ствара IL-12 и IL-23, које уколико инхибирамо смањујемо појавност патолошких промјена карактеристичних за AD. Rizik преласка блажег облика когнитивних poteškoća у фазу деменције у AD је увелике повећан код пацијената с повећаном концентрацијом проупалног циткина TNF- α и смањеном концентрацијом антиупалног TGF- β . За бројне цитокине сматра се да доводе до поремећаја у функцији прије него ли до структуралних промјена. Наиме доводе до супресије дугорочне потенцијације (LTP) синптичког пријеноса сигнала (78).

Citokini stimuliraju inducibilnu dušik oksid sintazu (iNOS) u mikroglia-stanicama i astrocitima da proizvodi velike količine NO-a. U oboljelih od AD povećana je ekspresija iNOS-a, kao i NADPH oksidaze (PHOX). NADPH oksidazu također aktiviraju upalni stimulansi poput $A\beta$ te dolazi do proizvodnje vodikova peroksida koji onda potiče aktivaciju mikroglie. Proizvodi i superokside koji reagiraju s dušikovim oksidom te nastaje peroksinitrit. U oboljelih od AD primjećeno je da NO dovodi do posttranslacijskih modifikacija: nitracija, S-nitrozilacija i stvaranja ditirozina. Dokazano je da nitracija $A\beta$ peptida na tirozinu 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 $A\beta$ suprimira hipokampalni LTP učinkovitije nego nitrirani oblik, što ukazuje da dovodi i do funkcionalnih i do strukturnih oštećenja u mozgu (78).

Kemokini su također važni u AD, jer reguliraju migraciju mikroglie. U AD primjećena je povećana ekspresija CCL2, CCR3 i CCR5 u reaktivnih mikroglia-stanica te CCL4 u reaktivnih astrocita. Također mikroglialna kultura stanica (stanice uzete autopsijom pacijenta koji boluje od AD) nakon eksperimentalnog izlaganja $A\beta$ 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 AD je primjećena povećana aktivnost kaspaze 1, koja izrezuje IL-1 β i IL-18 kako bi iz neaktivnog oblika prešli u aktivan. Katalitička aktivnost kaspaze 1 regulirana je inflammasomima. $A\beta$ fibrili aktiviraju NLRP3 inflammasom tako što dovode do oštećenja lizosoma, a inflammasom onda dovodi do aktivacije kaspaze 1. Ukoliko nema NLRP3 ili kaspaze 1 mikroglia-stanica prelazi iz proupalnog M1 fenotipa u M2 fenotip. Daljnja stimulacija mikroglie s proupalnim medijatorima dovodi do aktivacije apoptotičke kaspaze 8 i kaspaze 3/7. Kaspaza 3 u aktivnom obliku regulira aktivaciju NF- κ B putem PKC δ , što za posljedicu ima povećanu proizvodnju neurotoksičnih proupalnih medijatora poput IL-1 β , TNF- α i NO. Ukoliko se ove kaspaze inhibiraju sprječava se aktivacija mikroglie i neurotoksičnost.

Prostanoidi su derivati arahidonske kiseline sintetizirani uz pomoć cikooksigenaze 1 i 2, koje proizvodi mikroglia. U AD primjećena je povećana razina proupalnog prostaglandina 2 (PGE2) koji se veže na PTGER1-4 receptore. Te receptore eksprimira mikroglia, ali i mnoge druge stanice u mozgu posebice neuroni. Mikroglia PTGER2 receptor inhibira $A\beta$ fagocitozu i povećava neurotoksičnost mikroglie (pokazano *in vitro*). Na mišjem modelu AD pokazano je da delecija PTGER2 i PTGER3 receptora smanjuje oksidacijski stres, neuroupalu, količinu $A\beta$ i ekspresiju BACE1. Ukoliko na mikrogliju djelujemo agonistom PTGER4 receptora dolazi do

zmanjenja upale, dok njegova delecija dovodi do povećanog nakupljanja $A\beta$ i stvaranja proupalnih citokina poput IL-1 β i CCL3 (80). 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 neuroinflammacije, smanjuje nastanak $A\beta$ tako što smanjuje amiloidni način procesiranja APP-a, smanjuje ekspresiju proupalnih citokina i potiče preživljenje neurona. Njegova ekspresija je smanjena već u ranoj fazi AD (78).

2.10. Animalni modeli u istraživanju Alzheimerove bolesti

Do sada su razvijeni brojni animalni modeli koji djelomično prikazuju neuropatologiju koju uzrokuje AD. No niti jedan model ne može pokriti baš sve kognitivne, bihevioralne, biokemijske i histopatološke abnormalnosti koje su uočene kod ljudi (81). Ipak njihova važnost je velika jer svaki od tih modela pomaže nam u detaljnoj analizi, jednog ili dva čimbenika bolesti, koje nismo zbog etičkih razloga u mogućnosti proučavati na ljudima (82).

2.10.1. Transgenični animalni modeli

Stvoreni su brojni transgenični animalni modeli koji stvaraju senilne plakove i imaju neuropatologiju povezanu s $A\beta$. To je postignuto ugradnjom gena za ljudski APP te dolazi do stvaranja $A\beta$, ali i gena za APP s mutacijama koje su prisutne kod obiteljskog tipa AD (81).

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 PSEN1 te je u njima došlo do povećanog stvaranja $A\beta_{42}$ (43), isto je i s transgeničnim miševima s mutiranim PSEN2 genom (81).

2.10.2. *Netransgenični animalni modeli*

Akutno injiciranje $A\beta$ 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 $A\beta_{40}$ dobiven je injiciranjem Alz50-imunoreaktivnih proteina. Injiciranjem netopljivih amiloidnih jezgri (iz mozga AD bolesnika) u mozak štakora također dolazi do neurotoksičnosti (81). Pokazano je da neurotoksičnost fibrila $A\beta$ ovisi o starosti i vrsti pokusne životinje. Primjerice mikroinjektiranje netopljivog $A\beta$ u cerebralni korteks starog Rhesus majmuna rezultira propadanjem neurona, tau fosforilacijom i mikroglijalnom proliferacijom, dok za mlade majmune $A\beta$ nije neurotoksičan. Također neurotoksičnost je veća kod starih Rhesus majmuna nego kod starih Mormozet majmuna, a nije značajna kod starih štakora. Utjecaj $A\beta$ 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 $A\beta$ ulomci poput $A\beta_{40}$, $A\beta_{42}$ i $A\beta_{25-35}$ uzrokuju problem s pamćenjem i učenjem kod miševa i štakora (81).

Animalni modeli za AD s izraženim nastankom i nakupljanjem NFT-a mogu se dobiti kroničnom intracerebroventrikularnom (*icv*) infuzijom fosfataznog 1/2A inhibitora, okadaične kiseline. Ona uzrokuje nastanak NFT-a, APP ekspresiju i nakupljanje $A\beta$.

Animalni modeli Alzheimerove bolesti s kolinergičnom disfunkcijom mogu se dobiti na više načina: elektrokoagulacijom, eksitotoksinima, prerezivanjem fimbrije/forniksa, obradom s kolinotoksinima. Kroničnim izlaganjem životinje *icv* infuziji kvinolonične kiseline dolazi do sporog razvoja neurodegenerativnih bolesti pa i AD. Kod oboljelih od AD 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 najbližnje kognitivnim promjenama koje se javljaju u ranom stadiju AD (81). 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 receptor čimbenika rasta živaca p75NGFR (engl. *nerve growth factor receptor*, NGFR) koji ima mali afinitet vezanja, ali se nalazi u velikom broju na ovoj vrsti neurona te su pogodni da budu cilj monoklalnog 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 *icv* 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 (81).

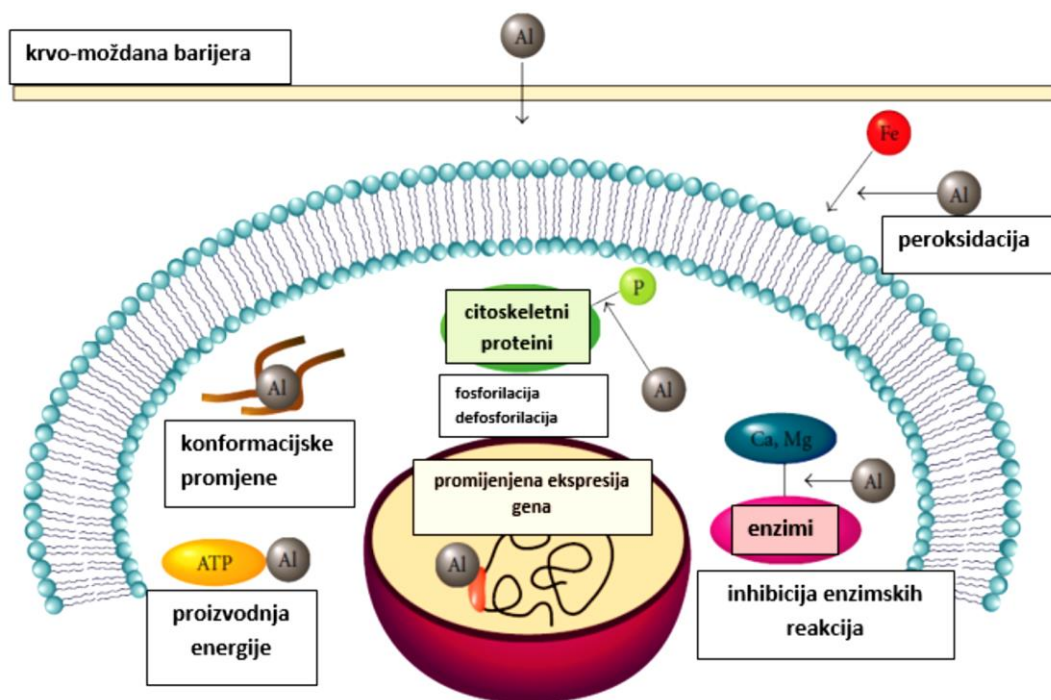
2.10.3. *Aluminijev klorid (AlCl₃) + D-galaktoza (D-gal): animalni model za AD*

Budući da postoji više tipova Alzheimerove bolesti teško je dobiti animalni model koji ju najbolje opisuje. Kod obiteljskog tipa AD otkrivene su mutacije u više gena te se kao model za ovaj tip AD često koriste transgenične životinje. No u sporadičnom tipu AD do sada 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 AlCl₃ i D-gal (83). Ovaj model korišten je i za ovo istraživanje. Da bi razumjeli način na koji AlCl₃ i D-gal uzrokuju pojavnost obilježja karakterističnih za AD, moramo prvo vidjeti kako Al i D-gal zasebno mogu djelovati na mozak.

Aluminij (Al) 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. Al koji uđe u naš organizam hranom i iz okoliša u velikoj mjeri izbacuju bubrezi, ipak Al soli zaostaju u tijelu i nakupljaju se u živčanom sustavu te se Al povezuje s pojavnosću brojnih bolesti poput AD, amiotrofne lateralne skleroze (ALS), poremećaja iz spektra autizma (ASD) i multiple skleroze (MS) (84). Al 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 neuroprijenosnika, sinaptički prijenos (inhibiranjem naponom reguliranih Ca²⁺ kanala i neuroprijenosničkih 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 Mg²⁺ kofaktorom te procese koji uključuju brzu izmjenu Ca²⁺. Al⁺³ se veže za metal vezujuće aminokiseline poput

histidina, arginina, tirozina ili za fosforilirane aminokiseline te ih međusobno povezuje (**Slika 14**).

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 AD za otprilike 70% (85). Naime Al^{+3} dovodi do konformacijskih promjena u $A\beta_{40}$ te potiče njegovu polimerizaciju i akumulaciju, a inhibira razaranje.



Slika 14. Utjecaj aluminija na središnji živčani sustav (preuzeto i prilagođeno prema 85).

$A\beta$ vezan Al je toksičniji od normalnih $A\beta$ jer mijenja homeostazu Ca^{2+} i respiraciju mitohondrija. Al uzrokuje konformacijske promjene i na nekim drugim proteinima važnim za razvoj AD, to su APP, tau i PHF-tau (engl. *paired helical filaments-tau*) (86). Al potiče povećano stvaranje ROS-a i može potaknuti oksidacijska oštećenja kroz više mehanizama. Vezanjem na negativno nabijene fosfolipide mozga, koji sadrže polinezasićene masne kiseline, olakšava napad reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS) 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+} (85). 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 posrednika poput vodikova peroksida i hidroksilnih radikala. Injektiranje Al u mozak štakora uzrokuje jači upalni odgovor, jer dolazi do jače imunoreaktivnosti astrocita i fagocitnih mikroglia stanica. To je utvrđeno procjenom količine glijalnog fibrilarnog kiselog proteina (GFAP) i ED1 (CD68, biljega aktivnosti mikroglia 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% (83).

D-galaktoza (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 (86). Naime unošenje D-gal uzrokuje povećanje razine malondialdehida (MDA) i smanjenje antioksidacijskih 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 (GD) te u CA1 i CA3 regijama hipokampusa, dok se broj bromodeoksiuridin(BrdU)-vezanih proliferacijskih stanica i stanica za preživljenje u GD smanjuje. D-gal smanjuje životni vijek nekih životinjskih modela poput voćne mušice (*Drosophila melanogaster*) i kućne muhe (*Musca domestica*) što se povezuje s povećanjem oksidacijskog stresa. Starenje kod miševa D-gal ubrzava stvaranjem krajnjih produkata uznapredovale glikozilacije (engl. *advanced glycation endproducts*, AGE) (87). 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 lipidne peroksidacije.

Kombinirano unošenje D-gal i AlCl₃ 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 neuroprijenosnik ACh, ali i enzim ChAT koji ga sintetizira te AChE koji ga razara. U AD navedeni enzimi imaju smanjenu aktivnost te posljedično ima manje ACh, takva

se opažanja dobiju i korištenjem ovog AD 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 $A\beta$ ($A\beta40$ i $A\beta42$), nakupljanja plakova i NFT-a što rezultira gubitkom neurona (83).

2.11. Slobodni radikali i oksidacijski stres

2.11.1. Slobodni radikali i reaktivni spojevi

U fiziološkim uvjetima, nusprodukti metabolizma stanice su nestabilne, potencijalno citotoksične molekule znane kao slobodni radikali ili reaktivni oblici kisika (engl. *reactive oxygen species*, ROS) (88). Zbog nesparenog elektrona kojeg posjeduju vrlo su reaktivne i stoga lako reagiraju s drugim molekulama u stanici. ROS uglavnom reagiraju s molekulama stanične membrane, DNA, proteinima ili ugljikohidratima koje se time strukturno i funkcionalno promijene što u konačnici narušava cjelokupnu funkciju stanice (88, 89). Oštećenja stanica uzrokovana oksidacijskim stresom rezultat su poremećene ravnoteže stvaranja i neutraliziranja ROS-a. Stanice posjeduju antioksidacijske enzime čija je zadaća neutralizirati nastali ROS i tako održati homeostazu (90, 91). Slobodne radikale ne predstavljaju samo reaktivne kisikove vrste (ROS), već i drugi oksidansi poput reaktivnih dušikovih radikala (engl. *reactive nitrogen species*, RNS), sulfatnih radikala i drugih (92).

Tablica 1. Nastanak reaktivnih spojeva kisika neenzimskim putem (preuzeto i prilagođeno prema 93)

Fentonova reakcija	$\text{Fe(II)} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe(III)} + \bullet\text{OH} + \text{}^-\text{OH}$
Haber-Weissova reakcija	$\text{O}_2\bullet^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \bullet\text{OH} + \text{OH}^-$ $\text{Fe(III)} + \text{O}_2\bullet^- \rightarrow \text{Fe(II)} + \text{O}_2$

Tablica 2. Nastanak reaktivnih spojeva kisika i dušika enzimskim putem (preuzeto i prilagođeno prema 94)

ksantin oksidaza (XO)	$\text{ksantin} + \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 \rightarrow \text{mokraćna kiselina} + \text{O}_2^{\bullet-}$
NADPH oksidaza (Nox)	$\text{NADPH} + 2\text{O}_2 \leftrightarrow \text{NADP}^+ + 2\text{O}_2^{\bullet-} + \text{H}^+$ $2\text{O}_2^{\bullet-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
mijeloperoksidaze (MPO)	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cl}^- \xrightarrow{\text{MPO}} \text{HOCl} + \text{H}_2\text{O}$
citokrom P450	$\text{NADPH} + \text{H}^+ + \text{O}_2 + \text{RH} \rightarrow \text{NADP}^+ + \text{H}_2\text{O} + \text{R-OH}$
dušik oksid sintaza	$\text{L-arginin} + 3/2 \text{NADPH} + \text{H}^+ + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{citrulin} + \text{NO} + 3/2 \text{NADP}^+$

Tablica 3. Reaktivni spojevi kisika i dušika (preuzeto i prilagođeno prema 92)

Slobodni radikali	Čestice koje nisu slobodni radikali
superoksidni, $\text{O}_2^{\bullet-}$	vodikov peroksid, H_2O_2
hidroksilni, OH^{\bullet}	hipokloritna kiselina, HClO
peroksilni, ROO^{\bullet}	ozon, O_3
alkoksilni, RO^{\bullet}	singletni kisik, $^1\text{O}_2$
hidroperoksilni, HO_2^{\bullet}	
dušikov (II) oksid, NO^{\bullet}	nitrozil, NO nitritna kiselina, HNO_2
dušikov (IV) oksid, NO_2^{\bullet}	dušikov (III) oksid, N_2O_3 peroksinitrit, ONOO^- alkilperoksinitrit, ROONO

2.11.2. *Antioksidacijski sustav*

U svrhu obrane od oksidacijskih oštećenja organizam je tijekom evolucije razvio kompleksan antioksidacijski sustav koji pomaže u očuvanju homeostaze organizma.

Antioksidansi su molekule koje inhibiraju oksidaciju drugih molekula time što se same oksidiraju u reakciji s visokoreaktivnom molekulom poput slobodnog radikala. Njihova fiziološka uloga očituje se u prevenciji oštećenja staničnih komponenti uslijed kemijskih reakcija slobodnih radikala. Glavni mehanizmi koje antioksidansi pokazuju uključuju redukciju metala poput željeza i bakra, vezanje slobodnih radikala doniranjem elektrona ili protona, kreiranje kompleksa s metalnim prooksidansima (keliranje metala), vezanje singletnog kisika te stimuliranje aktivnosti antioksidacijskih enzima. Prvi je mehanizam razbijanja lanca prema kojem primarni antioksidans donira elektron slobodnom radikalu prisutnom u sustavu. Drugi mehanizam uključuje uklanjanje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) i reaktivnih dušikovih vrsta (RNS) uklanjajući katalizator koji započinje lančanu reakciju.

U zdravom organizmu proizvodnja ROS-a i RNS-a regulirana je preko sustava neenzimskih antioksidansa, antioksidacijski enzima i proteina. Antioksidansi skupljaju radikale, smanjuju njihovu proizvodnju i tako sprječavaju nastanak oštećenja uzrokovanih njihovim djelovanjem (95). 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) (96, 97). Kisikovi radikali poput peroksida i superoksida mogu biti neutralizirani različitim antioksidacijskim enzimima poput superoksid dismutaze (SOD), glutationperoksidaze (GPX) i katalaze koji su glavni antioksidacijski enzimi (97).

Ti enzimi mogu doći u više oblika, primjerice imamo 3 oblika SOD: Cu/Zn-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 (97). 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 antioksidacijskih enzima i povećane proizvodnje ROS-a i RNS-a može doći do oksidacijskog stresa, tj. do oksidacijskog oštećenja membranskih lipida (lipidna peroksidacija, LPO) 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 (96).

2.11.3. Oksidacijski stres i neuropala

Metabolički najaktivniji organi najosjetljiviji su na oksidacijski 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 antioksidacijskih enzima (86) 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 oksidacijske 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 neuroprijenos održavanjem razine kalcija (Ca^{2+}). Kalcijevi ioni čiju količinu reguliraju u stanici važni su i u održavanju normalne transkripcije gena. Oksidacijskim stresom oštećena mtDNA, neravnoteža u mitohondrijskom respiratornom lancu i homeostazi Ca^{2+} , ekscitotoksičnost, apoptoza, propusnost membrane i mitohondrijski obrambeni sustav odgovorni su za pojavnost neurodegenerativnih bolesti ili povećanje već postojećih neuralnih disfunkcija i pokretanje neurodegeneracije (98). Ekscitacijske aminokiseline i neuroprijenosnici u mozgu također mogu svojim metabolizmom doprinijeti stvaranju ROS-a (4). 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 neuropale. Upala potom pokreće aktivaciju mikroglia- stanica i astrocita koji stvaraju velike količine dodatnog ROS-a. Na taj način dolazi do kroničnog oksidacijskog stresa (98). 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 oksidacijskim stresom. Aktivirani neutrofil 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 imunskog sustava, može dovesti do njihova prepoznavanja od strane imunskog sustava što dovodi do oštećenja komponenti lipidne membrane (95). 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. Oksidacijski 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 (98).

2.12. Značaj mikrobiote za ljudski organizam

Nedavno je porasla svijest koliko je ljudska mikrobiota značajna za funkcioniranje organizma, a tek se otkriva kakve sve uloge ima u održavanju homeostaze. Naime, rezultati bioinformatičkih istraživanja na razini genoma (engl. *genome wide association studies*) su pokazala kako značajan broj gena za koje se uočila promjena ekspresije u ljudi oboljelih od AD nisu geni ljudskog genoma (4). Točnije, svakim organom našeg organizma koji sadrži mikroorganizme, dominiraju određena koljena mikrobioma. Tako na koži prevladavaju *Actinobacteria*, *Firmicutes* i *Proterobacteria*, dišnim sustavom *Bacteroidetes*, *Firmicutes* i *Proterobacteria*, a urogenitalnim sustavom *Firmicutes* (10). Probavni sustav sadrži 95% ljudske mikrobiote, sadrži otprilike 10^{14} mikroorganizama koje čini 1000 različitih vrsta mikroba i procijenjeno je da mikrobiota probavnog sustava kodira otprilike 4×10^6 različitih gena, a to je 150 puta više od kodirajućih gena koje sadrži genom čovjeka (10). Više od 99% crijevne mikrobiote čine anaerobne bakterije, gljive, praživotinje, arhebakterije i drugi mikroorganizmi. U probavnom sustavu samo dva koljena bakterija su visoko zastupljena: *Firmicutes* (~51%) i *Bacteroidetes* (~48%), a ostalih 1% čine članovi koljena *Cyanobacteria*, *Fusobacteria*, *Proterobacteria*, *Spirochaetes* i *Verrucomicrobia* (4). Pokazalo se kako mikroorganizmi koji su najmanje zastupljeni (1%) imaju najveći utjecaj na bolest i velika je uloga zdrave mikrobiote da drži pod kontrolom proliferaciju patogenih mikroba koji se nalaze u probavnom sustavu (4).

2.12.1. Uloga mikrobiote probavnog sustava u održavanju homeostaze

Mikrobiota probavnog sustava ima važnu ulogu održavanju cjelovitosti stijenke crijeva jer onemogućava adheziju patogenih mikroba na stijenke probavnog sustava kompeticijom za nutrijente i sintetiziranjem antimikrobnih spojeva (10). Također, osigurava proizvodnju mnogih esencijalnih vitamina, osobito iz skupina B i K. Iskorištava energiju iz neapsorbiranih ostataka

hrane sintezom kratkolančanih masnih kiselina (engl. *short chain fatty acids, SCFA*) i time olakšava apsorpciju neprobavljivih sastojaka hrane (7, 9, 10) i pomaže u razgradnji i apsorpciji kompleksnih ugljikohidrata (4). Osim toga, omogućava regulaciju i pravilno sazrijevanje imunosnog sustava zato što mikroorganizmi probavnog sustava razgrađuju kompleksne polisaharide koji apsorbiraju i važni su za stjecanje imunosti prema stranim antigenima (99). Ima važnu ulogu i u metaboliziranju i neutralizaciji karcinogena koji u tijelo uđu hranom (10).

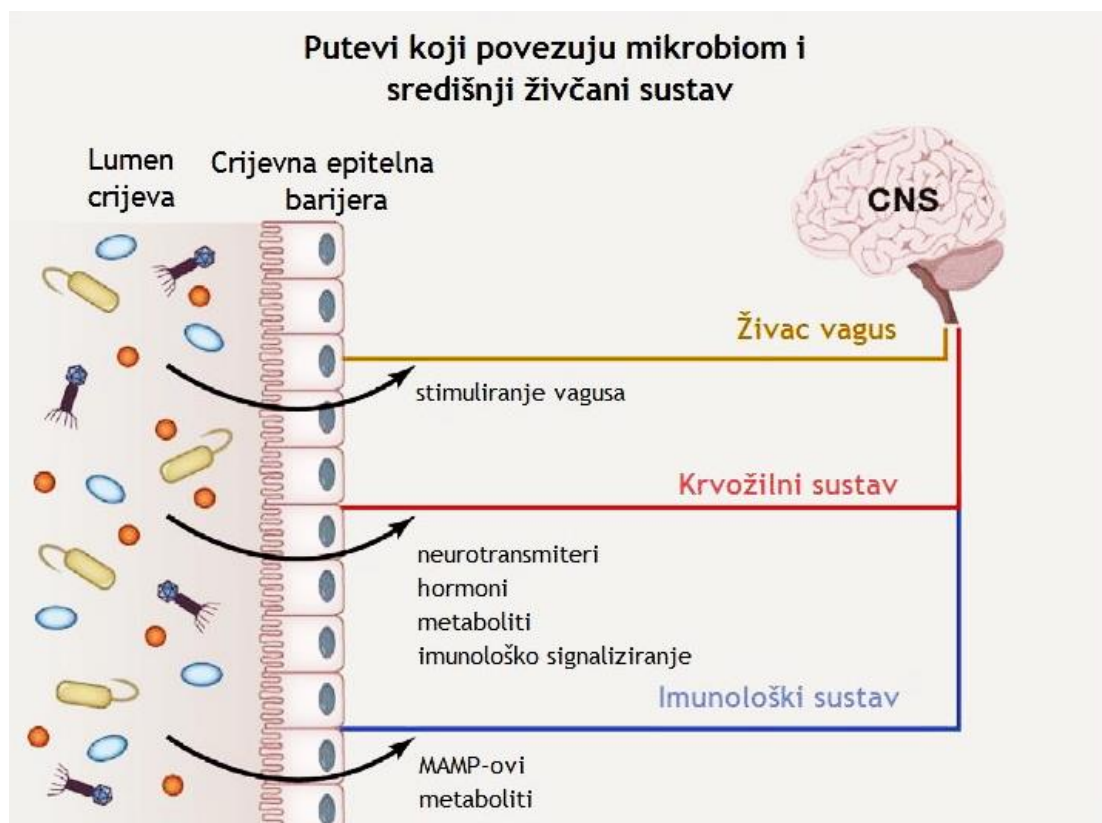
Budući da je starija dob najvažniji rizični čimbenik za AD, promjene u tijelu do kojih dolazi zbog starosti su važne za proučiti budući da bi mogle imati ulogu u razvijanju AD. U starijih ljudi dolazi do promjena mikrobiote, naime *Firmicutes* i *Bacteroidetes* ostaju dominantni, međutim, raste relativni udio *Proteobacteria*, a smanjuje se relativni udio *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* (100). Sa starošću se smanjuje raznolikost mikrobiote, a na to se može utjecati prehranom, načinom života i rehabilitacijom (9). Starenje je povezano s prejakom stimulacijom urođenog i adaptivnog imunosnog sustava, a uz to nedostatak probiotika dovodi do smanjenja proizvodnje SCFA, osobito aminomaslačne kiseline koja ima važnu ulogu u održavanju cjelovitosti crijevnog epitela i kontroli upale. To su razlozi zbog kojih dolazi do blage, ali stalne upale te raste permeabilnost crijevne stijenke i lakša je translokacija bakterija, a i sama upala je temelj za široki spektar bolesti vezanih uz starost, uključujući i bolesti vezanih uz pad kognitivnih mogućnosti (9, 100).

2.12.2. Os mikrobiota-crijeva-mozak

Os mikrobiota-crijeva-mozak (GBA) je dvosmjerni komunikacijski sustav koji je povezan neuralnim, imunosnim, endokrinim i metaboličkim putevima (**Slika 15**), a uloga mu je praćenje i integriranje funkcija crijeva i mijenjanje funkcija crijeva s obzirom na glad, stres i emocije (8, 9). Sastoji se od mozga i leđne moždine, enteričkog živčanog sustava, živaca hormona i drugih molekula kao što su neuropeptidi i citokini (8). Enterički živčani sustav (engl. *enteric nervous system, ENS*) je ugrađen u stijenke crijevnog sustava od jednjaka do anusa, sadrži tisuće ganglija i oko 4×10^6 neurona, više neurona nego bilo koji drugi periferni organ, a otprilike jednako kao cijela leđna moždina (8).

Utjecaj mikrobiote na središnji živčani sustav (engl. *central nervous system, CNS*) se očituje pri normalnom stanju organizma kao za vrijeme bolesti. Sve što utječe na promjene u sastavu mikrobiote posljedično može utjecati i na CNS, primjerice korištenje antibiotika, uzimanje

probiotika, promjena prehrane, permeabilnost crijeva (10). Smatra se da su promjene u dvosmjernoj komunikaciji crijeva-mozak uključene u patogenezu više neuralnih poremećaja kao što su autizam i spektar bolesti sličan autizmu, Parkinsonova bolest, kronična bol (101), Alzheimerova bolest (9), multipla skleroza, Devicova bolest (*neuromyelitis optica*), Guillain-Barré sindrom, tjeskoba i stres (10). Predklinička istraživanja sugeriraju da su mikrobiota i njeni metaboliti uključeni u moduliranje ponašanja i procesa u mozgu, uključujući odgovor na stres, emocije, nošenje s boli, probavu i biokemijske procese u mozgu (101, 102). Kako bi se proučio utjecaj crijevne mikrobiote na GBA, korišteno je više različitih modela kao što su manipulacija antibioticima, zaraza mikrobima, transplantacija fecesa i korištenje modelnih životinja bez mikroorganizama (engl. *germ-free*) (9).



Slika 15. Putevi koji povezuju mikrobiotu i središnji živčani sustav (preuzeto i prilagođeno prema 101).

Preko živca vagusa se ostvaruje izravna komunikacija enteričkog živčanog sustava i središnjeg živčanog sustava, bakterije mikrobiote mogu stvarati molekule koje se prenose krvožilnim sustavom i mogu prijeći krvno-moždanu barijeru ili MAMP-ovima (engl. *microbe associated molecular patterns*) i mikrobnim metabolitima koji signaliziraju imunskim stanicama koje pak mogu utjecati na neurofiziologiju.

2.12.3. Propusnost crijevne barijere

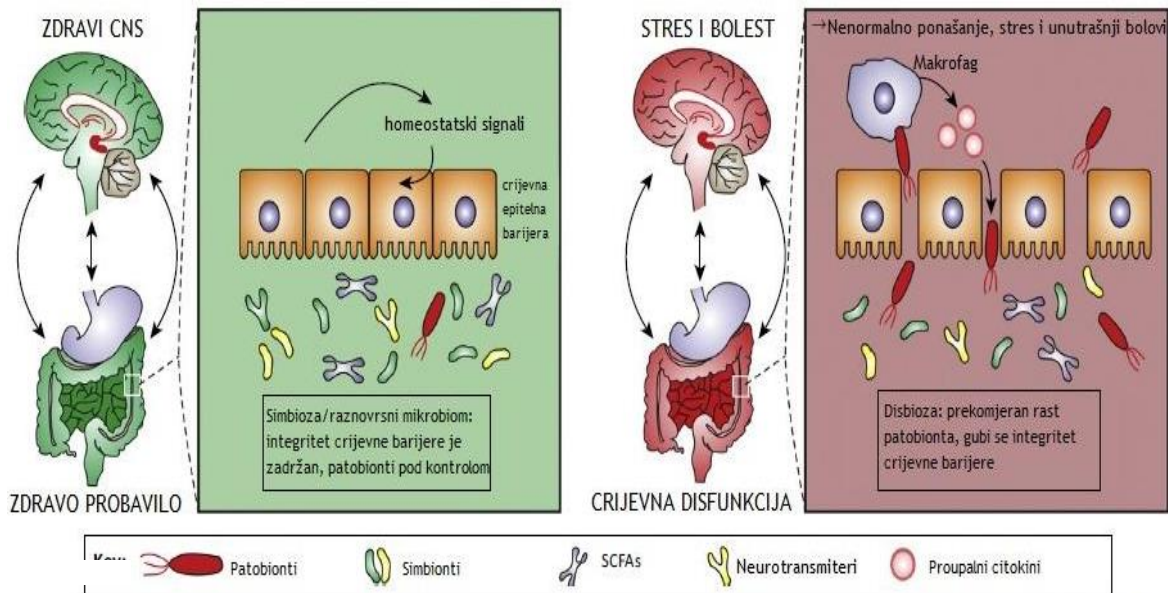
Crijevna barijera mora ispuniti dva kontradiktorna zadatka. Dok s jedne strane, mora biti propusna za vitamine, minerale i hranjive tvari s druge strane, mora nas štititi od prodiranja štetnih bakterija, gljivica, virusa i zagađivača. Dakle, crijevna barijera mora regulirati propusnost vrlo selektivno. Prilikom reguliranja propusnosti, crijevna sluznica djeluje zajedno s bakterijama iz crijevnog ekosustava, s imunosnim stanicama koje se nalaze u crijevima i vegetativnim živčanim sustavom crijeva.

Nepropusnost omogućuju okludni spojevi između epitelnih stanica crijeva (lat. *zonula occludens*: ZO-1, ZO-2, ZO-3; poznati kao čvrsti spojevi, engl. *tight junctions*, TJs). Multiproteinski spojni kompleksi koji zatvaraju međustanični prostor te djeluju kao paracelularna difuzijska barijera, a čine ih okludini i kladini sa zonulinom koji ih pričvršćuje na mrežu aktomiozina unutar epitelnih stanica. Poremećaj cijelovitosti i funkcije crijevne barijere naziva se crijevna propusnost (engl. *leaky gut*).

Zonulin je protein odgovoran za regulaciju TJs između epitelnih stanica crijevne barijere. Posredstvom raznih podražaja, koje emitira sluznica crijeva, zonulin se veže na specifične receptore na epitelnim stanicama crijeva putem protein-kinaze posredovane C-alfa polimerizacijom aktina. To uzrokuje kontrakciju proteina citoskeleta, što dovodi do otvaranja prostora između epitelnih stanica. Analiza razine zonulina daje uvid u propusnost crijevne barijere; povećana razina zonulina korelira sa smanjenom funkcionalnošću crijevne barijere i povećanom propusnosti crijeva. Povećana crijevna propusnost se može pojaviti u kontekstu s kroničnim upalnim bolestima crijeva, poremećajima ekosustava crijevne mikrobiote, celijakijom i nekim drugim autoimunim bolestima. Netolerancija na hranu ili sustavna aktivacija imunosnog sustava koja potječe iz crijeva može biti posljedica povećane propusnosti crijeva (103).

U slučaju povećane propusnosti crijevne barijere, komponente iz hrane se probavljaju otežano te je uočena znatno lošija apsorpcija. Osnovni elementi u tragovima, kao što su cink, selen, bakar, magnezij, mangan, ili krom, imaju ključnu ulogu kao kofaktori brojnih enzima. Već manji nedostatak može dovesti do smanjenja kognitivnih sposobnosti ili povećane osjetljivosti na infekcije. Osim toga, neki minerali imaju izravan utjecaj na crijeva te poput cinka izravno djeluju na obnavljanje crijevne barijere. Dakle, za pacijente s povećanom razinom zonulina

dostatna opskrba mineralima od vitalne je važnosti. Kako bi se izbjegla nedostatnost minerala, doziranje bi trebalo biti regulirano u skladu s individualnim mineralnim statusom (104).



Slika 16. Os mikrobiota-crijeva-mozak u zdrave i bolesne osobe (preuzeto i prilagođeno prema 103). (Lijevo)

Kad je organizam zdrav, simbiotske bakterije, zdravi urođeni imunostni sustav i crijevna epitelna barijera kontroliraju patobionte i njihov rast u crijevima te se zbog zdrave funkcije crijeva omogućuje dobra komunikacija između CNS-a i crijevne mikrobiote. (Desno) Pri patološkim stanjima crijevna disbioza dovodi do promjena u crijevnoj mikrobioti i poremećene signalizacije na osi crijeva-mozak. Zbog povećanog rasta patobionta može doći do upale, a makrofagi doprinose patogenezi lučenjem proupalnih citokina. Dolazi do gubitka funkcije crijevne barijere zbog čega je moguća translokacija patogenih bakterija i njihovih komponenti u krvožilni sustav gdje se aktivira urođeni imunitet kojeg karakteriziraju stvaranje proupalnih citokina, sustavna upala i poremećena funkcija crijeva. Ti mehanizmi mogu dovesti do poremećenih funkcija CNS-a kao što su ponašanje, odgovor na stres i spoznaja.

Teški metali, kao što su živa, srebro, kositar, olovo, paladij ili aluminij, mogu dospjeti u crijevo prilikom konzumiranja kontaminirane hrane ili oslobađanja metala iz zubnih pomagala. Nažalost, toksični metali prisutni su u velikoj mjeri te njihova nazočnost je povezana s crijevnom propusnošću, povećanom apsorpcijom toksina u organizam i višom razinom toksičnog stresa.

2.12.4. Poveznica između propusnosti crijevne i krvno moždane barijere

Kako bismo razumjeli moguću vezu između propusnosti crijeva (engl. *leaky gut*) i moguće propusnosti mozga (engl. *leaky brain*), potreban je osvrt na barijere u fiziološkim uvjetima. Krvno-moždana barijera (engl. *blood– brain barrier*, BBB) sastoji se od kapilara endotelnih stanica, mikrovaskularnih pericita, astrocita i perivaskularnih mikroglija stanica. Međustanični čvrsti spojevi (engl. *tight junctions*, TJs) endotelnih stanica predstavljaju jedinu anatomsku barijeru između krvotoka i mozga. TJs, nekad smatrani statičnim strukturama, su, u stvari, dinamični i lako prilagodivi raznim razvojnim i patološkim promjenama. Međutim, regulatorni mehanizmi na kojima se temelji ova prilagodba još uvijek su nedovoljno razjašnjeni (105).

Dosadašnja istraživanja na području GBA ističu dva proteina kao modulatore TJ-a važne u narušavanju barijera: zonulin i zonula okluden toksin (Zot). Zonulin i njegov prokariotski analog Zot koji je razvio *Vibrio cholerae*, uzrokuju polimerizaciju aktina ciljanih stanica što dovodi do rastavljanja kompleksa TJs kroz mehanizam ovisan o protein kinazi C (103). Svaki član obitelji zonulin/Zot ima molekularnu masu ~47 kDa i način vezanja N-terminalnih receptora za osam aminokiselina. Supstitucijom amino kiseline u mjestu vezanja N-terminala identificirani su aminokiselinski ostaci koji diktiraju specifičnost tkiva (103, 104). Biokemijska karakterizacija dala je dokaz da je zonulin/Zot receptor glikoprotein koji sadrži više ostataka sijalne kiseline. Usporedba N-terminalnih slijedova zonulinskog/Zot receptora s ostalim proteinskim slijedovima BLAST analizom pokazala je upečatljivu sličnost sa MRP-8, članom 14 kDa iz S-100 porodice proteina koji se vežu za kalcij (103).

Mnoge bolesti i stresori koji utječu na CNS također mijenjaju funkcionalnu cjelovitost BBB-a. Oni utječu na sposobnost barijere da selektivno ograničavaju prolazak tvari iz krvi u mozak. K tome, upala i upalni proces mijenjaju svojstva propusnosti i doprinose promjenama CNS-a, što dovodi do promijenjene isporuke terapijskih sredstava u mozak.

Nedavno je nekoliko istraživanja sugeriralo da mikrobiota može izravno utjecati na mozak i crijeva na nekoliko načina, uključujući doprinos u stvaranju BBB-a tijekom embrionalnog razvoja. U tom pogledu, amniotska tekućina nije sterilna, i razvoj BBB-a i bilo koje mikrobnog migriranje i gravitiranje započinje u ranom razvoju i nastavlja se nakon rođenja. Štoviše, prisutnost bakterija povezuje se s razvojem bolesti, ali istodobno je bitna za razvoj imunosti i barijera. Vitalni organi i biološki sustavi razvili su prepreke za infekcije i pasivnu difuziju otopljenih tvari i proteina u tkiva, sve u svrhu preživljavanja domaćina (106).

Funkcionalna BBB ključna je za održavanje homeostaze središnjeg živčanog sustava. Dakle, selektivna propusnost je ključna za ograničavanje kretanja tvari iz sustavne cirkulacije do mozga ili drugih organa koji sprječavaju organe od brzih promjena u ionskim ili metaboličkim uvjetima. Ograničena propusnost BBB-a također štiti mozak od izloženosti molekulama koje mogu biti bezopasne za periferne organe, ali prilično toksične za ranjive neurone u hipokampusu i drugim dijelovima mozga. Cjelovitost epitela također zahtijeva ravnotežu između stanične proliferacije i stanične smrti (106).

Disfunkcija BBB koja vodi do „*leaky brain*“ može se povezati s različitim neurološkim bolestima, uključujući poremećaj autističnog spektra (ASD), demenciju, Alzheimerovu bolest, depresiju i shizofreniju. Prodor BBB zabilježen je u većine bolesnika s psihijatrijskim bolestima (106). Nadalje, BBB može postati „propusna“ za odabrane neurološke bolesti koje imaju imunosnu komponentu, poput multiple skleroze (MS), Alzheimerove bolesti, traume mozga, edema i karcinoma mozga, amiotrofične lateralne skleroze (ALS), meningitisa i sustavnih bolesti poput zatajenja jetre. Štoviše, ko-metabolizam u međureakciji crijeva-mozak-endokrini susstav igra ulogu u istim neurodegenerativnim poremećajima, uključujući Parkinsonovu bolest (PD), pa čak i autizam, čini se da u svojoj patogenezi ima komponentu koju pokreće mikrobiota. Propusnost i poremećaj BBB utvrđeni su kod Alzheimerove bolesti (AD), zbog čega je omogućen ulaz periferne krvi, amiloida beta i citokina u mozak, što doprinosi patogenezi ranjivih neurona. Nedavno je opisano kako mikrobiota probavnog sustava igra važnu ulogu u kontroliranju pojedinih dijelova našeg sustava povezujućih ih u jedinstvenu cjelinu te čine važni dio naše neurobiologije, mentalnog, bihevioralnog, pa čak i cjelokupnog zdravlja, uključujući pamćenje, depresiju, poremećaje raspoloženja i anksioznost (106).

2.13. Polifenoli

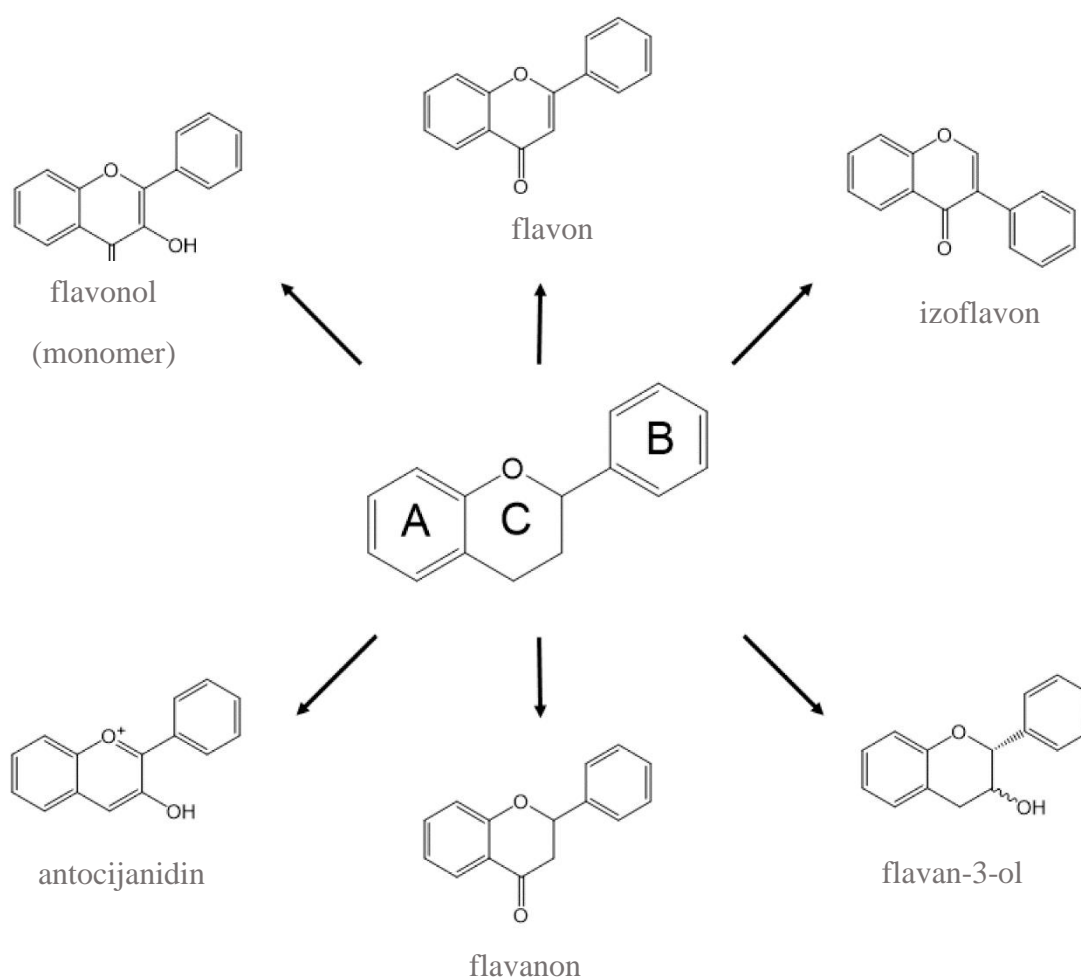
Polifenoli su sekundarni metaboliti koji su sveprisutni u mnogim dijelovima biljke, uključujući laticu, lišće, pulpu, stabljiku i korijenje. Nisu izravno odgovorne za rast i razvoj biljaka, ali su potrebne da biljka opstane u svom okruženju (107). Biljkama primarno služe kao molekule uključene u obranu od UV zračenja ili napada patogena, pigmentaciju, rast, razmnožavanje i antioksidacijsku zaštitu (108). Iako se fenolni spojevi najčešće spominju kao spojevi s fenolnim prstenom oni su zapravo veoma raznolika skupina sekundarnih metabolita zbog čega su u

literaturi prisutni mnogi načini njihove klasifikacije: prema strukturi, na temelju broja ugljikovih atoma u molekuli, na temelju biološke aktivnosti, biosintetskog puta i sl. (109). Svi polifenoli nastaju od zajedničkog posrednika, fenilalanina, odnosno bliskog prekursora šikiminske kiseline (110). Postoji preko 8000 strukturnih varijanti fenolnih spojeva, a općenito se kategoriziraju na flavonoide i neflavonoide (111). Posljednjih godina mnogo se pozornosti pridaje njihovoj potencijalnoj ulozi funkcionalnih sastojaka hrane (112). U 2013., Del Rio i sur. (113) pregledali su više od 500 publikacija usredotočenih na bioraspoloživost prehrambenih polifenola i njihovo zaštitno djelovanje protiv kroničnih bolesti. Prvi izvještaj o pozitivnom učinku flavonoida citrusa (hesperidin i rutin) datira iz 1936. (114). Epidemiološka istraživanja na nizozemskoj populaciji iz 1993. dokazuje povezanost između visokog unosa flavonoida i smanjenja smrti zbog aterosklerotskih promjena krvožilnog sustava (115), što je pružilo poticaj za daljnja istraživanja bioraspoloživosti i bioučinkovitosti flavonoida kao funkcionalnih sastojaka hrane (116).

Većina istraživanja polifenola usmjerena je na pozitivne učinke u liječenju ili ublažavanju mnogih patoloških stanja, zbog dokazane sposobnosti polifenola da inhibiraju specifične enzime, stimuliraju hormone i neuroprijenosnike, keliraju prijelazne metale poput bakra i željeza, moduliraju receptore i interferiraju sa staničnim signalnim putovima te neutraliziraju oksidacijske procese slobodnih radikala u organizmu ljudi i životinja (117, 118, 113). Polifenoli mogu djelovati kao antioksidansi na nekoliko načina, tj. moraju zadovoljiti dva uvjeta: (a) kada su prisutni u maloj koncentraciji u odnosu na tvar podložnu oksidaciji, moraju bitno usporiti ili spriječiti reakciju oksidacije; (b) nastali radikali moraju biti stabilni da ne bi poticali lančanu reakciju (93). Najučinkovitiji su kada neutraliziraju slobodne radikale i tako prekidaju lančanu reakciju slobodnog radikala. Antioksidacijski potencijal polifenola ovisi o kemijskoj strukturi molekule, odnosno o fenolnoj strukturi od koje potječu antioksidacijske sposobnosti. Glavne strukturne značajke polifenola važne za sposobnost neutraliziranja slobodnih radikala jesu: hidroksilne skupine, *O*-metilacija, 2-3 veze u konjugaciji s 4-keto skupinom, glikozidacija te stupanj polimerizacije (119).

Neki polifenolni spojevi, osim vrlo korisne antioksidacijske aktivnosti, mogu pod određenim uvjetima pokazivati i negativno prooksidacijsko djelovanje (120-122). Naime, umjesto da antioksidans završi lančanu reakciju slobodnog radikala na način da reagira s idućim slobodnim radikalom, fenoksi radikal može reagirati s kisikom i stvoriti štetne spojeve poput semikinona i kinona ($P = O$), superoksidnog anion ($\cdot O_2^-$) i vodikovog peroksida ($PO\cdot + O_2 \rightarrow P = O + \cdot O_2^-$) (122-125). Ion prijelaznog metala poput dvovalentnog iona bakra također može inducirati

prooksidacijsko djelovanje fenolnog spoja koje je proporcionalno ukupnom broju hidroksilnih skupina. Glikozidacija i metiliranje hidroksilnih skupina smanjuju prooksidacijsko svojstvo fenolnog spoja (117, 126). Prooksidacijsko djelovanje polifenolnih spojeva uglavnom se očituje u određenim uvjetima, koji omogućuju njihovu autooksidaciju, primjerice visoka koncentracija antioksidansa, visoki pH s visokom koncentracijom redoks-aktivnih prijelaznih metala i prisutnom molekulom kisika (125).



Slika 17. Generičke strukture glavnih flavonoida (preuzeto i prilagođeno prema 107).

2.13.1. Flavonoidi

Flavonoidi su najpoznatiji fenolni spojevi i svrstavaju ih u 12 podskupina: (a) u hrani prisutni u velikim količinama (flavonoli, flavoni, izoflavoni, flavan-3-oli, flavanoni te antocijani koji uključuju i antocijanidine) i (b) ostale koji se u hrani nalaze u vrlo malim količinama (halkoni, dihidrohalkoni, dihidroflavonoli, flavan-3,4-dioli, kumarini i auron) (126, 127, 112). Za flavonoide je karakteristično da imaju C6-C3-C6 kostur, koji sadrže 2 aromatska prstena povezana s 3-ugljikova mosta (112). Nalaze se u mnogim biljkama, koncentrirani u sjemenkama, pokožici ili kori voća, kori drveća, lišću i cvijeću (128). Do danas je poznato više od 5000 flavonoida (128, 129). Flavonoidi se međusobno razlikuju prema stupnju oksidacije centralnog prstena, izuzev halkona i dihidrohalkona kod kojih je piranski prsten otvoren. Mogu biti hidroksilirani, metoksirani, glikozidirani s monosaharidima ili oligosaharidima, a često su esterificirani organskim kiselinama. U prirodi flavonoidi dolaze u slobodnom ili konjugiranom obliku, a u biljkama se najčešće nalaze u obliku glikozida zbog šećerne grupe ili više njih koje su povezane preko -OH (*O*-glikozid) ili ugljik-ugljik (*C*-glikozid) veze. Pronađeno je više od 60 šećera koji su povezani na ovakav način s flavonoidima. Glikolizacija flavonoida uglavnom se događa na položaju C-3, a rjeđe na položaju C-7 (128). Najčešći glikozidi su glukozid, glukuronid, galaktozid, arabinozid, ramnozid, apiozilglukozid i malonil (130, 131). Osim u obliku glikozida, flavonoidi mogu biti prisutni i u nestabilnoj formi aglikona (132, 133).

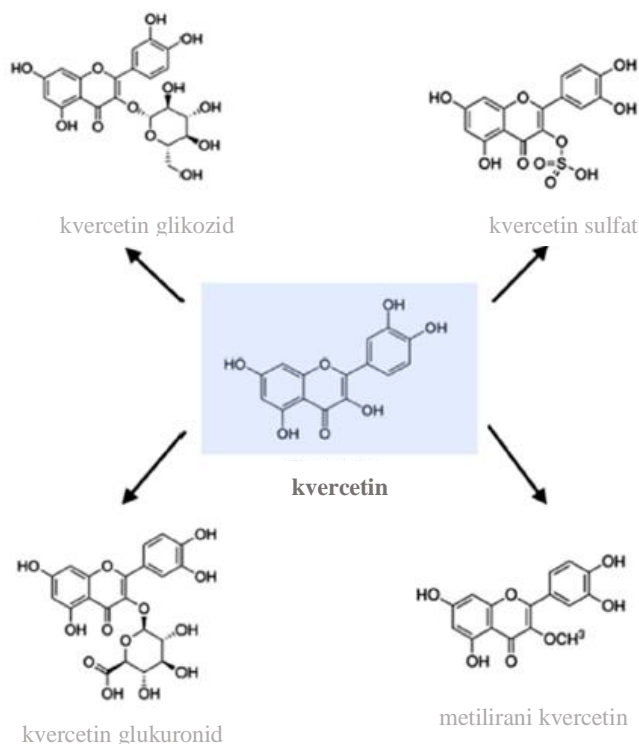
Aktivnost flavonoida ovisi o kemijskoj strukturi, stupnju hidroksilacije, ostalim zamjenama u strukturi poput konjugata, ili stupnja polimerizacije (134).

2.13.1.1. Flavonoli: kvercetin

Flavonole karakterizira osnovna C6-C3-C6 struktura, pojavljuju se u nadzemnim dijelovima biljaka, dok su u biljnim dijelovima koji se razvijaju ispod površine zemlje nađeni samo u tragovima. U flavonole spadaju kvercetin, miricetin, kampferol, morin, galangin, a njihovi glikozidi (rutin, astragalin) su dominantni predstavnici ove skupine flavonoida (131). Najčešći aglikoni flavonola kvercetin i kampferol sami imaju najmanje 279 do 347 različitih glikozidnih kombinacija (135, 136). Ovi flavonoli su u potpunosti netopljivi u hladnoj vodi, slabo topivi u vrućoj vodi, ali prilično topivi u alkoholu i lipidima te su žute boje (127, 135). Aglikoni flavonola nisu prisutni u biljkama, ali ako su i prisutni, vjerojatno su rezultat nekog procesa obrade hrane kao što je zamrzavanje, sterilizacija ili fermentacija (127).

Kvercetin (3,5,7,3',4'-pentahidroksi flavon) je odabran je kao vodeći spoj u razvoju protuupalnog sredstva zbog niske pojavnosti čira na želucu te zbog inhibicijskog djelovanja na proizvodnju prostaglandina (PG), COX-2 i nuklearnog čimbenika- κ B (NF- κ B). Pokazao se i kao dobar čistač ROS-a i kelator prijelaznih metalnih iona kao što su Fe i Cu (135).

Kvercetin je široko rasprostranjen u biljkama. On se nalaze u raznim namirnicama, uključujući jabuke, bobice, kupusnjače, kapare, grožđe, luk, ljutike, čaj i rajčice, kao i mnoge sjemenke, orašaste plodove, cvijeće, koru i lišće. Također je pronađen u medicinsko-ljekovitom bilju, uključujući *Ginkgo biloba*, *Hypericum perforatum* i *Sambucus canadensis* (137, 115, 138). U crvenom luku, veće koncentracije kvercetina javljaju se u najudaljenijim prstenovima i u dijelu najbližem korijenu, koji s vremenom postaje dio s najvišom koncentracijom kvercetina (139). Jedno je istraživanje pokazalo da organski uzgojena rajčica ima 79% više kvercetina od voća uzgojenog pomoću kemijskih sredstava (140). Također je prisutan i u različitim biljnim medovima (141). U ispitivanoj hrani najviša koncentracija je 234 mg/100 g jestivog dijela u kaparima (sirovi), a najmanja koncentracija je 2 mg/100 g jestivog dijela u crnom ili zelenom čaju (*Camellia sinensis*) (142). Dnevni unos flavonola praćen u dosadašnjim istraživanjima ovisi o geografskom položaju zemlje i prehrambenim navikama populacije (140) te se kreće 50-800 mg/danu, udio kvercetina je 75% (143).



Slika 18. Izoforme kvercetina (preuzeto i prilagođeno prema 135).

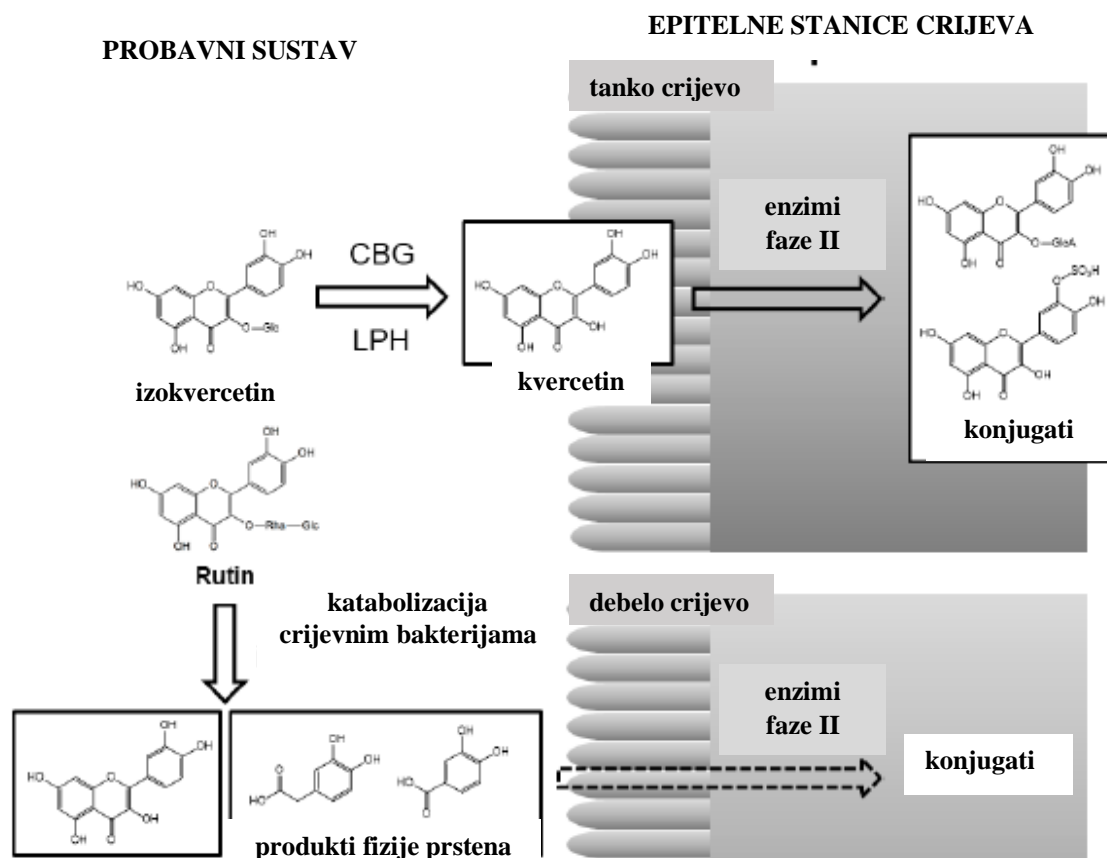
1.13.1.2. Apsorpcija, bioraspoloživost i metabolizam kvercetina

Prvo ispitivanje farmakokinetike kvercetina kod ljudi sugeriralo je vrlo slabu oralnu bioraspoloživost nakon jednokratne oralne doze (~ 2%). Procijenjena apsorpcija kvercetin glukozida, prirodni oblik kvercetina, kreće se 3-17% u zdravih pojedinaca koji su primili dozu 100 mg (136).

Relativno niska bioraspoloživost kvercetina može se pripisati njegovoj niskoj apsorpciji, velikom metabolizmu i/ili brzom uklanjanju (144). Kvercetin se, nakon unosa, oslobađa iz hrane već u usnoj šupljini gdje stupa u međureakciju s proteinima iz sline formirajući kvercetin-protein binarne agregate. Niski pH želuca i djelovanja bakterija vode razgradnji kvercetina do fenolnih kiselina koje se mogu apsorbirati u želucu za razliku od kvercetin aglikona i kvercetin-glikozida koji se ne apsorbiraju u želucu. Općenito, polifenoli male molekularne mase djelomično se apsorbiraju u tijelo izravno; u tankom crijevu kvercetin-aglikon podliježe glukuronidaciji i metilaciji, a kvercetin glikozidi se deglikoziliraju do kvercetin-aglikona uz pomoć crijevne mikrobiote (145). Međutim, pojedini polifenoli niske molekularne mase u izvornom se obliku prenose u debelo crijevo. Nakon čega ih kataboliziraju enterobakterije ili se izlučuju izmetom bez crijevne apsorpcije (146, 147). Bolja apsorpcija kvercetin-3-*O*-glukozida u odnosu na aglikon kvercetin se pripisuje membranskom prijenosniku SGLT-1 (natrij ovisan glukozni prijenosnik) koji glukozide prenosi u lumen enterocita gdje su potom supstrati za citosolnu β -glukozidazu (CBG) široke specifičnosti. Drugi mehanizam koji potpomaže apsorpciju glukozida je laktaza-florizin hidrolaza (LPH) smještena na membrani enterocita s aktivnim mjestom okrenutim prema lumenu crijeva. Svojom aktivnošću otpušta aglikone koji potom mogu pasivno difundirati kroz membranu. U tankom crijevu se apsorbira većina flavonoidnih glikozida te se cijepaju pomoću crijevnih bakterija ili ljudskih enzima β -glukozidaze čime nastaju aglikoni. Samo 5% prehranbenih polifenola se apsorbira u tankom crijevu, dok ostalih 95% unosa prolazi do debelog crijeva gdje fermentira pod utjecajem mikrobiote (144).

Nastali aglikoni se u stanicama crijeva pretvaraju u konjugate *O*-glukuronida/*O*-sulfata pomoću enzima faze II (**Slika 19**) (145). Konjugirani metaboliti se prenose u jetru, gdje se dalje metaboliziraju, nakon čega ili ulaze u krvotok ili se vraćaju u probavni sustav enterohepatičkom cirkulacijom. Ukupna koncentracija konjugiranih metabolita može doseći mikromolarne razine unutar nekoliko sati, a zatim gotovo nestaju nakon 24 sata (148). Na varijabilnost apsorpcije kvercetina utječu različite vrste šećera i mjesta konjugacije šećerne skupine (149). Glukozidi se

učinkovito hidroliziraju u tankom crijevu β -glukozidazama do oblika aglikona, od kojih se veliki dio apsorbira (150). Dostupna istraživanja govore da se kvercetin glukozidi (poput onih koji se nalaze pretežno u luka ili ljutiki) znatno bolje apsorbiraju od njegovih rutinozida (glavni kvercetin glikozid u čaju) (150). Kvercetin glukuronska kiselina i njeni derivati sumporne kiseline lakše se apsorbiraju od kvercetina (150). Nadalje, na njegovu apsorpciju utječu razlike u glikozilaciji, izvoru hrane iz koje se konzumira i istodobnoj primjeni dijetalnih sastojaka, poput vlakana i masti (151). Kvercetin i njegovi derivati stabilni su u želučanoj kiselini, međutim, ne postoji izvještaj o mogućnosti apsorpcije u želudcu. Istraživanja sugeriraju da se kvercetin apsorbira u gornjem segmentu tankog crijeva (152, 153). Među derivatima kvercetina, konjugirani oblici njegovih glikozida se bolje apsorbiraju od kvercetina. Pročišćeni kvercetin glukozidi su sposobni reagirati s natrij-ovisnim prijenosnicima glukoze u epitelu sluznice, što omogućuje apsorpciju u tankom crijevu (149). Kvercetin i derivati transformiraju se u različite metabolite (fenolna kiselina) enteričkim bakterijama i enzimima u epitelnim stanicama sluznice crijeva. Ti se metaboliti apsorbiraju, transformiraju ili kasnije izlučuju (154).



Slika 19. Put apsorpcije i metabolizma izokvercetina (kvercetin 3-O-glukozid) i rutina (kvercetin 3-O- β -rutinozid) u probavnom sustavu (147, 155, 156) (Preuzeto i prilagođeno prema 107). CBC - citosolna β -glukozidaza, LPH - laktaza-florizin hidrolaza.

Nakon apsorpcije, kvercetin se metabolizira u različitim organima, uključujući tanko crijevo, debelo crijevo, jetru i bubrege. Metaboliti koji nastaju u tankom crijevu i jetri pomoću biotransformacijskih enzima uključuju metilirane, sulfo supstituirane i glukuronidirane oblike (157, 158). Metaboliti kvercetina analizirani u uzorcima plazme i jetre pokazali su da su koncentracije njegovih derivata u jetri niže od onih u plazmi, a jetreni metaboliti su intenzivno metilirani (90-95%) (159, 160). Kontinuirani unos hrane bogate kvercetinom, omogućuje nakupljanje i značajno povećanje koncentracije kvercetina u plazmi, što korelira s njegovim prehranbenim unosom (161, 162). Dok derivati kvercetina izoramnetin i glukozidni sulfat čine 91,5% njegovih metabolita, ostali metaboliti uključuju njegov glukuronoidni i metilirani oblik (146). Dostupnost u stanicama smanjuje i sposobnost proteina plazme (albumini čine 99,4%) da konjugiraju kvercetin (147).

Ograničena istraživanja sugeriraju da kvercetin i njegovi metaboliti imaju tendenciju nakupljanja u organima koji sudjeluju u njegovom metabolizmu i izlučivanju te da se unutar stanice koncentrira u mitohondrijima (147, 148, 163-168). Bubrezi su glavni organ izlučivanja. Koncentracija kvercetina u urinu povećavala se s povećanjem doze (147). Ljudski ispitanici mogu apsorbirati značajne količine kvercetina iz hrane ili dodataka, a uklanjanje je prilično sporo, 11-28 sati (164). Prosječni terminalni poluživot kvercetina je 3,5 sata (165). Ukupni povrat C-kvercetina u urinu, izmetu i izdisaju je vrlo različit, ovisno o pojedincu (166). Velika količina apsorbiranog kvercetina se intenzivno metabolizira i na kraju se eliminira plućima (167). Dodatna literatura sugerira da istodobni unos kvercetina s vitaminom C, folatima i dodatnim flavonoidima poboljšava bioraspoloživost (164, 148).

Sva dosadašnja istraživanja pokazuju da se kvercetin glukozid apsorbira u gornjem dijelu tankoga crijeva, zatim se metilira, sulfosupstituira i glukuronidira biotransformacijskim enzimima u tankom crijevu i jetri, i konačno se izlučuje bubrežnom filtracijom putem urina.

2.13.1.3. Utjecaj polifenola na crijevnu mikrobiotu i obrnuto

Nedavna istraživanja su dokazala da polifenoli koji se ne apsorbiraju u crijevima mijenjaju mikrobnu zajednicu, što rezultira blažom sustavnom upalom i boljim metaboličkim ishodima (169-171). Polifenoli mogu također imati povoljne učinke na mikrobiotu, djelujući kao prebiotici (172). Biljni sastojak koji nije probavljiv i koji blagotvorno utječe na domaćina selektivnim poticanjem rasta i/ili aktivnosti jedne ili ograničenog broja bakterija u debelom

crijevu i tako poboljšava zdravlje domaćina naziva se prebiotikom. Prebiotici koji najviše obećavaju su oligosaharidi koji nisu probavljivi, uključujući fruktooligosaharide, galaktooligosaharide (GOS) i inulin koji blagotvorno utječu na rast i aktivnost *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*, dok statistički značajno smanjuju bakterije *Bacteroides*, *Candida* i *Enterobacteriaceae* (173). Povećana proizvodnja kratkolančanih SCFAs od strane mikroba uslijed nižeg pH crijeva i crijevnog sadržaja sprječava rast potencijalno patogenih bakterija kao što su *E. coli* i ostali članovi *Enterobacteriaceae*. SCFA, poput acetata, propionata i butirata, važni su metaboliti u održavanju crijevne homeostaze. Štoviše, SCFA djeluju kao ligandi za receptore vezane na G-protein (GPCR), uključujući GPR109A, GPR43 i GPR41, aktivirajući kaskade protuupalne signalizacije koji kontroliraju imunosne funkcije (174).

Nasuprot tome, mikrobiota crijeva opremljena je velikim brojem različitih vrsta enzima koji su sposobni za različite modifikacije prehrambenih flavonoidnih spojeva prije ulaska u debelo crijevo. U debelom crijevu mikrobnih enzimi (hidroksilaze, ramnosidaza, β -glukuronidaza, β -glukozidaza, sulfataza i esteraze) mogu eliminirati glikozide, glukuronide i sulfate i stvarati flavonoidne aglikone, koji se dalje metaboliziraju u različite proizvode fizije (cijepanja) prstenova (engl. *ring-fission*). Tako mikrobnih enzimi kataliziraju različite vrste reakcija, uključujući oksidaciju, redukciju, *O*- i *C*-deglikozilaciju, dekarboksilaciju, demetilaciju, izomerizaciju, dehidroksilaciju, cijepanje estera, smanjenje C-C dvostrukih veza, cijepanje u prstenu, produženje i skraćivanje alifatičkog ugljikovog lanca i cijepanje prstena (175).

Izgleda da se korisni učinci flavonoida ne mogu u potpunosti ostvariti nakon oralnog unosa u nedostatku mikrobnih vrsta koje mogu katabolizirati flavonoide. Međutim, neki spojevi prisutni u prehrani mogu modulirati mikrobiotski sastav, rezultirajući promjenama u metaboličkoj aktivnosti crijevnih bakterija. Stoga su neki podaci pokazali da dijetalni pripravci s kvercetinom ili resveratrolom mogu igrati pozitivne uloge u minimiziranju rizika od kolonskih bolesti inhibiranjem enzimske aktivnosti nepoželjne crijevne mikrobiote; ti spojevi mogu smanjiti aktivnost fekalnih i domaćinovih mukoznih enzima u kolonu, kao što je β -glukuronidaza, β -glukozidaza, β -galaktozidaza, mucinaza i nitroreduktaza (176, 177).

Tako iz biljnih polisaharida koji sadrže otporni škrob i oligosaharide, neprimjenjive za domaćina, nakon anaerobne bakterijske fermentacije nastaje veliki broj SCFA i drugih metabolita (laktat, piruvat, etanol, sukcinati, topljivi oligosaharidi, plinovi). Uz to, mikrobiota je uključena u proizvodnju i apsorpciju esencijalnih vitamina i mikronutrijenata. Povećana koncentracija SCFA, koja je konačni rezultat bakterijskog metabolizma rezistentnog škroba i oligosaharida, može pomoći u apsorpciji minerala poput kalcija, povećanjem njihove topljivosti

i povećanjem ekspresije proteina koji vežu kalcij (178, 179). Resistentni ugljikohidrat crijevne bakterije mogu iskoristiti za biosintezu folata i sintezu vitamina i aminokiselina poput tiamina, riboflavina, niacina, pantotenske kiseline, piridoksina, biotina, vitamina B12 i vitamina K2 (180).

Proizvodi fermentacije mikrobiote iz crijeva mogu se koristiti kao hranjive tvari, ali i kao signali za rasta crijevnog epitela. Pored toga, važne funkcije proizvoda fermentacije mikrobiote mogu biti priprema i oblikovanje imunskog sustava i pružanje kolonizacijske otpornosti protiv patogena, umiješanih u energetske metabolizam domaćina i pojavu različitih poremećaja, uključujući metaboličku bolest, upalnu bolest crijeva, alergije kolorektalni karcinom, dijabetes, pretilost, osteoporoza i neurodegenerativne bolesti (180). Mnoge od ovih tvari imaju protubakterijska svojstva (npr. proizvodnjom bakteriocina i sl. nusprodukata) koja mogu eliminirati patogene, ali mogu imati i štetan učinak zbog uklanjanja korisne mikrobiote. Druga važna funkcija mikrobiote je njihov potencijal u procesu detoksikacije ili bioaktivacije ksenobiotika (107).

Izuzev gore navedenih poveznica između crijevnog mikrobiote i imunskog sustava veliki broj istraživanja pokazao je izvanrednu ulogu mikrobiote crijeva i njihovih metabolita u patogenezi upalnih bolesti, uključujući i neuropsihne i neuro-autoimune bolesti kao što je multipla skleroza (MS) (181). Nedavna istraživanja eksperimentalnog autoimunog encefalomijelitisa, životinjskog modela MS-a, otkrila su da modificiranje određenih populacija crijevnih bakterija može utjecati na imunosne promjene stanica na periferiji, što rezultira poremećajem imunskih odgovora i neuropsihnim procesima u CNS-u. Suprotno tome, neke komenzalne bakterije i njihovi antigeni proizvodi mogu zaštititi od upale unutar CNS-a. Specifične komponente crijevne mikrobiote uključene su u proizvodnju protuupalnih citokina i naknadno stvaranje Th17 stanica (luče IL-17, snažan proupalni citokin koji privlači neutrofile na mjesto upale). Slično tome, komenzalne bakterije i njihovi metaboliti mogu također pospješiti stvaranje regulatornih T-stanica (Treg), pridonoseći imunosnoj supresiji. SCFAs mogu inducirati Treg bilo pomoću G-proteinskih spojenih receptora ili inhibicijom histon deacetilaza (181). Metaboliti triptofana mogu potisnuti upalne reakcije djelovanjem na aril ugljikovodični receptor u T-stanicama ili astrocitima. Zanimljivo je da izlučivanje ovih metabolita može biti smanjeno prekomjernom potrošnjom dijetalnih sastojaka, poput polifenola, dugolančanih masnih kiselina ili njihovih soli, što ukazuje da prehrana predstavlja čimbenik okoliša koji utječe na složenu križnu vezu između mikrobiote crijeva i imunskog sustava cjelokupnog organizma uključujući i CNS (181).

Obzirom na slabu iskoristivost kvercetina nakon oralne primjene provedena su brojna *in vivo* istraživanja koja uspoređuju razinu i utjecaj kvercetina na ciljani sustav nakon enteralne i parenteralne primjene. Nakon oralne primjene jedne doze od 4 g kvercetina kod dobrovoljnih ispitanika (četiri muškarca i dvije žene) tijekom prvih 24 sata nije otkriven ni kvercetin ni njegovi konjugati u krvi ili urinu, međutim u roku od 72 sata je 53% doze izlučeno putem stolice (182). Nakon jedne intravenske injekcije 100 mg kvercetina na šest dobrovoljaca, razina krvne plazme smanjivala se bifazno, s vremenom poluživota od 8,8 min i 2,4 h; vezivanje proteina premašilo je 98%. U urinu se izlučilo 0,65% intravenske doze kao nepromijenjeni kvercetin, a 7,4% kao konjugat u roku od 9 sati; daljnje izlučivanje nije uočeno unutar 24 sata (186). Iz dva istraživanja provedena 1996. i 1997., nakon opetovane primjene kvercetina u sklopu prehrane došlo je do sporijeg uklanjanja istoga iz organizma što se povezuje s nakupljanjem u plazmi, tj. vezanju na albumine (183, 184). Veće razine metabolita kvantificirane su nakon intraperitonealne primjene usporedno s oralnom primjenom u bilo kojem trenutku, osim za metilirani kvercetin aglokoni koji je u plazmi bio viši nakon oralne u usporedbi s intraperitonealnom primjenom (185, 186).

Temeljem svega navedenog, primjena funkcionalne prehrane bogate flavonoidima predstavlja alternativni pristup ublažavanju i/ili otklanjanju čimbenika rizika AD prije pojave kliničkih znakova bolesti. Ispravnom prehranom u smisli sadržaja, nužne količine i raznovrsnosti, možemo preventivno osigurati nutritivne komponente s blagodatnim učinkom na cjelokupni organizam i zdravlje. Kvercetin je samo jedna od karika u lancu zdravih prehrambenih tvari koje su svakome na dohvat ruke, samo što su ponekad slučajno ili iz neznanja ili nemara, ponekad i komocije u nabavi namirnica, izbačene iz svakodnevne prehrane.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Pokusne životinje

Istraživanje je provedeno na štakorima Y59, mužjaci u dobi 3 mjeseca, iz jedinice za uzgoj laboratorijskih životinja Zavoda za animalnu fiziologiju na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Istraživanje je provedeno na ukupno 180 štakora Y59 podijeljenih u 6 skupina, s 10 životinja u svakoj skupini (**Tablica 4**). Životinje su držane u standardnim uvjetima (dnevni ritam od 12 sati dana i 12 sati mraka temperatura 24 °C (± 2) uz kontroliranu vlažnost zraka 60%). Štakori su hranjeni standardnom hranom za laboratorijske životinje (Standard Diet GLP, 4RF21, Mucedola, Settimo Milanese MI, Italija), uz dostupnost hrane i vode *ad libitum*.

Istraživanje je provedeno sukladno etičkim načelima važećima u Republici Hrvatskoj (Zakon o zaštiti životinja (NN135/06 i NN37/13) i Pravilnik o zaštiti životinja koje se koriste u pokusima ili druge znanstvene svrhe (NN55/13)), a provodi se u skladu s Uputama za njegu i korištenje laboratorijskih životinja (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, DHHS (NIH) Publ # 86-23). Pokuse je odobrilo Etičko povjerenstvo Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu (broj odobrenja: 251-58-10617-15-17).

3.1.2. Ispitne komponente

Aluminijev klorid heksahidrat ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Mr = 241,45 g/mol, čistoće $\geq 95\%$) proizvođača Gram-mol d.o.o, Zagreb, Hrvatska. D(+)-galaktoza za mikrobiologiju ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, Mr = 180,16 g/mol, čistoće $\geq 97\%$) proizvođača Merck, Njemačka. Kvercetin dihidrat ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Mr = 338,27 g/mol, čistoće $\geq 98\%$) proizvođača Sigma-Aldrich, Njemačka. Natrijev klorid 0,9% infuzijska otopina (fiziološka otopina), proizvođača B. Braun Adria d. o. o., Hrvatska. Prije primjene ispitne komponente su otopljene u 0,5 mL 0,9% fiziološke otopine i injicirane intraperitonealno (*ip*) kao što je navedeno u eksperimentalnom dizajnu (**Tablica 4**).

3.2. Metode

3.2.1. Eksperimentalni dizajn

Ukupno 180 štakora, visokosrodnog soja Y59, podijeljeno je u 6 ispitnih skupina jednake veličine i ovisno o masi (± 10 g) smješteno u kaveze (pet životinja po kavezu). Životinje su držane u kavezima od nehrđajućeg čelika, pod istim kontroliranim uvjetima. Štakorima je svakodnevno tijekom 28 dana *ip* injicirano (**Tablica 4**) kako slijedi: 1. zdrava kontrolna, HC, skupina s 0,5 mL fiziološke otopine; 2. AD model štakora je uspostavljen aluminijevim kloridom (10 mg/kg) i D-galaktozom (60 mg/kg); 3. AD model s kvercetinom (25 mg/kg); 4. AD model s kvercetinom (50 mg/kg); 5. kvercetinom (25 mg/kg) i 6. kvercetinom (50 mg/kg). Svi štakori, 24 sata nakon posljednjeg injiciranja, anestetizirani su primjenom smjese ketamina (Narketan®10, Vetoquinol AG, Belp Bern, Švicarska) u dozi od 75 mg/kg s ksilazinom (Xylapana® Vetoquinol Biowet Sp., Gorzow, R Poljska) u dozi od 10 mg/kg. Nakon uzorkovanja krvi, svi štakori žrtvovani su iskrvarenjem i izolirani su organi i uzorci od interesa (mozak i crijevni sadržaj).

Tablica 4. Eksperimentalni dizajn

Štakor Y59 muški spol n=10	0,9% NaCl (mL)	AlCl ₃ x 6H ₂ O (mg/kg)	D-galaktoza (mg/kg)	Kvercetin (mg/kg)	Način primjene	Trajanje obrade (dana)
HC	0,5	-	-	-	<i>ip</i>	28
AD	0,5	10	60	-	<i>ip</i>	28
AD +Qu ₂₅	0,5	10	60	25	<i>ip</i>	28
AD + Qu ₅₀	0,5	10	60	50	<i>ip</i>	28
Qu ₂₅	0,5	-	-	25	<i>ip</i>	28
Qu ₅₀	0,5	-	-	50	<i>ip</i>	28

3.2.2. Praćenje tjelesne mase pokusnih životinja

Životinje su vagane na digitalnoj vagi (Kern KB 2000-2N; d = 0,01-2000 g): (a) prvi dan eksperimenta, (b) svakih sedam dana tijekom trajanja eksperimenta i (c) na dan žrtvovanja. Prvi dan eksperimenta životinje su izvagane i na temelju tjelesne mase (± 10 g) razvrstane u kaveze. Na temelju srednje tjelesne mase životinja po kavezu za pojedinu skupinu određen je količina pojedinačnih pripravaka (**Tablica 4**), koji su primjenjivani svakodnevno intarperitonealno (*ip*) tijekom 28 dana.

3.2.2.1. Procjena toksičnosti $AlCl_3$ i D-gal

Procjena toksičnosti na nivou cijelog organizma praćena je vaganjem životinja tijekom eksperimenta i praćenjem masenih promjena. Pokazatelj toksičnosti je gubitak tjelesne mase tijekom perioda eksperimenta. Gubitak tjelesne mase za svaku pojedinu životinju je izračunat formulom: $\% \text{ gubitka mase} = [(masa \text{ prvog dana} - minimalna \text{ masa tijekom ispitivanja}) / masa \text{ prvog dana}] \times 100$.

3.2.3. Uzorkovanje

Tijekom izolacije i skladištenja uzoraka (serum, crijevni sadržaj i mozak) provedene su mjere za sprječavanje kontaminacije između obrađenih skupina (kontaminacija uzoraka $AlCl_3$). Uzorci su do analize čuvani u polipropilenskim epruvetama sa čepom na -20 °C sadržaj kolona i za ICP-MS te u polipropilenskim epruvetama sa čepom na -80 °C za sve ostale analize.

3.2.3.1. Uzorkovanje krvi

Krv je uzorkovana iz abdominalne aorte (*a. abdominalis*) sukladno smjernicama Instituta za standarde u kliničkom laboratoriju (engl. *Clinical Laboratory Standards Institute, CLSI; H3-A6 Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture*, 2007) i Svjetske zdravstvene organizacije (*WHO guidelines on drawing blood: best practices in phlebotomy*, 2010). Sukladno potrebama za pojedinu analizu krv je prikupljena u epruvete s

aktivatorom zgrušavanja-silikon (serum) za biokemiju, analizu metala ICP-MS, ELISA i spektrofotometrijske testove.

3.2.3.2. Uzorkovanje crijevnog sadržaja

Unutar 30 min od anestezije izoliran je kolon. Poštujući pravila asepsa i slijedeći ISO standarde (engl. *International Organization for Standardization*) uzorkovan je sadržaj kolona za izolaciju DNA i sekvenciranje, određivanje pH vrijednosti, mjerenje glikolitičke aktivnosti enzima crijevne mikrobiote te za izolaciju probiotičkih kultura na hranjivom agaru uzorkovani sadržaj kolona resuspendiran je u tioglikolatu u omjeru 1:10 (w/v).

3.2.4. Metode za utvrđivanje disbioze

3.2.4.1. Određivanje pH vrijednosti crijevnog sadržaja

Unutar 30 min od anestezije izolirani sadržaj crijeva (engl. *contents of colon, c.c.*) je resuspendiran u sterilnoj destiliranoj vodi, u omjeru 1:2,5 (0,5 g c.c. : 2,5 mL dH₂O). pH vrijednost izmjeren je pomoću elektrode i pH/ION metra (pH metar Lab 850, Schott instruments, Njemačka).

3.2.4.2. Određivanje glikolitičke enzimske aktivnosti bakterija u uzorku izoliranom iz crijeva

Aktivnost bakterijskih enzima iz sadržaja kolona mjerena je otpuštanjem *p*- i *o*-nitrofenola iz njihovih nitrofenilglukozida prema metodi Juśkiewicz i sur. (187). Za enzime su u koncentraciji od 5 mM korišteni slijedeći supstrati: za β -glukuronidazu supstrat *p*-nitrofenil- β -D-glukuronid, za β -glukozidazu supstrat *p*-nitrofenil- β -D-glukopiranozid i za β -galaktozidazu supstrat *o*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid (Sigma-Aldrich, Njemačka), a pripremljeni su otapanjem u 100 mL svježe pripremljenog 100 mM fosfatnom puferu (pH, 7,0). Reakcijska smjesa sadržavala je 0,3 mL otopine supstrata i 0,2 mL 1:10 (v/v) nadtaloga sadržaja kolona, koji je dodatno

razrijeđen u 100 mM fosfatnom puferu. Slijedila je inkubacija pri 37 °C/10 min/anaerobno. Nakon inkubacije dodano je 2,5 mL hladnog natrijevog karbonata (0,25 M) kako bi se zaustavila reakcija te je na spektrofotometru izmjerena apsorbancija *p*-nitrofenola pri $\lambda = 400$ nm, a *o*-nitrofenola pri $\lambda = 420$ nm (Libra S22, Biochrom, UK). Aktivnost enzima (U/g c.c.) je izračunata prema formuli: $U = [(A : 0,04401) : 10] : 0,02] : 139,11$. Gdje je A – apsorbancija; 0,4401 – nagib pravca (određuje se iz baždarnog dijagrama za *p*-nitrofenol (PNP) i *o*-nitrofenol (OPN)); 10 – vrijeme inkubacije u minutama; 0,02 – količina uzorka izražena u gramima (u 0,2 mL supernatanta): M_r (PNP/ONP) = 139,11 g/mol.

3.2.4.3. Priprema podloga za probiotičke kulture

Za izolaciju probiotičkih bakterija korištene su i pripremljene krute selektivne podloge s inhibitornim djelovanjem na ostale mikroorganizme. Postupak pripreme hranjivih podloga iz dehidriranih podloga izveden je prema uputi proizvođača dostupan na pakiranju proizvoda i u elektroničkom obliku. Prilikom pripreme dehidriranih podloga pažljivo je odvagana količina praha, propisana od proizvođača, na digitalnoj vagi (Kern KB 2000-2N, $d = 0,1-2000$ g). Odvagana dehidrirana podloga prenijeta je u odgovarajuću posudu u kojoj otopljena podloga zauzima maksimalno 2/3 ukupnog volumena posude. Prah je postupno otopljen grijanjem na plameniku u odgovarajućem volumenu deionizirane vode prema odvagi dehidrirane podloge (propisano od proizvođača) te dobro promiješan okretanjem posude kako bi se podloga u potpunosti otopila. Tako pripremljene podloge se pripremaju za sterilizaciju autoklaviranjem na način da se boce zatvore vatenim čepovima učvršćenim folijom. Pripremljene podloge za autoklaviranje poslagane su u autoklav tako da vodena para može slobodno strujati između spremnika. Autoklaviranje se izvodi pri temperaturi i vremenu koje proizvođač podloga propiše. Nakon autoklaviranja podloge su ohlađene u vodenoj kupelji na 47-50 °C te razlivene kraj plamenika u laminar kabinetu (Cleanroom Technology, Klima oprema, Hrvatska). U sterilnim Petrijevim pločama razlivene su krute hranjive podloge debljine 3 mm (za Petrijevu ploču $\varnothing 90$ do 94 mm razliveno je 20 mL agara) te su ploče ostavljene na ravnoj površini kako bi se agar skrutio i ohladio. Tako pripremljene podloge čuvane su od isušivanja i zaštićene od svjetla u hladnjaku pri temperaturi od +4 °C.

3.2.4.3.1. Priprema agara za bakterije roda *Lactobacillus*

Kao selektivna podloga za izolaciju bakterija roda *Lactobacillus* korišten je MRS agar (Merck, Njemačka). MRS agar sadrži polisorbit, acetat, magnezij i mangan koji su posebni čimbenici rasta za bakterije roda *Lactobacillus*. Za pripremu podloge MRS agara odvagano je i otopljeno 68,2 g MRS agara u 1 L destilirane vode prema uputama proizvođača (Merck, Njemačka). Agar je otopljen u Erlenmayerovoj tikvici zagrijavanjem na plameniku uz miješanje. Otopljen agar autoklaviran je pri 121 °C/15 min te je nakon autoklaviranja razliven u Petrijeve ploče.

3.2.4.3.2. Priprema agara za bakterije roda *Bifidobacter*

Kao selektivna podloga za izolaciju bakterija roda *Bifidobacter* korišten je TOS-propionat agar (Merck, Njemačka) koji uz dodatak selektivnog dodatka (supplement) litij – mupirocina (Merck, Njemačka) omogućuje analizu živih bakterija roda *Bifidobacter*. Galaktooligosaharid TOS je šećer kojeg mogu metabolizirati samo bakterije roda *Bifidobacter*. Dodatak litij-mupirocin sprječava rast laktobacila, laktokoka, streptokoka i leukonostoka. Za pripremu TOS-propionat agara odvagano je i otopljeno 62,5 g TOS-propionat agara u 1 L destilirane vode prema uputama proizvođača (Merck, Njemačka). Supplement je pripremljen otapanjem 25 mg litij-mupirocina u 25 mL sterilne vode prema uputama proizvođača (Merck, Njemačka). Agar je otopljen u Erlenmayerovoj tikvici zagrijavanjem na plameniku uz miješanje. Nakon otapanja, u agar je dodana otopina selektivnog dodatka. Tako pripremljen agar je autoklaviran pri 115 °C/15 min te je nakon autoklaviranja razliven u Petrijeve ploče.

3.2.4.3.3. Priprema hranjivog agara

Hranjivi „Tryptic soy agar“ (Merck, Njemačka) je agar hranjivog sastava koji se koristi za održavanje mikrobioloških kultura i izolaciju bakterija, a hranjivim ga čini sastav od kazeina i peptona iz soje koji osiguravaju izvor organskog dušika i aminokiselina. Pripremljen otapanjem 40 g u 1 L destilirane vode uz zagrijavanje na plameniku. Agar je izliven u staklene epruvete uz plamenik, zatvoren čepom i autoklaviran pri 121 °C/15 min. Potom je ostavljen da se stvrdne u epruvetama u kosom položaju.

3.2.4.3.4. Rast probiotičkih rodova na selektivnim podlogama

Petrijeve ploče s MRS i TOS agarom su inokulirane s 0,1 mL uzorka decimalnog razrijeđenja 10^{-2} , 10^{-6} i 10^{-7} . Podloge koje omogućuju rast roda *Lactobacillus* su pohranjene u mikroaerofilnim uvjetima upotrebom Oxoid™ CampyGen™ 2,5 L Sachet (Thermo Fisher Scientific, SAD), a one koje omogućuju rast roda *Bifidobacter* pohranjene su u anaerobnim uvjetima upotrebom Oxoid™ AnaeroGen™ 2,5 L Sachet (Thermo Fisher Scientific, SAD) u kutijama za inkubaciju i inkubirane pri 37 ± 1 °C u inkubatoru s CO₂ sustavom (NAPCO® Model 5415 IR CO₂ System) tijekom 3 dana. Nakon trodnevne inkubacije prebrojane su porasle kolonije mliječne boje. Brojanja kolonija roda *Lactobacillus* izvedeno je prema standardima EN ISO 20128:2006 norme, a za rod *Bifidobacter* EN ISO 29981:2010 norme. S podloga u kojima je bilo rasta probiotičkih bakterija, izolirano je 5 tipičnih kolonija i preneseno na kosi „Tryptic soy agar“. Inkubacija je provedena pri anaerobnim uvjetima (Oxoid™ AnaeroGen™ 2,5 L Sachet, Thermo Fisher Scientific, SAD) i 37 °C u inkubatoru s CO₂ sustavom tijekom 3 dana.

3.2.4.3.5. Identifikacija bakterija

Za brzu analizu bakterija koje su narasle na kosom „Tryptic soy agaru“ korišteni su API (engl. *analytical profile index*) CHL testovi (BioMérieux, Francuska). Za provođenje API testova, pokupljeno je sve što je naraslo na kosom agaru i resuspendirano u 10 mL API 50 CHL Medium (bioMérieux, Francuska). Gustoća inokuluma koja se mjeri u denzitometru, standardizirana je prema 2 McFarland standardu. Pripremljena suspenzija je nakapana u cjevčice API 50 CHL pločice, koja sadrži 49 različitih ugljikohidrata, pazeći da se ne formiraju mjehurići. Nakon toga je u sve cjevčice nakapano mineralno ulje kako bi se osigurali anaerobni uvjeti. Inkubacija je trajala 48 h pri 37 °C (inkubator I-CO2-235, Kambič, Slovenija) nakon čega je provedeno očitavanje rezultata i analiza.

3.2.4.4. *Identifikacija sastava mikrobioma sekvenciranjem*

Ekstrakcija DNA iz uzoraka sadržaja kolona je provedena u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Za ekstrakciju ukupne mješovite DNA iz uzoraka korišten je uređaj Maxwell® 16 i kit za izolaciju „*Maxwell® 16 Tissue DNA Purification Kit*“ (Promega, SAD). Uzorci sadržaja kolona koji su bili pohranjeni na -20 °C su odmrznuti neposredno prije početka pripreme za ekstrakciju. Nakon odmrzavanja, 100 g uzorka sadržaja kolona je resuspendirano u 1 mL fiziološke otopine i promiješano na Vortex mješalici. Slijedilo je centrifugiranje pri 2000 rpm/1min (Mikro 200R, Hettich, Njemačka) da se netopivi ostaci sadržaja kolona, stelje i dlaka štakora spuste na dno epruvete, nakon čega je supernatant prebačen u novu epruvetu i centrifugiran pri 13000 rpm/10 min. Nakon toga je supernatant odstranjen, a talog stanica resuspendiran u 400 µL TE (Tris-EDTA) pufera i 100 µL lizozima ($\gamma = 25 \text{ mg/mL}$). Uzorci su inkubirani 1,5 h na tresilici nakon čega su homogenizirani u 3 ciklusa po 30 sekundi, s 15 sekundi pauze pomoću ultrazvučnog homogenizatora Sonopuls mini (Bandelin, Njemačka). Iz tako pripremljenog uzorka se provodi ekstrakcija DNA pomoću kompleta *Maxwell DNA Tissue kit* u uređaju Maxwell® 16 Series.

Neposredno prije pokretanja uređaja Maxwell® 16 unutrašnjost je prebrisana etanolom. Tubice za eluaciju su posložene na predviđeno mjesto te je u svaku dodano 300 µL pufera za eluaciju. Po završetku ekstrakcije, 100 µL DNA je prebačeno u male epruvete, omotano parafilmom i poslano na sekvenciranje.

Priredeni uzorci DNA poslani su na daljnju analizu u MR DNA (Molecular Research, Shallowater, TX, SAD), koji su akreditirani laboratorij za Illumina MiSeq sekvenciranje. DNA sekvenciranje je provedeno uparivanjem i koristeći protokol instrumenta Illumina MiSeq. Barkodirane varijabilne regije V3 – V4 16S rRNA amplificirane su korištenjem 341/ 806R para početnica CCTACGGGGNGGCWGCAG / GACTACHVGGGTCTAATCC (*HotStarTaq Plus Master Mix Kit*, Qiagen, SAD). Nakon amplifikacije PCR produkti su provjereni na 2% agaroznom gelu. Višestruki uzorci su spojeni zajedno u jednakim omjerima i pročišćeni pomoću kalibriranih zrna Ampure XP. Skupljeni i pročišćeni PCR produkti korišteni su za pripremu DNA biblioteke pomoću Illumina TruSeq protokola, a sekvenciranje je provedeno u uređaju Illumina MiSeq prema uputama proizvođača.

Rezultati sekvenciranja dobiveni su kao dvije FASTQ datoteke iz Illumina Basespacea. Dobivene FASTQ datoteke obrađene su u programu QIIME2. Prvo su datoteke uvezene u

QIIME2 kao upareni završni niz te demultipleksirani prema barkodovima u odgovarajuće uzorke. Sekvence su obrezane za pozicije koje imaju rezultat manji od 35 za srednje vrijednosti i označene s DADA2. Taksonomija je dodijeljena reprezentativnim sekvencama koristeći BLAST s 90% odvojenosti identiteta u paru. Baza podataka SILVA otpušta 132 većinske taksonomije te je korištena kao referentna baza podataka. Filogenetsko stablo kreirano je korištenjem FastTree programa, a MAFFT je korišten za poravnavanje slijeda, kao što je implementirano u QIIME2. Standardna mjerenja alfa i beta raznolikosti implementirani u QIIME2, izračunata su korištenjem dubine uzorka koja odgovara uzorku s najmanjim brojem očitavanja. Biom tablica je izvezena u Calypso v 8.8.4 i korištena je za identifikaciju različito prisutnih bakterija. Podaci su normalizirani metodom kumulativnog skaliranja i log2 transformacije, a test Wilcoxon-ovog ranga i Kruskal-Wallisov korišteni su za identifikaciju različito prisutnih svojti s vrijednosti P manjim od 0,05 i smatraju se statistički značajnim.

3.2.4.5. *Određivanje koncentracije zonulina (ZON)*

Za određivanje koncentracije ZON u uzorku homogenata mozga, seruma i crijevnog sadržaja korišten je *Rat zonulin ELISA Kit* MBS1605660 (MyBioSource, San Diego, CA, SAD). Kit primjenjuje kompetitivnu tehniku enzimske imunosne analize koja koristi poliklonalna anti-ZON antitijela i konjugat ZON-HRP. Uzorak za ispitivanje i biotinizirano ZON-protutijelo su inkubirani zajedno sa ZON-HRP konjugatom jedan sat na 37 °C. Nakon razdoblja inkubacije, jažice su dekantirane i isprane pet puta. Zatim je uslijedila inkubacija 10 minuta na 37 °C sa supstratom za enzim HRP, tijekom koje proizvod reakcije enzim-supstrat tvori kompleks plave boje. Na kraju je dodana stop otopina i dolazi do promjene boje iz plavog u žuto. Intenzitet boje mjereno je spektrofotometrijski na 450 nm (Microplate reader Model 550, Bio-Rad, SAD). Intenzitet boje je obrnuto proporcionalan koncentraciji ZON-a jer se ZON iz uzoraka i konjugat ZON-HRP natječu za mjesto vezanja anti-ZON antitijela. Budući da je broj mjesta ograničen, i da je više mjesta zauzeo ZON iz uzorka, manje je mjesta preostalo za vezanje konjugata ZON-HRP. Koncentracija ZON u svakom uzorku interpolirana je iz standardne krivulje i prikazana kao ng/mg proteina u uzorku.

3.2.5. Analiza esencijalnih i toksičnih elemenata u uzorku crijevnoga sadržaja, seruma i tkiva mozga metodom induktivno spregnute plazme s masenom spektrometrijom (engl. inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS)

Postupak pranja laboratorijskog posuđa za analizu elemenata

Prije upotrebe laboratorijsko posuđe korišteno u analizi elemenata oprano je detergentom (Kemex), isparno vodovodnom a zatim i destiliranom vodom. Nakon toga je uronjeno u 10% HNO₃ kroz 24 sata te je na kraju još isparano ultračistom vodom. Teflonske epruvete korištene u postupku razaranja uzoraka oprane su nakon pranja detergentom i ispiranja vodovodnom vodom postupkom pranja s 50% HNO₃ na visokotlačnom mikrovalnom uređaju UltraCLAVE (Milestone, Italija).

Priprema uzoraka štakorskih seruma za analizu metala ICP-MS

Neposredno prije analize elemenata ICP-MS uzorci štakorskih seruma razrijeđeni su alkalnom otopinom (0,7 mM amonijaka, 0,01 mM EDTA i 0,07% (v/v) Tritona X-100) 20 puta. U sve razrijeđene uzorke seruma dodana je otopina unutarnjeg standarda u koncentraciji od 3 µg/L (Ge, Rh, Lu, Ir i Tb u 1% HNO₃).

Priprema uzoraka tkiva mozga na visokotlačnom mikrovalnom uređaju UltraCLAVE za analizu elemenata ICP-MS

Uzorci tkiva pripremljeni su za analizu elemenata visokotlačnim mikrovalnim razaranjem. Uzorci mozga bili su pohranjeni na -20 °C u polipropilenskim epruvetama s čepom te su nakon odmrzavanja isprani ultračistom vodom, lagano posušeni filter papirom, prebačeni u čiste teflonske epruvete i izvagani te im je dodano po 3 mL koncentrirane dušične kiseline (HNO₃ 65%, čistoće *s.p.*, Merck, Njemačka) i 3 mL deionizirane vode. Epruvete su začepljene teflonskim čepovima nakon čega su uzorci razoreni u visokotlačnom mikrovalnom uređaju UltraCLAVE IV (Milestone, Italija) prema posebnom temperaturnom programu za biološke uzorke. Nakon razaranja i hlađenja, uzorci su nadopunjeni deioniziranom vodom na volumen 5

mL, izmiješani miješalicom za epruvete te prebačeni u polipropilenske epruvete s čepom do mjerenja elemenata na ICP-MS. Neposredno prije ICP-MS analize razoreni uzorci razrijeđeni su 1% (v/v) dušičnom kiselinom te je u svaki uzorak dodana i otopina unutarnjeg standarda u koncentraciji od 3 µg/L (Ge, Rh, Lu, Ir i Tb u 1% HNO₃).

Analiza esencijalnih i toksičnih elemenata metodom induktivno spregnute plazme s masenom spektrometrijom (ICP-MS)

Koncentracije esencijalnih i toksičnih elemenata mjerene su metodom masene spektrometrije induktivno spregnute plazme na uređaju Agilent 7500cx (Agilent Technologies, Njemačka). Mjerni parametri i osjetljivost instrumenta podešavaju se prije svake ICP-MS analize pomoću otopine koja sadrži 1 µg/L elementa litija (Li), magnezija (Mg), kobalta (Co), itrija (Y), cerija (Ce), talija (Tl) i selenija (Se). Optimalni uvjeti za mjerenje podrazumijevaju zadovoljavajuću osjetljivost uz minimalne interferencije (nastajanje dvostruko nabijenih iona i iona oksida). Smjese standardnih otopina elemenata za izradu kalibracijskih krivulja priređuju se iz monoelementnih standardnih otopina u 5% (v/v) dušičnoj kiselini. Osim prilagođavanja osjetljivosti mjernog uređaja i mogućih spektralnih interferencija određuje se i granica detekcije i kvantifikacije koja ovisi o čistoći otopina i laboratorijskog posuđa koje se rabi u postupcima uzorkovanja i pripremi, opetovanim mjerenjem uzorka slijepe probe. Za ispitivanje točnosti i preciznosti ICP-MS metode rabljeni su komercijalno dostupni referentni materijali: goveđa jetra 1577b, 1577b (NIST, SAD), konjski bubreg H8 (IAEA, Austrija), mišić morskog psa DORM-2 (NRCC, Kanada), životinjska kost H5 (IAEA, Austrija), svinjski bubreg BCR-186R (IRMM, Belgija), serum SeronormTM Trace Elements Serum Level I, II (Sero AS, Norveška) i plasma ClinChek®-Control Level I, II (RECIPE, Njemačka).

3.2.6. Metode za određivanje parametara oksidacijskog stresa i antioksidacijske zaštite u tkivu mozga

3.2.6.1. Izolacija i priprema tkiva

Izolirano tkivo mozga pohranjeno je na -80 °C do pripreme za analizu. Tjedan dana nakon pohrane, odvagano je 75-90 mg tkiva u eppendorf epruvetu, dodan fosfatni pufer, PBS (Biogmost, Hrvatska), u omjeru 1:10 i uzorci su sonificirani ultrazvučnim homogenizatorom Bandelin Sonoplus HD2070 (Bandelin, Njemačka) upotrebom sonde MS73 (Bandelin, Njemačka). Dobiveni homogenati su centrifugirani (ultracentrifuga Mikro 200R, Hettich, Njemačka) pri 15000 rpm/15 min/+4 °C. Dobiveni nadtalog je odvojen u čistu eppendorf epruvetu te razrijeđen 10 puta s PBS-om (100 µL nadtaloga i 900 µL fosfatnog pufera). Svi uzorci pohranjeni su na -80 °C do analize.

3.2.6.2. Određivanje proteina metodom po Lowery-u

Količinu proteina u tkivima određena je metodom po Lowry-u (188). Ova metoda temelji se na činjenici da u lužnatim uvjetima divalentni ion bakra tvori kompleks s peptidnim vezama. Pritom se reducira u monovalentni ion bakra. Cu^+ i ostaci tirozina, triptofana i cisteina iz proteina reagiraju s Folinovim reagensom, pri čemu nastaje nestabilni produkt, a on se zatim reducira do molibden/volfram plavog ($\lambda = 600 \text{ nm}$).

Sve je rađeno u duplikatima, uzorci nadtaloga su razrijeđeni u PBS-u 40 puta. U epruvete je dodano kako slijedi: 100 µL razrijeđenog uzorka i 2 mL otopine D, inkubacija 10 min na sobnoj temperaturi (RT, engl. *room temperature*). Nakon toga dodano je 200 µL otopine E, potom sve vorteksirano (VortexGenius 3, IKA, SAD) i inkubirano 30 min na sobnoj temperaturi u mraku. Količinu proteina određena je na spektrofotometru mjerenjem apsorbancije na valnoj duljini od 600 nm (Libra S22, Biochrom, UK). Kao standard upotrebljen je albumin goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin*, BSA, Sigma-Aldrich, Njemačka) u koncentracijama od 2 mg/mL prema manjim koncentracijama (2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 i 0 mg/mL). Iz standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentracije BSA određen je nagib pravca. Preko nagiba pravca izračunata je koncentraciju proteina u uzorcima prema sljedećoj formuli:

$c = ((A_{uzorka} - b_{st.krivulje}) / \text{nagib pravca standardne krivulje}) \times \text{razrijeđenje}$. Koncentracija proteina izražena je kao mg/mL.

Tablica 5. Priprema otopina za određivanje proteina po Lowry-u

Otopina D	Pomiješati otopine u omjeru 48:1:1 (A:B:C) A: 2% (w/v) Na₂CO₃ u 0,1 M NaOH 9,6 g Na ₂ CO ₃ + 480 mL 0,1M NaOH B: 1% (w/v) natrij-kalij tartarat u dH₂O 0,1 g natrij-kalij tartarat + 10mL dH ₂ O C: 0,5% (w/v) CuSO₄ × 5H₂O u dH₂O 0,05 g CuSO ₄ × 5H ₂ O + 10 mL dH ₂ O
Otopina E	Pomiješati Folin i Ciocalteu's fenol reagens i dH ₂ O u omjeru 2:1

3.2.6.3. *Određivanje karboniliranih proteina (PC)*

Za utvrđivanje količine oštećenja proteina korištena je metoda po Levine-u i sur. (189), a određuje se kao sadržaj karbonilnih skupina u proteinskom uzorku. Karbonilne skupine proteinskog lanca reagiraju s 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH) otopljenim u HCl-u te daju 2,4-dinitrofenilhidrazon.

Volumenu 200 µL nadtaloga uzorka dodano je 300 µL 10 mM DNPH u 2 M HCl. Tako pripremljeni uzorci su inkubirani pri sobnoj temperaturi tijekom jednog sata uz povremeno miješanje. Proteini su precipitirani s 10% (w/v) trikloroetenom kiselinom (TCA) na -20 °C tijekom 5 minuta te nakon toga centrifugirani pri 12000 rpm/10 minuta/+4 °C. Supernatant je uklonjen, a precipitat resuspendiran u mješavini etanola i etil acetata u omjeru 1:1 i centrifugiran pri istim uvjetima. Postupak ispiranja peleta je ponovljen sve dok se sav nevezani DNPH nije isprao. Nakon toga je precipitat otopljen u 6 M gvanidin HCl u kupelji na 35 °C.

Dobivena otopina je korištena za mjerenje apsorbancije pri $\lambda = 370$ nm (Libra S22, Biochrom, UK).

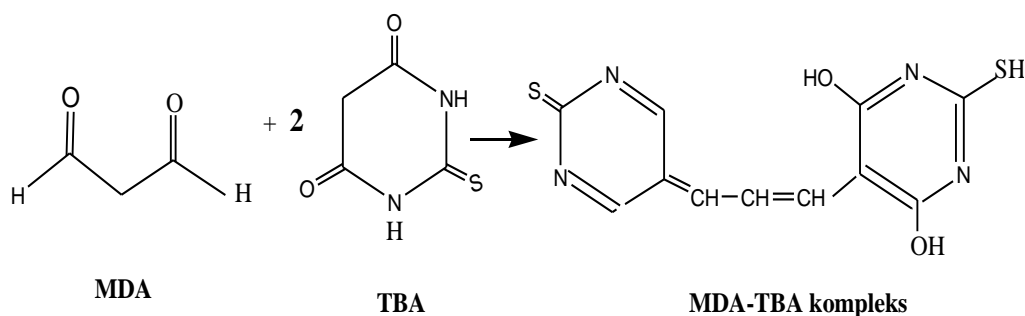
Koncentracija proteinskih karbonilnih skupina je izračunata korištenjem molarog ekstincijskog koeficijenta prema formuli: $c(PC) = (A_{uzorka} / (\epsilon \times C_{proteina} \text{ (mg/mL)}))$. Gdje ϵ iznosi 0,022 $\mu\text{M/cm}$, a duljina kivete l iznosi 1 cm. Koncentracija proteinskih karbonilnih skupina je prikazana kao omjer količine PC i koncentracije proteina te je izražena kao nmol/mg proteina.

Tablica 6. Priprema otopina potrebnih za određivanje koncentracije proteinskih karbonila

2 M HCl	42,95 mL 36% HCl + 207,05 mL dH ₂ O
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 ₂ O
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

3.2.6.4. Mjerenje količine lipidne peroksidacije

Količina lipidne peroksidacije određena je modificiranom metodom koju su opisali Jayakumar i sur. (26). U metodi se mjeri koncentracija malondialdehida (MDA), jednog od glavnih produkata lipidne peroksidacije. Metoda koja se najčešće koristi za određivanje koncentracije MDA u biološkom uzorku je derivatizacija MDA s 2-tiobarbituratnom kiselinom (TBA) pri čemu MDA reagira s dva ekvivalenta TBA i nastaje MDA-(TBA)₂ kompleks. Reakcija se odvija u kiselim uvjetima i na visokoj temperaturi pri čemu nastaje crveni fluorescentni derivat MDA-(TBA)₂ čija koncentracija se može izmjeriti spektrofotometrijski pri valnoj duljini 532 nm (Libra S22, Biochrom, UK). Princip ove metode se zasniva na sljedećoj reakciji:



Slika 20. Mehanizam reakcije TBARS sa tiobarbiturnom kiselinom (preuzeto i prilagođeno prema 200)

U eppendorf epruvetu stavljeno je 100 μL nadtaloga uzorka i 1,6 mL reagensa A te stavljeno u vodenu kupelj na 95 $^{\circ}\text{C}$ /60 minuta. Nakon toga uzorci su naglo ohlađeni na ledu prilikom čega su se nastale folikule slegnule na dno. Nadtalog je odvojen i izmjerena je apsorbancija na 532 nm (Libra S22, Biochrom, UK). Ukupna koncentracija MDA izračunata je prema formuli: $C = (A_{uzorka} \times V_{reakcijske\ smjese}) / (\epsilon \times V_{uzorka} \times C_{proteina\ uzorka})$ te je izražena kao nmol MDA po mg proteina.

Tablica 7. Priprema otopina za određivanje koncentracije MDA

8,1% SDS	0,81 g SDS-a u 10 mL dH ₂ O
20% octena kiselina	20 mL 99,5% octene kiseline i 2,31 mL HCl, nadopuni se do 50 mL dH ₂ O i podesi pH=3,5 te nadopuni dH ₂ O do 100 mL
0,8% TBA	0,8 g TBA u 40 mL dH ₂ O uz lagano zagrijavanje. Nakon što se otopi dodaje se 500 μL 5M NaOH te se nadopuni s dH ₂ O do 100 mL.
Otopina A	100 μL 8,1% SDS + 750 μL 20% octene kiseline (pH = 3,5) + 750 μL 0,81% TBA

3.2.6.5. *Mjerenje enzimatske aktivnosti katalaze*

Aktivnost katalaze određena je spektrofotometrijskom metodom po Aebiju (191). U toj metodi aktivnost katalaze određuje se kao količina potrošenog H₂O₂.

U reakcijsku smjesu u kivetu ukupnog volumena 1 mL dodano je 980 µL 10 mM H₂O₂, a ostatak do ukupnog volumena od 1 mL bio je uzorak odgovarajućeg razrijeđenja. Nakon toga na spektrofotometru (UV-160, Shimadzu, Japan) mjereno je smanjenje količine H₂O₂ pri 240 nm tijekom jedne minute. Aktivnost katalaze izražena je preko ekstinkcijskog koeficijenta H₂O₂ ($\epsilon = 39,4 \text{ mM/cm}$) prema formuli: $c = (A_{uzorka} / (\epsilon H_2O_2 \times l)) \times \text{razrijeđenje}$, gdje je l jednak putu koji zraka svjetla prođe kroz kivetu i iznosi 1 cm. Rezultat je izražen kao U/mg proteina što odgovara µmol razgrađenog H₂O₂ po minuti po miligramu proteina.

3.2.6.6. *Mjerenje koncentracije ukupnog glutationa (GSH)*

Koncentraciju ukupnog glutationa određena je prema modificiranoj metodi koju je opisao Tietze (192). Metoda se temelji na reakciji tiolnog reagensa 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoične kiseline (DTNB, Ellmanov reagens) s GSH pri čemu se stvara kromofor 5-tionitrobenzoična kiselina (TNB) koja apsorbira pri valnoj duljini 405-414 nm. Osim TNB, stvara se i GS-TNB koji se reducira pomoću GSH reduktaze i NADPH pri čemu se otpušta druga molekula TNB i reciklira GSH. Brzina nastanak TNB proporcionalna je recilirajućoj reakciji koja je proporcionalna koncentraciji glutationa u uzorku. Pri ovoj metodi sav oksidirani GSH (disulfid GSSG) prisutan u reakcijskoj smjesi ili nastao iz miješanog disulfida GSH s GS-TNB brzo se reducira do GSH. Konačan rezultat koji se dobije odgovara ukupnoj koncentraciji reduciranog i oksidiranog GSH u uzorku.

Koncentracija ukupnog GSH mjerena je u mikrotitarskoj pločici. U jednu jažicu dodano je 20 µL uzorka razrijeđenog 40 puta, 40 µL 0,035 M HCl i 40 µL 10 mM DTNB. Apsorbancija je mjerena na valnoj duljini od 415 nm (Microplate reader Model 550, Bio-Rad, SAD). Zatim je dodano 100 µL otopine GR i NADPH te je mjerena promjena apsorbancije tijekom 5 min. Priprema navedenih otopina prikazana je u **Tablici 8**. Za standard korištena je koncentracija reduciranog GSH (0-100 µM). Nacrtani su pravci za sve standarde kao promjena apsorbancije u vremenu, očitani su nagibi pravaca. Nacrtan je pravac kao ovisnost nagiba pravca o

koncentraciji GSH. Konačno, taj dobiveni pravac korišten je za dobivanje koncentracije ukupnog GSH u uzorku prema sljedećoj formuli:

$$c = ((\text{nagib pravca uzorka} - \text{nagib pravca slijepe probe}) / \text{nagib pravca standarda}) \times \text{razrijeđenje.}$$

Koncentracija ukupnog GSH prikazna je kao μM GSH po mL proteina.

Tablica 8. Priprema otopine za određivanje koncentracije GSH*

0,5 M pufer PBS	17 mL 1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ i (3 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ i dH_2O do 17 mL) 183 mL 1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ (65,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ i dH_2O do 183 mL)
0,5 M EDTA	37,2 g EDTA u 200 mL dH_2O
0,5 M pufer PBS s 0,5 M EDTA	200 mL 0,5M PBS + 200 mL 0,5M EDTA
0,035 M HCl	7 mL 0,1 HCl u dH_2O do 200 mL
10 mM DTNB	20 mg DTNB i 0,5M pufer PBS s 0,5 M EDTA do 5 mL
0,8 mM NADPH	6,67 mg NADPH i 0,5M pufer PBS s 0,5 M EDTA do 10 mL
Mješavina GR	20 μL GR (50 U/mL) u 9980 μL 0,8 mM NADPH

*Korištene su kemikalije proizvođača Sigma-Aldrich, Njemačka: GR - Glutation-reduktaza iz pekarskog kvasca (*S. cerevisiae*), 100-300 jedinica (units)/mg protein (biuret)); EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), $M_r = 372,24$ g/mol; DTNB, $M_r = 396,35$ g/mol; NADPH, $M_r = 833,35$ g/mol.

3.2.6.7. Mjerenje enzimskih aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

Aktivnost SOD određena je prema metodi po Flohé i Ötting (25). Metoda je posredna i temelji se na inhibiciji redukcije citokroma c u sustavu ksantin/ksantin oksidaza.

U ovoj metodi korištene su dvije slijepa probe. Prva slijepa proba sastojala se samo od otopine A (Tablica 9) te je apsorbancija u spektrofotometru mjerena na 550 nm (UV-160, Shimadzu, Japan) tijekom 3 min. Druga slijepa proba služila je za namještanje aktivnosti ksantin oksidaze. U kivetu je dodano redom: 25 µL dH₂O, 1,45 mL otopine A i 15-30 µL ksantin oksidaze (0,8 U/mL). Odmah nakon dodavanja enzima i brzog miješanja mjerena je promjena apsorbancije, odnosno aktivnost enzima ksantin oksidaze tijekom 3 min na 550 nm. Aktivnost ksantin oksidaze mora biti oko 0,025 U/min. U ovom slučaju volumen XOD koji je odgovarao bio je 25 µL. Nakon što se postigla optimalna aktivnost SOD, analizirani su uzorci. U svaku reakcijsku smjesu umjesto dH₂O dodano je 25 µL uzorka te odgovarajući volumen ksantin oksidaze i odmah nakon toga mjerena je apsorbancija u spektrofotometru. Enzimski aktivnost mjerena je kao postotak inhibicije aktivnosti ksantin oksidaze koja se računa prema formuli: $\% \text{ inhibicije} = 100 - (\Delta A_{\text{uzorka}} / \Delta A_{\text{slijepa proba}}) \times 100$. Enzimski aktivnost SOD računa se prema formuli: $\text{aktivnost SOD} = 10^{((\% \text{ inhibicije} + 12,757) / 30,932)}$. Aktivnost SOD izražena je kao U/mg proteina.

Tablica 9. Priprema otopina za određivanje aktivnosti SOD*

50 mM PBS	Pomiješati 17 mL (1,56 g NaH ₂ PO ₄ × 2H ₂ O u 50 mL dH ₂ O) i 183 mL (5,678 g Na ₂ HPO ₄ u 200 mL dH ₂ O), namjestiti pH=7,8 te nadopuniti do 800 mL
50 mM PBS s 0,1 mM EDTA	3,72 mg EDTA u 100 mL 50 mM PBS
Reakcijska otopina A	190 mL 0,05 mM citokroma C (29 mg citokroma C u 50 mM PBS s 0,1 mM EDTA do 190 mL) i 19 mL 1 mM ksantina (3 mg ksantina u 19,74 mL 1 mM NaOH teško se otapa, lagano zagrijavati)
Reakcijska otopina B XOD (aktivnost 0,8 U/mL)	40 µL ksantin oksidaze i 960 µL dH ₂ O

*Korištene su kemikalije proizvođača Sigma-Aldrich, Njemačka: Citokrom c iz goveđeg srca, Mr = 12,327 g/mol; Ksantin oksidaza iz kravljeg mlijeka, 50 U (1,05 U/mg P).

3.2.7. Metode utvrđivanja neuropatologije

3.2.7.1. Histologija i imunohistokemija

Nakon fiksacije u 4% puferiranom formalaldehidu i uklapanja u parafin, učinjeni su serijski prerezi debljine 7-10 μm te osnovno bojanje hemalon-eozinom (HE) u Laboratoriju za patologiju preživača i transmisivne spongiformne encefalopatije, Hrvatski veterinarski institut Zagreb. Imunohistokemija i Belschowsky su napravljeni u Laboratoriju za razvojnu neuropatologiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga (HIIM) u Zagrebu.

3.2.7.1.1. Bojanje modificiraom metodom po Bielschowskom

Bielschowsky tehnika je metoda bojenja srebrom koja se koristi u histokemiji za vizualizaciju živčanih vlakana, uključujući multipolarne interneurone u cerebelumu (mali mozak). Ujedno je i jedna od široko korištenih tehnika koja se koristi za otkrivanje AD patologije detekcijom neurofibrilarnih snopića (TNF). Metoda se pripisuje njemačkom neurologu i neurohistologu Maxu Bielschowskom koji je modificirao u odnosu na prethodnu metodu koju je razvio Ramon y Caja (194).

Nakon deparafinizacije i rehidracije uzorci tkiva na stakalcima su inkubirana tijekom 20 min u 20% otopini AgNO_3 , na tresilici u mraku. Nakon toga stakalca s uzorcima tkiva su isprana destiliranom vodom te potom inkubirana na 15 min u istoj otopini s dodatkom kap po kap ishlapjelog amonijaka u suvišku. Po završetku inkubacije stakalca su potopljena u destiliranoj vodi s amonijakom na 5 min. Potom su potopljena na 5 min (dok nisu pocrnila) u otopinu AgNO_3 /amonijaka i razvijača te potom isprana 5 min u dH_2O i fiksirana u 5% otopini natrijevog tiosulfata 5 min. Nakon ispiranja u destiliranoj vodi i dehidracije prerezi na stakalcima su pokriveni.

Tablica 10. Priprema otopina

Otopina AgNO ₃	20 g AgNO ₃ 100 mL dH ₂ O
Otopina razvijajača	20 mL formalina 100 mL dH ₂ O 1 kap konc. HNO ₃ 0,5 g limunske kiseline
5% otopina natrijeva tiosulfata	5 g natrijeva tiosulfata 100 mL dH ₂ O

3.2.7.1.2. *Imunohistokemija*

Kako bi vizualizirali neuropatološke (ne)promjene sagitalni prerezi mozga podvrgnuti su označavanju imunohistokemijskim biljezima: purified (azide free) anti- β -amyloid, 17-24 (Clone: 4G8) (BioLegend, San Diego, CA); anti-phospho-PHF-tau pSer202/Thr205 (AT8) (Thermo Fisher Scientificu, SAD); anti-tau pSer396/404 (PHF1) i Tau-001 (MC1) (dar Dr. Peter Davies-a, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY); CD68 (E-11) i HLA-DR (Dako, SAD); Iba1 (Wako Pure Chemical Industries, Japan).

Prije početka imunohistokemijskog bojenja preparati tkiva mozga su deparafinizirani serijom ispiranja ksilolom i rehidrirani etanolom u nizu padajućih koncentracija (apsolutni etanol, 96%-tni etanol, 70%-tni etanol). Nakon deparafinizacije i rehidracije preparati su isprani PBS-om (engl. *phosphate buffered saline*, pH = 7,4) a otvaranje epitopa antigena koje prepoznaje protutijelo (engl. *antigen retrieval*) izvršeno je kuhanjem u citratnom puferu (pH = 6,0).

Endogene peroksidaze inaktivirane su predobradom metanolom s 0,3%-tnim vodikovim peroksidom (AT8, PHF1, MC1, Iba1, CD68 i HLA-DR) te 70%-otnom mravljom kiselinom (4G8). Nakon daljnjeg ispiranja PBS-om uslijedilo je blokiranje nespecifičnog vezanja protutijela.

Blokiranje je postupak kojim se sprječava pojava lažno pozitivnog obojenja zbog nespecifičnog vezanja protutijela. Za blokiranje se koriste serumi životinja ili otopine proteina koji tvore tanak sloj na površini tkiva i time sprječavaju nespecifično vezanje protutijela. Preparati se prije nakapavanja otopine za blokiranje okruže tankim slojem hidrofobne tekućine (*PAP pen*, Sigma

Aldrich, Nemačka) koja predstavlja barijeru za istjecanje nakapane otopine. Otopina za blokiranje uvjetovana je primarnim protutijelom proizvedenim u serumu zece ili miša: (a) 10%-tni NGS (engl. *normal goat serum*) u 0,5%-tnom Triton/PBS za Iba1 (zec); (b) 5%-tni NGS u 0,5%-tnom Triton/PBS za AT8 (miš); (c) 5%-tni BSA (engl. *bovine serum albumin*) u 0,5%-tnom Triton/PBS za 4G8, PHF1, MC1, CD68 i HLA-DR (miš). Blokiranje je provedeno kroz 60 min na sobnoj temperaturi u vlažnoj komori.

Primarna protutijela razrijeđena su u odgovarajućoj otopini za blokiranje, kako je navedeno gore, u omjerima 4G8 1:2000, AT8 1:500, MC1 1:20, PHF1 1:1500, Iba1 1:250, CD68 1:1250 i HLA-DR 1:300. Nakon uklanjanja otopine za blokiranje, rezovi su prekriveni razrijeđenim protutijelima i inkubirani preko noći na 4 °C nakon čega je uslijedilo ispiranje PBS-om. Za kontrolu bojanja za svaki od navedenih biljega uzet je dodatni tkivni uzorak koji nije obrađen primarnim protutijelom, takozvana negativna kontrola, odnosno kontrola specifičnosti vezanja primarnog protutijela

Sekundarna protutijela razrijeđena su u dvostruko razrijeđenoj otopini za blokiranje. Sekundarno protutijelo *anti-mouse* Vectastain® ABC kit, kataloški broj PK-4002 (VECTOR LABORATORIES, SAD) korišteno za primarna protutijela 4G8, AT8, PHF1, MC1, CD68 i HLA-DR razrijeđeno je u omjeru 1:200, a sekundarno protutijelo *anti-rabbit* Vectastain® ABC kit, kataloški broj PK-4001 (VECTOR LABORATORIES, SAD) korišteno za primarno protutijelo Iba1 razrijeđeno je u omjeru 1:200. Tako razrijeđena sekundarna protutijela nakapana su na sve rezove uključujući i negativnu kontrolu. Inkubacija preparata provedena je u vlažnoj komori kroz 60 min nakon čega je uslijedilo ispiranje PBS-om.

Tercijarno protutijelo (A i B komponenta *anti-mouse/rabbit* Vectastain® ABC kit) također se priprema u dvostruko razrijeđenim otopinama za blokiranje u omjeru 1:200 kao i sekundarno. Preparati su inkubirani u vlažnoj komori 60 min nakon čega je uslijedilo ispiranje PBS-om.

Vizualizacija je provedena otopinom koja sadrži diaminobenzidin (3,3'-diaminobenzidin, DAB) (SIGMAFAST™ DAB with Metal Enhancer Tablet Set, kataloški broj D 0426), a pripremljena je prema uputama proizvođača (Sigma-Aldrich, Njemačka). Preparati su nakapani otopinom za vizualizaciju i inkubirani na sobnoj temperaturi kroz 10 min koliko je trajalo razvijanje. Uslijedilo je ispiranje u PBS-u i zatim u destiliranoj vodi.

Nakon sušenja u mraku stakalca su prebačena u kadicu s HistoClear-om (Thermo Fisher Scientific, SAD). Rezovi su prekriveni kapljicom HistoMounta (Poly-Mount®, kataloški broj 08381-120; Polysciences, SAD) i pokrovnim stakalcem.

Mikroskopske snimke preparata napravljene su na mikroskopu Nikon YS2-H Alphaphot-2 digitalnom kamerom Nikon DXM 1200 uz pomoć programa Nikon ACT-1 i digitalnom kamerom AxioCam ERc5s Zeiss uz pomoć programa AxioCam ERc5s-ZEN2. Kvantitativna analiza snimaka preparat (broj, površina i intenzitet obojenja) učinjena je uz pomoć programa Nikon ACT-1 i AxioCam ERc5s-ZEN2.

Za biljeg Iba1 učini je semikvantitativna analiza praćenjem imunoreaktivnosti prema skali:

0 = imunoreaktivnost nije prisutna

1 = prisutno je nekoliko imunoreaktivnih stanica, sve stanice su razgranate

2 = umjeren broj imunoreaktivnih stanica, uglavnom su razgranate, manji broj aktiviranih

3 = mnogo difuzno raspoređenih imunoreaktivnih stanica, sve su aktivirane

4 = mnogo velikih nakupina aktiviranih mikroglia stanica

Područja hipokampalne formacije (nazubljena vijuga (GD), hilus, CA2/3, CA1, subikulum (SUB) i bijela tvar) određena su prema radu Westa i Gundersena (195).

3.2.7.2. Određivanje koncentracije moždanog neurotrofnog čimbenika (engl. brain-derived neurotrophic factor, BDNF)

BDNF je član porodice neurotrofina, proteina koji su vrlo važni regulatori preživljenja, razvoja i funkcije neurona, a imaju i ključnu ulogu u embriogenezi i organogenezi te u regulaciji sinaptičke aktivnosti, sinteze neuroprijenosnika i sinaptičke plastičnosti kod odraslih osoba (196-200). Široko je eksprimiran i rasprostranjen u mozgu, za razliku od nekih drugih neurotrofina, a njegova funkcija je ključna za preživljavanje i plastičnost neurona diljem moždanog tkiva, posebice neurona u onim regijama mozga koje su ozbiljno oštećene u AD-u (neuroni hipokampusa, kortikalni i kolinergički neuroni) (201-203). Za određivanje BDNF-a korišten je komercijalni štakorski BDNF ELISA kit proizvođača Thermo Fisher Scientific (SAD), koji radi na metodi direktne sendvič ELISE. Testiranje je provedeno prema uputama proizvođača.

Uzorci i standard (0-3000 pg/mL) prije dodavanja u jažice (100 μ L) su razrijeđeni otapalom C. Nakon inkubacije od 2,5 sata na sobnoj temperaturi (engl. *room temperature*, RT) u mraku, isprani su puferom za ispiranje. Potom su dodana biotinirana protutjela (100 μ L), inkubacija 1 h/RT/mrak. Nakon ispiranja puferom dodan je streptavidin konjugiran s HRP-om (engl. *horseradish peroxidase*), inkubacija 45 min/RT/mrak. Nakon ispiranja puferom dodano je 100 μ L TMB supstrata (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin), inkubacija 30min/RT/mrak. Reakcija između HRP enzima i TMB supstrata dala je plavo obojenje, a dodatkom STOP otopine (50 μ L) u reakcijsku smjesu boja se promijenila u žutu. Mjerenje apsorbancije učinjeno je spektrofotometrom na 450 nm (Microplate reader Model 550, Bio-Rad, SAD). Koncentraciju BDNF-a u uzorcima određena je preko jedndžbe pravca i poznate koncentracije standarda.

3.2.7.3. Određivanje aktivnosti acetilkolinesteraze (AChE)

Za određivanja aktivnosti AChE korištena je kolorimetrijska metoda koju su osmislili Ellman i sur. (204). Aktivnost enzima se određuje mjerenjem nastanka tiokolina kao nusprodukta hidrolize acetilkolina (ACh). Tiokolin odmah po nastanku reagira s Ellmanovim reagensom, odnosno 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzojevim) anionom te nastaje žuto obojeni anion 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline. Reakcija se odvija pri neutralnom ili alkalnom pH.

U falkon epruvetu stavljena je desna polovica mozga i homogenizacijski pufer u omjeru 1:5 w/v te je sonificirano ultrazvučnim homogenizatorom Bandelin Sonoplus HD2070 (Bandelin, Njemačka) upotrebom sonde MS73 (Bandelin, Njemačka). Dobiveni homogenati su centrifugirani (ultracentrifuga Mikro 200R, Hettich, Njemačka) pri 9000 rpm/30min/+4 °C, a potom je izdvojen nadtalog. Nakon toga je u kivetu dodano 1,4 mL fosfatnog pufera, 25 μ L DTNB-a, 40 μ L dobivenog nadtaloga i 35 μ L acetiltiokolin jodida. Uslijedilo je mjerenje apsorbancije na 412 nm tijekom 30 sekundi (UV-160, Shimatzu, Japan). Iz izmjerene apsorbancije uz pomoć formule navedene u gore citiranom radu izračunata je aktivnost AChE koja je izražena kao R ($\text{molL}^{-1}/\text{min/g}$ tkiva).

Tablica 11. Otopine za određivanje aktivnosti acetilkolinesteraze

Otopina A	3,45 g NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O + dH ₂ O do 125 mL
Otopina B	7,1 g Na ₂ HPO ₄ (bezvodni) + dH ₂ O do 250 mL
0,1 M fosfatni pufer pH = 7,2 (homogenizacijski pufer)	84 mL otopine A + 216 mL otopine B + 300 mL dH ₂ O; provjeriti pH, po potrebi namjestiti pomoću 2 M NaOH ili HCl
1,6 mM DTNB	0,0317 g DTNB + 50 mL fosfatnog pufera

3.2.8. Metode provjere neuropale

3.2.8.1. Određivanje relativnog indeksa mozga

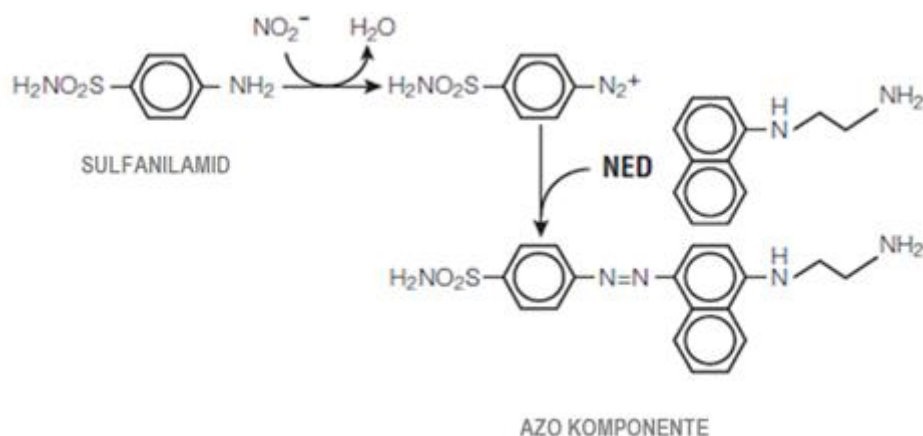
Nakon žrtvovanja izoliran je mozak i izvagan na digitalnoj vagi (Analytical balance ABS 220–4, d = 0,01-220 g, Kern & Sohn GmbH, Njemačka). Dobivene vrijednosti mase mozga, zajedno s dobivenim vrijednostima mase životinja prije žrtvovanja upotrebljene su za izračun relativnog indeksa mozga prema formuli:

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

3.2.8.2. Mjerenje dušikovog oksida indirektnom metodom prema Griess-u

Ova analiza se temelji na reakciji diazotacije koju je prvi opisao Griess (205). Brojne stanice sisavaca sintetiziraju dušikov oksid oksidacijom L-arginina pomoću enzima dušik oksid sintetaze. U uvjetima *in vitro* dušikov oksid se brzo metabolizira u stabilne produkte, nitrite (NO₂⁻) ili nitrate (NO₃⁻), ovisno oksidira li se molekularnim kisikom ili superoksidnim anionom, i kao takav se izlučuje izvan stanice u hranjivu podlogu (206). Sinteza dušikovog oksida može se indirektno odrediti spektrofotometrijski Griessovom metodom, mjereći nitrite i nitrate akumulirane u tekućoj hranjivoj podlozi u kojoj rastu stanice.

U ovom istraživanju korišten je kit *Griess reagent system* proizvođača Promega (SAD), koji za analizu NO_2^- koristi 1% sulfanilamid pripremljen u 5% fosfatnoj kiselini i 0,1% N-1-naftiletilediamin dihidroklorid (NED). U mikrotitarsku ploču dodano je 50 μL uzorka u triplikatu, potom 50 μL sulfanilamid otopine i uslijedila je inkubacija 10 minuta na sobnoj temperaturi (zaštićeno od svjetla). Nakon prve inkubacije dodano je 50 μL NED te je inkubirano 10 minuta na sobnoj temperaturi (zaštićeno od svjetla). Nakon druge inkubacije (ružičasto obojenje uzorka) je očitana apsorbancija na 540 nm na uređaju Labsystems iEMS Reader MF (Labsystem, Finska). Kao standard upotrebljen je 0,1 M natrijev nitrit u koncentracijama 0-100 μM . Iz standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji nitrita određen je nagib pravca. Preko nagiba pravca izračunata je koncentracija NO_2^- u uzorcima. Koncentracija NO_2^- izražena je kao $\mu\text{M}/\mu\text{L}$.



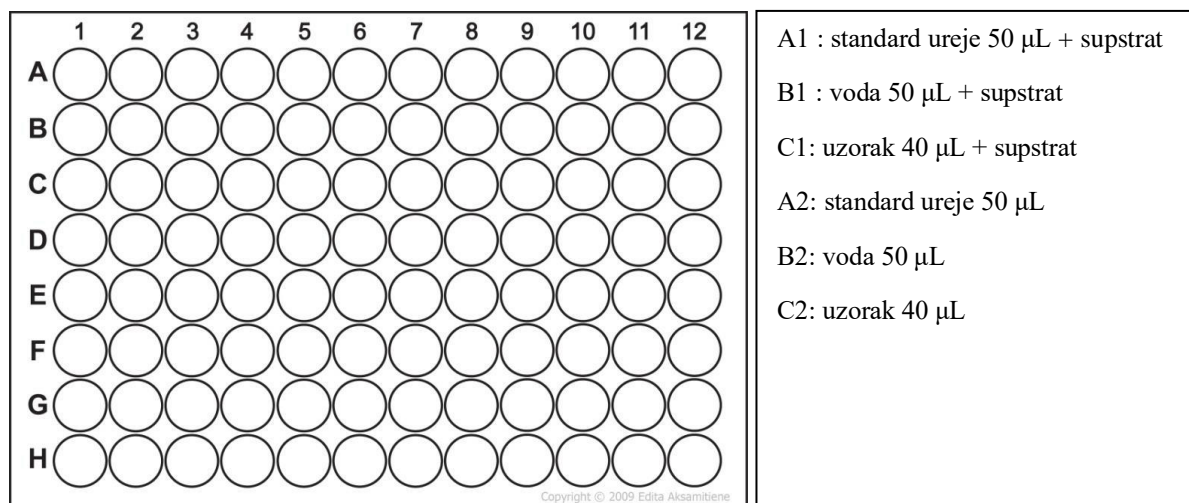
Slika 21. Kemijska reakcija nastala mjerenjem NO_2^- koristeći Griess reagens sustav (preuzeto i prilagođeno prema 207)

3.2.8.3. *Određivanje aktivnosti arginaze*

Arginaza (engl. *L-arginine amidinohydrolase*, *L-arginin amidinohidrolaza*) je enzim koji sudjeluje u posljednjoj reakciji metaboličkog ciklusa ureje, gdje katalizira pretvorbu aminokiseline L-arginina u L-ornitin i ureju ($\text{L-arginin} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{L-ornitin} + \text{ureja}$). Postoje dvije izoforme ovog enzima, jetrena arginaza-1 (citoplazmatski protein) i arginaza-2 (mitohondrijski protein) prisutna u bubrezima, mozgu, prostati, tankom crijevu i mliječnim žlijezdama (208). Zanimljivo je da se inducibilna dušik oksid sintaza (iNOS) i arginaza natječu

za zajednički supstrat, aminokiselinu L-arginin (209). M1-makrofagi potiču iNOS da katabolizira L-arginin u NO (citostatični i citolitički učinak) i citrulin, dok su M2 makrofagi karakteristični po visokoj ekspresiji arginaze-1 (Arg-1), citosolnog enzima koji katalizira alternativni metabolički put L-arginina u ornitin i poliamine, koji su prekursori u sintezi kolagena i stanične proliferacije (210, 211). Prema tome, povećana regulacija Arg uglavnom je prisutna u M2 makrofagima koji luče protuupalne citokine (npr. IL-10), dok je iNOS više prisutna u M1 makrofagima koji luče proupalne citokine (npr. IL-1 β , IL-6) i imaju pojačano antimikrobno djelovanje.

Kako bi provjerili razinu arginaze-1 u pokusnim životinjama koristili smo *Arginase activity assay kit* MAK112 (Sigma- Aldrich, Njemačka). Prema uputama proizvođača u A1 i A2 jažicu dodano je 50 μ L 1 mM standardne radne otopine uree, u B1 i B2 jažicu 50 μ L vode, a u preostale jažice po 40 μ L seruma u duplikatu. Stupci 2, 4, 6, 8, 10 i 12 su slijepo probe. Potom je u sve jažice izuzev onih za slijepu probu dodano 10 μ L 5x koncentriranog supstratnog pufera, pločica je zamotana u aluminijsku foliju i uzorci su inkubirani 2 h pri 37 °C.



Slika 22. Konstrukcija mikrotitarske pločice kod određivanja aktivnosti arginaze

Nakon inkubacije dodano je 200 μ L reagensa uree u svaku jažicu kako bi se zaustavila reakcija, a zatim 10 μ L 5x supstratnog pufera u jažice za slijepu probu (stupci 2, 4, 6, 8, 10 i 12). Uslijedila je inkubacija od 1 h na sobnoj temperaturi. Apsorbancija je očitana na 430 nm (Labsystems iEMS Reader MF, Labssystem, Finska). Aktivnost arginaze je izračunata prema formuli: $Aktivnost\ arginaze = (A(uzorka) - A(prazne\ jažice)) / (A(standarda) - A(vode)) \times ((1\ mM$

$\times 50 \times 103 / (V \times T)$), gdje je T vrijeme reakcije u minutama, V volumen uzorka dodan u jažice, 1 mM koncentracija standarda ureje, 50 reakcijski volumen, a 103 konverzijski čimbenik mM u μ M. Jedna jedinica arginaze je količina enzima dovoljna za pretvorbu 1 μ mola L- arginina u ornitin i ureu u minuti, pri 37 °C i pH 9,5.

3.2.8.4. Mjerenje razine proupalnih citokina

Jedan od ciljeva ovog istraživanja je provjera neuroupale nakon primjene $AlCl_3$ u kombinaciji s D-gal. Iz tog razloga korišten je *Multi-Analyte ELISArray Kits* (Qiagen, Njemačka) za određivanje štakorskih proupalnih citokina kako bi odredili razinu proupalnih citokina i kemokina u u uzorku mozga eksperimentalnih životinja. Ovim ELISA kitom analizirana je razina 12 citokina i kemokina (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, INF- γ , TNF- α , GM-CSF, RANTES). Tkivo mozga je homogenizirano u PBS-u (1:5), potom centrifugirano pri 15000 rpm/10 min/+4 °C. Nadtalog je pohranjen na -80 °C do analize. ELISA kit je korišten prema uputama proizvođača, a mjerenje provedeno na 450 nm s korekcijom na 570 nm na mikrotitarskom čitaču Labsystems iEMS Reader MF (Labsystem, Njemačka). Koncentracija je izračunata preko standardne krivulje i izražena u pg/mL.

3.2.9. Neurološki pregled jedinki (engl. neurological screening, NS)

Za utvrđivanje i procjenu mogućih motoričkih i senzornih defecita kod štakora nakon primjene supstanci prema eksperimentalnom dizajnu (**Tablica 4**) učinjen je prilagođeni NS prema radu koji su napisali Choen i sur. (212).

Dan prije početka obrade i 24 sata po završetku istoga učinjena je procjena neurološkim pregledom. NS je sačinjen od niza neuroloških refleksnih testova: uspravljanje nakon što se postavi na dorzalnu stranu; treptaj očiju (odgovor na lagani dodir vanjskog kuta oka tankim kistom), trzanje ušiju i povlačenje udova kao odgovor na taktilne podražaje (lagani dodir s prstom lateks rukavice); usmjeravajući odgovor njuha (izloženost ekstratu naranče) i vizualni podražaj (svjetiljka); i zaprepašteni odgovor nakon auditornog podražaja (metalni kliker). Konačna procjena je neurološkog deficita je temeljena na odsustvu ili prisustvu odgovora na podražaj.

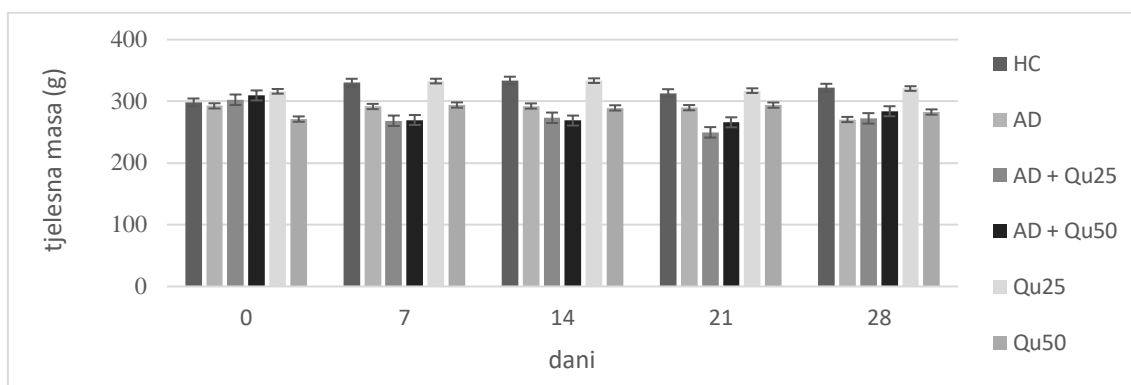
3.3. Statistička analiza

Svi pokusi provedeni su u duplikatu. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška (SV \pm 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 $P \leq 0,05$.

4. REZULTATI

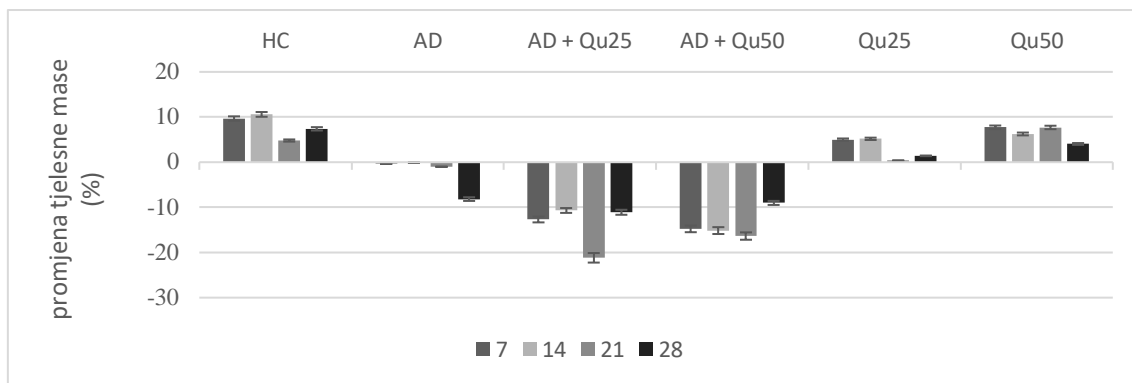
4.1. Učinak subkronične primjene AlCl₃ + D-gal i Qu na tjelesnu masu pokusnih životinja

Procjena toksičnosti na nivou cijelog organizma praćena je vaganjem životinja tijekom istraživanja i praćenjem promjena u tjelesnoj masi (Slika 23). Promjene u tjelesnoj masi (TM) praćene su na osnovu tjednog vaganja obrađenih skupina (Tablica 4) i izražene su u gramima. Gubitak tjelesne mase tijekom perioda istraživanja vidljiv je kod skupina kako slijedi AD, AD + Qu₂₅ i AD + Qu₅₀ i AD, ali bez statistički značajne razlike ($P \geq 0,05$) u odnosu na skupine (Qu₂₅ i Qu₅₀), kao niti u odnosu na zdravu kontrolu skupinu (HC) gdje je vidljiv porast u tjelesnoj masi tijekom trajanja istraživanja.



Slika 23. Praćenje tjelesne mase tijekom subkronične primjene AlCl₃ + D-gal i Qu. Štakori su raspoređeni u 6 različitih skupina (n=10) podjednake tjelesne mase s razlikom ± 10 g. Tijekom 28 dana svakodnevne obrade *ip* s 0,9% NaCl (HC), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze (AD), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 25 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₂₅), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 50 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₅₀), 25 mg/kg/tm kvercetina (Qu₂₅) i 50 mg/kg/tm kvercetina (Qu₅₀) vagani su jedanput tjedno. Rezultati su prikazani kao SV \pm SP pojedine skupine. Promjene u tjelesnoj masi između obrađenih skupina ne pokazuju statistički značajnu razliku ($P \geq 0,05$). Kratice: tm – tjelesna masa, *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

Promjene u tjelesnoj masi praćene su na osnovu tjednog vaganja obrađenih skupina i izražene su u postotku (Slika 24). Gubitak u tjelesnoj masi najočitiiji je kod skupina AD + Qu₂₅, AD + Qu₅₀ i AD, ali bez statistički značajnog odstupanja ($P \geq 0,05$) u odnosu na kontrolnu HC i ostale skupine.



Slika 24. Promjene u tjelesnoj masi tijekom subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu. Štakori su raspoređeni u 6 različitih skupina ($n=10$) podjednake tjelesne mase s razlikom ± 10 g. Tijekom 28 dana svakodnevne obrade *ip* s 0,9% NaCl (HC), 10 mg/kg/tm $AlCl_3$ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze (AD), 10 mg/kg/tm $AlCl_3$ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 25 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₂₅), 10 mg/kg/tm $AlCl_3$ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 50 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₅₀), 25 mg/kg/tm kvercetina (Qu₂₅) i 50 mg/kg/tm kvercetina (Qu₅₀) vagani su jedanput tjedno. Rezultati su prikazani kao SV \pm SP pojedine skupine. Promjene u tjelesnoj masi između obrađenih skupina ne pokazuju statistički značajnu razliku ($P \geq 0,05$). Kratice: tm – tjelesna masa, *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

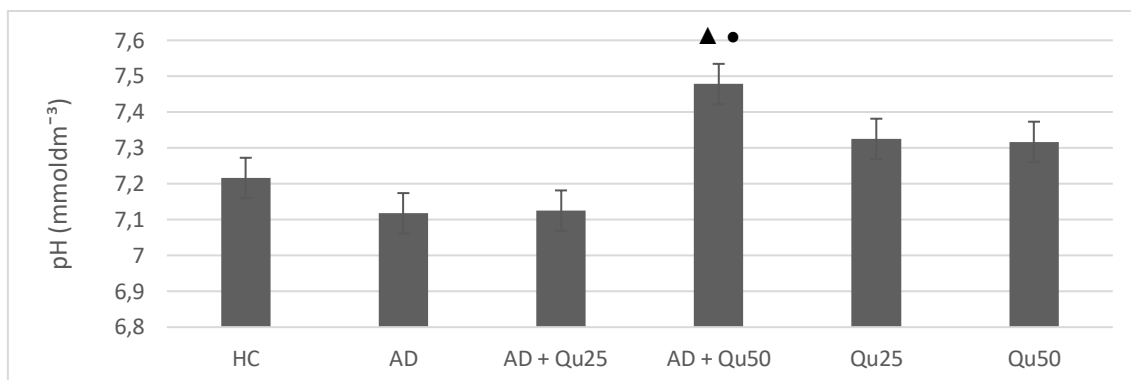
4.2. Praćenje učinka subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na crijevnu disbiozu

Promjene vezane uz disbiozu crijevne mikrobiote određene su u uzorku svježeg crijevnog sadržaja određivanjem pH vrijednosti, mjerenjem glikolitičke aktivnosti mikrobnih enzima, izolacijom probiotičkih bakterija na krutim i selektivnim podlogama te identifikacije pomoću API testova. Iz smrznutih uzoraka crijevnog sadržaja određena je koncentracija zonulina i učinjena je identifikacija bakterija crijevnoga mikrobioma sekvenciranjem V4 varijabilne regije 16S rRNA.

4.2.1. Učinak subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na pH vrijednosti crijevnog sadržaja kolona

Određivanjem pH vrijednosti crijevnog sadržaj (**Slika 25**) unutar ispitivanih skupina vidljiva je razlika između kontrolne skupine i ostalih skupina iz obrade u vidu snižene ili povišene pH vrijednosti (raspon pH = 7,1-7,5 mmol/dm³). Najveće odstupanje u odnosu na ostale obrađene

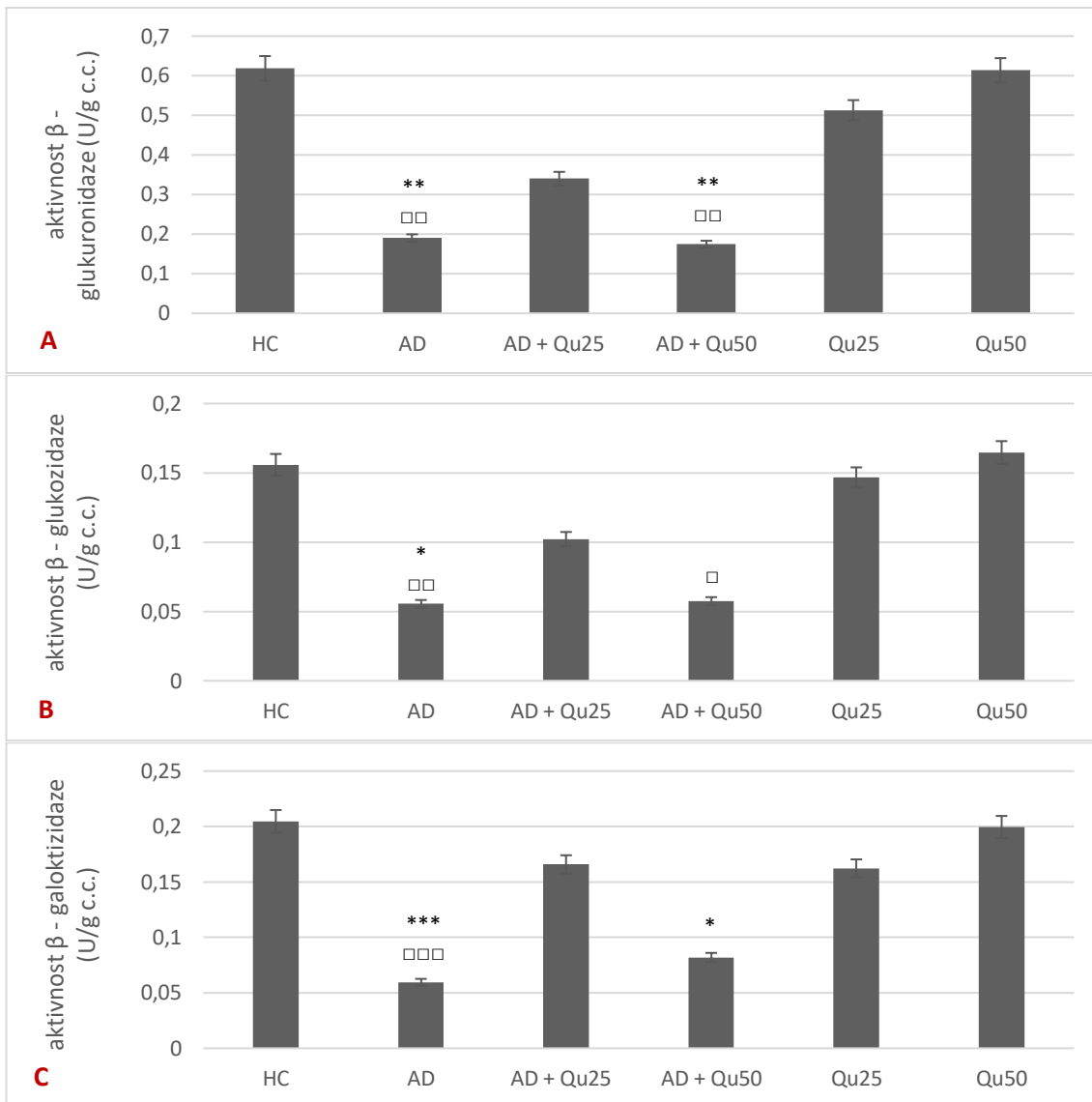
skupine pokazuje skupina AD + Qu₅₀, čija je pH vrijednost statistički značajno veća u odnosu na AD skupinu ($P = 0,028$) i u odnosu na skupinu AD + Qu₂₅ ($P = 0,017$).



Slika 25. Određivanje pH vrijednosti crijevnog sadržaja nakon subkronične primjene AlCl₃ + D-gal i Qu. Štakori su raspoređeni u 6 različitih skupina (n=10) podjednake tjelesne mase s razlikom ± 10 g te tijekom 28 dana obrađeni *ip* s 0,9% NaCl (HC), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze (AD), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 25 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₂₅), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 50 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₅₀), 25 mg/kg/tm kvercetina (Qu₂₅) i 50 mg/kg/tm kvercetina (Qu₅₀). Rezultati su prikazani kao SV ± SP pojedine skupine. ▲Statistički značajne promjene u odnosu na skupinu AD (▲ $P \leq 0,05$). •Statistički značajne promjene u odnosu na skupinu AD + Qu₂₅ (• $P \leq 0,05$). Kratice: tm – tjelesna masa, *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

4.2.2. Određivanje glikolitičke aktivnosti enzima crijevne mikrobiote u uzorku izoliranom iz kolona

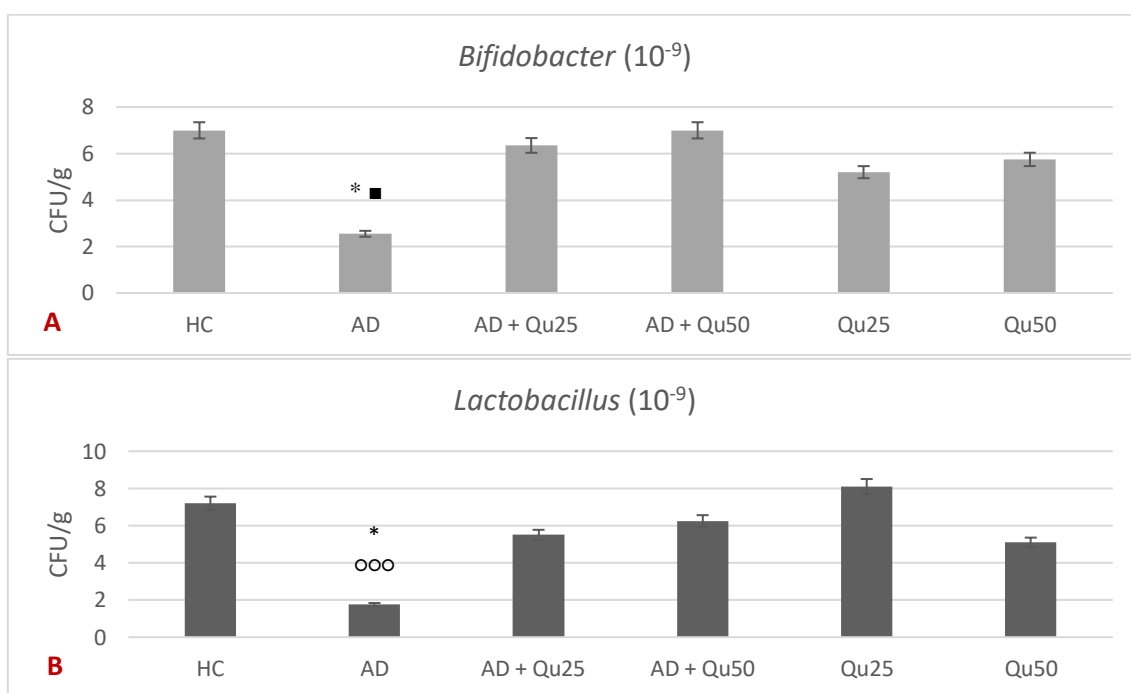
Provedenom analizom rezultata utvrđena je niža aktivnost enzima β -glukuronidaze, β -glukozidaze i β -galaktozidaze kod skupina AD i AD + Qu₅₀ sa statistički značajnim odstupanjem u odnosu na kontrolnu HC i ostale obrađene skupine (**Slika 26**). Smanjena aktivnost β -glukuronidaze (**Slika 26A**) značajna je kod skupine AD u odnosu na HC ($P = 0,005$) i Qu₅₀ ($P = 0,004$) te kod skupine AD + Qu₅₀ u odnosu na HC ($P = 0,003$) i Qu₅₀ ($P = 0,002$). Smanjena aktivnost β -glukozidaze (**Slika 26B**) značajna je kod skupine AD u odnosu na HC ($P = 0,03$) i Qu₅₀ ($P = 0,002$) te kod skupine AD + Qu₅₀ u odnosu na skupinu Qu₅₀ ($P = 0,018$). Smanjena aktivnost β -galaktozidaze (**Slika 26C**) značajna je kod skupine AD u odnosu na HC ($P = 0,0004$) i Qu₅₀ ($P = 0,0007$) te kod skupine AD + Qu₅₀ u odnosu na HC ($P = 0,03$).



Slika 26. Rezultati mjerenja glikolitičke aktivnosti enzima β -glukuronidaze, β -glukoizidaze i β -galaktozidaze nakon subkronične primjene AlCl_3 + D-gal i Qu. Štakori su raspoređeni u 6 različitih skupina (n=10) podjednake tjelesne mase s razlikom ± 10 g te tijekom 28 dana obrađeni *ip* s 0,9% NaCl (HC), 10 mg/kg/tm AlCl_3 + 60 mg/kg/tm D-galaktoze (AD), 10 mg/kg/tm AlCl_3 + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 25 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₂₅), 10 mg/kg/tm AlCl_3 + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 50 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₅₀), 25 mg/kg/tm kvercetina (Qu₂₅) i 50 mg/kg/tm kvercetina (Qu₅₀). Rezultati su prikazani kao SV \pm SP pojedine skupine. *Statistički značajne promjene u odnosu na skupinu HC (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$). □ Statistički značajne promjene u odnosu na skupinu Qu₅₀ (□ $P \leq 0,05$; □□ $P \leq 0,01$; □□□ $P \leq 0,001$). Kratice: tm – tjelesna masa, *ip* – intraperitonealno, U/g c.c predstavlja aktivnost po gramu crijevnog sadržaja (engl. *contents of colon, c.c.*), SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

4.2.3. Učinak subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na rast probiotičkih kolonija na selektivnim podlogama i identifikacija roda *Lactobacillus*

Rezultati dobiveni metodom brojanja kolonija (engl. *colony-forming unit*, CFU) naraslih na selektivnim podlogama za bakterijske rodove *Lactobacillus* i *Bifidobacter* su prikazani na **Slici 27**. Ova metoda je pokazala značajne razlike u broju kolonija koje su stvorile bakterije rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacter* u skupine AD u odnosu na ostale skupine. Statistički značajne vrijednosti prisutne su kod roda *Bifidobacterium* (**Slika 27A**) gdje je CFU/g smanjen kod skupine AD u odnosu na HC i AD + Qu₅₀ ($P = 0,02$) te kod roda *Lactobacillus* (**Slika 27B**) gdje je CFU/g smanjen kod skupine AD u odnosu na HC ($P = 0,02$) i Qu₂₅ ($P = 0,0009$).



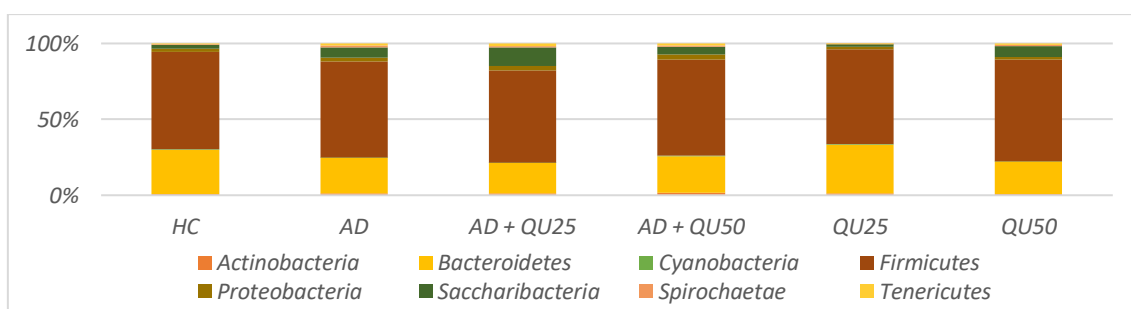
Slika 27. Rezultati brojanja kolonija nastalih na selektivnim podlogama za *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* nakon subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu. Štakori su raspoređeni u 6 različitih skupina ($n=10$) podjednake tjelesne mase s razlikom ± 10 g te tijekom 28 dana obrađeni *ip* s 0,9% NaCl (HC), 10 mg/kg/tm $AlCl_3$ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze (AD), 10 mg/kg/tm $AlCl_3$ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 25 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₂₅), 10 mg/kg/tm $AlCl_3$ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 50 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₅₀), 25 mg/kg/tm kvercetina (Qu₂₅) i 50 mg/kg/tm kvercetina (Qu₅₀). Rezultati su prikazani kao SV \pm SP pojedine skupine. *Statistički značajne promjene u odnosu na skupinu HC ($*P \leq 0,05$). ■Statistički značajne promjene u odnosu na skupinu AD + Qu₅₀ (■ $P \leq 0,05$). °Statistički značajne promjene u odnosu na skupinu Qu₂₅ (°°° $P \leq 0,001$). Kratice: tm – tjelesna masa, *ip* – intraperitonealno, CFU - engl. *colony-forming unit*, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

Prema rezultatima API testova za selektivne podloge za bakterije roda *Lactobacillus* dominantne su vrste: *L. brevis* (63,3%), *L. plantarum* (25,4%) i *Lactococcus lactis ssp. lactis* (10,2%) kod HC skupine; *L. plantarum* (97,1%) kod AD skupine; *Lactococcus lactis ssp. lactis* (51%), *L. brevis* (31,9%) i *L. plantarum* (15,6%) kod skupine AD + Qu₂₅; *L. brevis* (81,3%), *L. plantarum* (10,8%) i *Lactococcus lacti ssp. lacti* (7,6%) kod skupine AD + Qu₅₀; *L. brevis* (63,3%), *L. plantarum* (25,4%) i *Lactococcus lactis ssp. lactis* (10,2%) kod skupine Qu₂₅; *L. plantarum* (98,4%) kod skupine Qu₅₀.

4.2.4. Identifikacija sastava crijevne mikrobiote sekvenciranjem

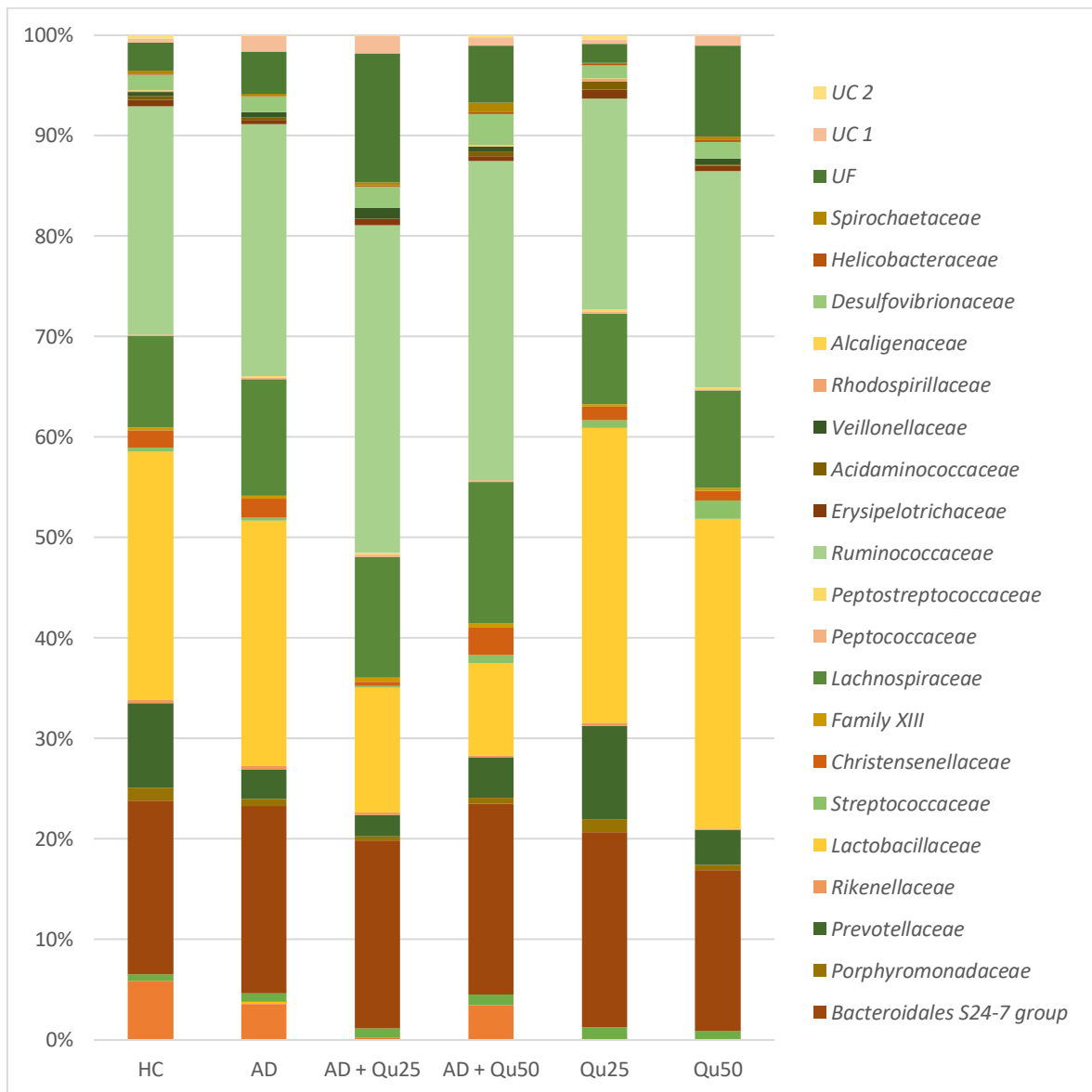
Nakon bioinformatičke obrade podataka i identifikacije bakterija, provedena je statistička analiza kako bi se prikazala varijabilnost crijevne mikrobiote u ovisnosti o provedenoj obradi. U daljnjem prikazu rezultata zabilježene su promjene na razini koljena (Slika 28), porodice (Slika 29-33) i probiotičkih vrsta (Slika 31). Sve promijene s *P* vrijednošću manjom od 0,05 smatraju se statistički značajne ($P \leq 0,05$; $P \leq 0,01$; $P \leq 0,001$).

4.2.4.1. Praćenje učinka subkronične primjene AlCl₃ + D-gal i Qu na promijene u crijevnom mikrobiomu na razini koljena



Slika 28. Rezultati analize crijevnoga mikrobioma na razini koljena nakon subkronične primjene AlCl₃ + D-gal i Qu. Štakori su raspoređeni u 6 različitih skupina (n=10) podjednake tjelesne mase s razlikom ± 10 g te tijekom 28 dana obrađeni *ip* s 0,9% NaCl (HC), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze (AD), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 25 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₂₅), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 50 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₅₀), 25 mg/kg/tm kvercetina (Qu₂₅) i 50 mg/kg/tm kvercetina (Qu₅₀). Ističu se dva dominantna koljena *Firmicutes* (59-66%) i *Bacteroidetes* (19,7-31,9) te dva najosjetljivija obzirom na provedenu obradu *Spirochaetae* (0,3-1,6%) i *Actinobacteria* (0,6-1,5%). Kratica: tm – tjelesna masa, *ip* – intraperitonealno.

4.2.4.2. Praćenje učinka subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na promijene u crijevnom mikrobiomu na razini porodice



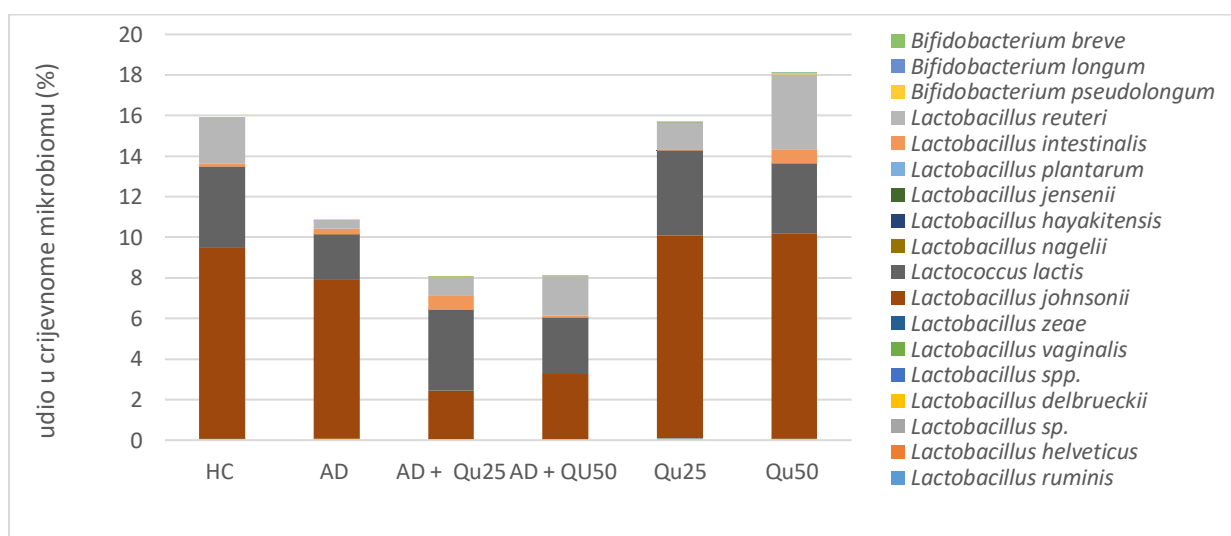
Slika 29. Rezultati analize crijevnoga mikrobioma na razini porodice nakon subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu. Štakori su raspoređeni u 6 različitih skupina ($n=10$) podjednake tjelesne mase s razlikom ± 10 g te tijekom 28 dana obrađeni *ip* s 0,9% NaCl (HC), 10 mg/kg/tm $AlCl_3$ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze (AD), 10 mg/kg/tm $AlCl_3$ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 25 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₂₅), 10 mg/kg/tm $AlCl_3$ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 50 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₅₀), 25 mg/kg/tm kvercetina (Qu₂₅) i 50 mg/kg/tm kvercetina (Qu₅₀). Analizom dobivenih podataka u crijevnoj mikrobioti obrađenih jedinki identificirano je 27 porodica. Od toga dvije porodice do sada nisu izolirane u mikrobiološkim kulturama (engl. *uncultured* bacterium, UC) i ostale su neidentificirane te ovisno o obradi njihov udio je 0,1-1,6%. Jedna je nepoznata porodica (engl. *unknown family*, UF) čiji udio ovisno o obradi čini 1,8-12,1% crijevne mikrobiote. Kratice: tm – tjelesna masa, *ip* – intraperitonealno.

4.2.4.2.1. Praćenje učinka subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na dominantne porodice



Slika 30. Prikaz dominantnih porodica nakon subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu. Štakori su raspoređeni u 6 različitih skupina (n=10) podjednake tjelesne mase s razlikom ± 10 g te tijekom 28 dana obrađeni

ip s 0,9% NaCl (HC), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze (AD), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 25 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₂₅), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 50 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₅₀), 25 mg/kg/tm kvercetina (Qu₂₅) i 50 mg/kg/tm kvercetina (Qu₅₀). Na **25A** su prikazane četiri dominantne porodice *Lactobacillaceae*, *Ruminococcaceae*, *Bacteroidales S24-7 group* i *Prevotellaceae*, čiji udio čini 10-30% crijevne mikrobiote kontrolne HC skupine. Rezultati na **25B-E** su prikazani kao SV ± SP pojedine skupine. *Statistički značajne promjene u odnosu na skupinu HC (***P* ≤ 0,01). •Statistički značajne promjene u odnosu na skupinu AD + Qu₂₅ (•*P* ≤ 0,05). ■Statistički značajne promjene u odnosu na skupinu AD + Qu₅₀ (■*P* ≤ 0,05). °Statistički značajne promjene u odnosu na skupinu Qu₂₅ (°*P* ≤ 0,01). □Statistički značajne promjene u odnosu na skupinu Qu₅₀ (□*P* ≤ 0,05; □□*P* ≤ 0,01). Kratice: tm – tjelesna masa, *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

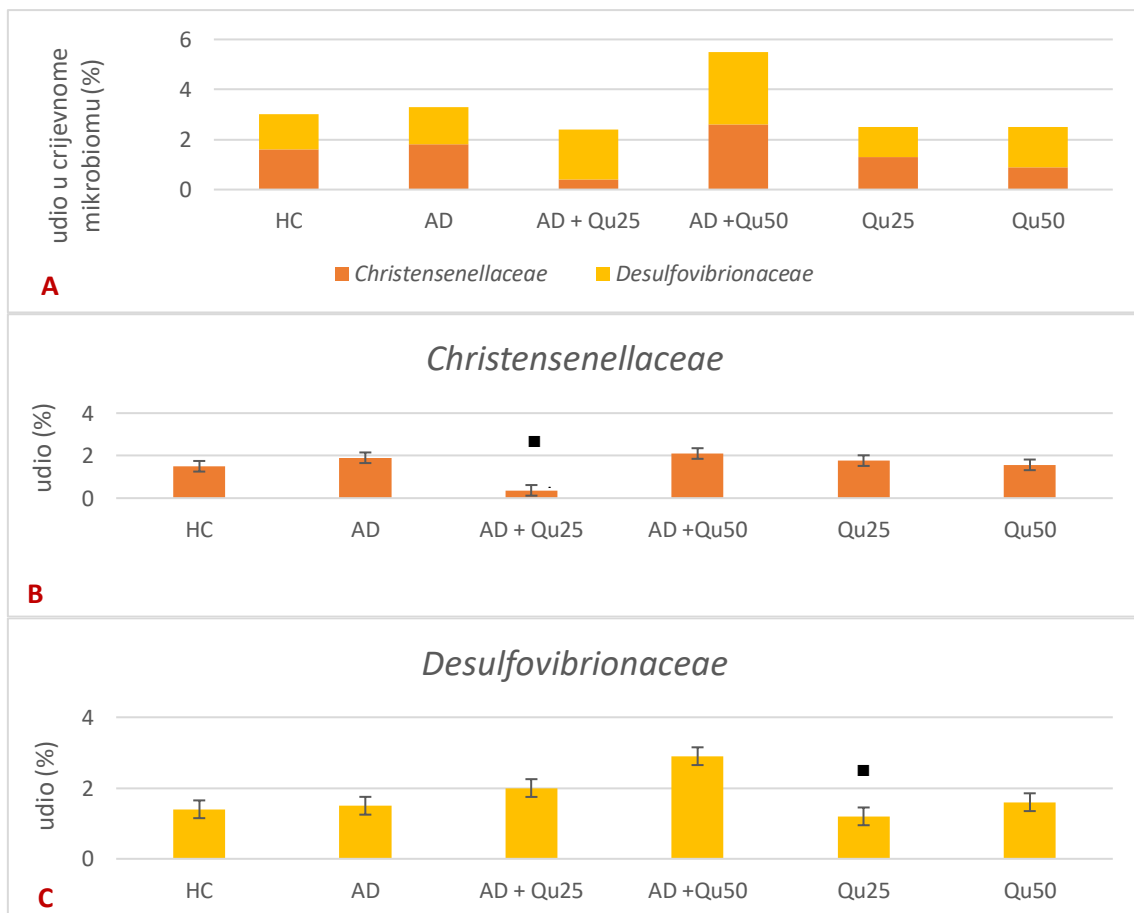


Slika 31. Udio vrsta unutar probiotičkih porodica *Lactobacillaceae* i *Bifidobacterium* nakon subkronične primjene AlCl₃ + D-gal i Qu. Štakori su raspoređeni u 6 različitih skupina (n=10) podjednake tjelesne mase s razlikom ± 10 g te tijekom 28 dana obrađeni *ip* s 0,9% NaCl (HC), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze (AD), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 25 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₂₅), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 50 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₅₀), 25 mg/kg/tm kvercetina (Qu₂₅) i 50 mg/kg/tm kvercetina (Qu₅₀). Bez statistički značajnog odstupanja (*P* ≥ 0,05) vidljiva je raznolikost vrsta unutar porodice *Lactobacillaceae* uz očitu prevlast vrsta *Lactobacillus johnsonii* (2,4-10,1%), *Lactococcus lactis* (2,2-4,1%) i *Lactobacillus reuteri* (0,4-3,7%) ovisno o obradi. Kratice: tm – tjelesna masa, *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

Na **Slikama 30B-E** prikazane su četiri dominantne porodice crijevne mikrobiote sa statistički značajnim vrijednostima obzirom na provedenu obradu. Statistički značajno povišen udio porodice *Lactobacillaceae* (**Slika 30B**) prisutan je kod skupine AD + Qu₂₅ u odnosu na Qu₅₀ (*P* = 0,04) te kod skupine AD + Qu₅₀ u odnosu na skupine: HC i Qu₂₅ (*P* = 0,01); Qu₅₀ (*P* = 0,002). Statistički značajno povišen udio porodice *Ruminococcaceae* (**Slika 30C**) prisutan je kod

skupine HC u odnosu na AD + Qu₂₅ ($P = 0,04$), kod AD u odnosu na AD + Qu₅₀ ($P = 0,02$) te kod Qu₅₀ u odnosu na AD + Qu₂₅ ($P = 0,04$) i AD + Qu₅₀ ($P = 0,02$). Porodica *Bacteroidales* (Slika 30D) obzirom na obradu nema statistički značajne promjene unutar obrađenih skupina ($P \geq 0,05$). Statistički značajno povišen udio porodice *Prevotellaceae* (Slika 30E) prisutan je kod skupine AD + Qu₂₅ u odnosu na HC ($P = 0,01$) i Qu₂₅ ($P = 0,01$). Daljnjom analizom unutar dvije probiotičke porodice *Lactobacillaceae* i *Bifidobacterium* (Slika 26) očita je prevlast porodice *Lactobacillaceae* te je identificirano 15 vrsta unutar ove porodice, ali bez statistički značajnih promjena unutar vrsta iste porodice ($P \geq 0,05$).

4.2.4.2.2. Praćenje učinka subkronične primjene AlCl₃ + D-gal i Qu na porodice čiji udio u kontrolnoj skupini (HC) čini 1-10%

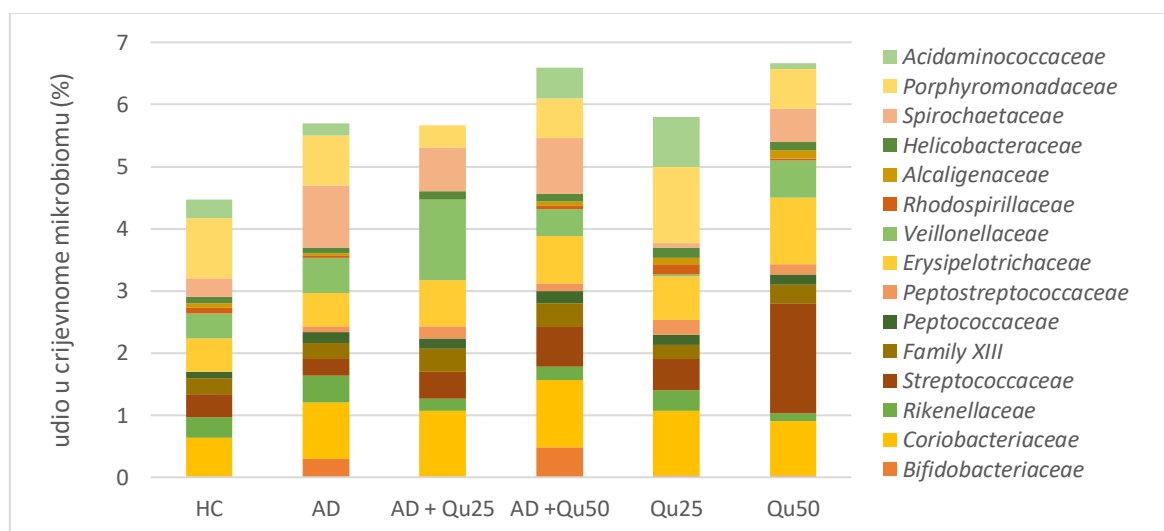


Slika 32. Prikaz porodica koje čine 1-10% crijevne mikrobiote nakon subkronične primjene AlCl₃ + D-gal i Qu. Štakori su raspoređeni u 6 različitih skupina (n=10) podjednake tjelesne mase s razlikom ± 10 g te tijekom 28 dana obrađeni ip s 0,9% NaCl (HC), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze (AD), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 25 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₂₅), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-

galaktoze + 50 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₅₀), 25 mg/kg/tm kvercetina (Qu₂₅) i 50 mg/kg/tm kvercetina (Qu₅₀). Rezultati na **32B-C** su prikazani kao SV ± SP pojedine skupine. [■]Statistički značajne promjene u odnosu na skupinu AD + Qu₅₀ ([■]*P* ≤ 0,05). Kratice: tm – tjelesna masa, ip – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

Uvidom u promjene unutar porodica koje čine 1-10% (**Slika 32A-C**) uočava se osjetljivost (smanjenje zastupljenosti) porodice *Christensenellaceae* (**Slika 32B**) kod skupine AD + Qu₂₅ u odnosu na skupinu AD + Qu₅₀ (*P* = 0,02) te smanjena zastupljenost porodice *Desulfovibrionaceae* (**Slika 32C**) kod skupine Qu₂₅ u odnosu na skupinu AD + Qu₅₀ (*P* = 0,012).

5.4.5. Praćenje učinka subkronične primjene AlCl₃ + D-gal i Qu na porodice čiji udio u kontrolnoj skupini (HC) čini 0,1-1%



Slika 33. Prikaz porodica koje čine 0,1-1% crijevne mikrobiote nakon subkronične primjene AlCl₃ + D-gal i Qu. Štakori su raspoređeni u 6 različitih skupina (n=10) podjednake tjelesne mase s razlikom ± 10 g te tijekom 28 dana obrađeni ip s 0,9% NaCl (HC), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze (AD), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 25 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₂₅), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 50 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₅₀), 25 mg/kg/tm kvercetina (Qu₂₅) i 50 mg/kg/tm kvercetina (Qu₅₀). Identificirane je 15 porodica što upućuje na visoku varijabilnost i osjetljivost cijevne mikrobiote unutar porodica sa najmanjom zastupljenošću. Rezultati su prikazani kao udio (%) pojedine porodice u ukupnom crijevnome mikrobiomu. Statistički značajan porast (*P* ≤ 0,01) kod pojedinih porodica u odnosu na skupinu HC zabilježen je kod: *Bifidobacteriaceae* (AD i AD + Qu₅₀), *Streptococcaceae* (Qu₅₀), *Peptostreptococcaceae* (AD). Porodice *Porphyromonadaceae* i *Acidaminococcaceae* pokazuju manji udio u mikrobiomu (*P* ≤ 0,01) kod skupine AD + Qu₂₅ u odnosu na HC skupinu. Kratice: tm – tjelesna masa, ip – intraperitonealno.

4.2.5. Učinak subkronične primjene AlCl₃ + D-gal i Qu na koncentraciju zonulina (ZON) u crijevnom sadržaju, serumu i tkivu mozga

Tablica 12. Koncentracija zonulina u uzorku crijevnog sadržaja, seruma i homogenata mozga nakon subkronične primjene AlCl₃ + D-gal i Qu

Pokusne ^a skupine	Crijevni sadržaj (ng/mg proteina)	Serum (ng/mg proteina)	Mozak (ng/mg proteina)
HC	0,06 ± 0,00	0,20 ± 0,008	1,11 ± 0,032
AD	0,19 ± 0,008	0,30 ± 0,004	3,36 ± 0,008
AD+Qu ₂₅	0,12 ± 0,008	0,28 ± 0,004	2,06 ± 0,024
AD+Qu ₅₀	0,13 ± 0,004	0,28 ± 0,00	2,05 ± 0,020
Qu ₂₅	0,09 ± 0,00	0,23 ± 0,004	1,51 ± 0,016
Qu ₅₀	0,09 ± 0,008	0,24 ± 0,012	1,89 ± 0,036
Napomena	HC < AD (<i>P</i> < 0,0001)	HC < AD (<i>P</i> = 0,0002)	HC < AD (<i>P</i> < 0,0001)
	HC < AD + Qu ₂₅ (<i>P</i> = 0,009)	HC < AD + Qu ₅₀ (<i>P</i> = 0,00007)	HC < AD + Qu ₂₅ (<i>P</i> = 0,009)
	HC < AD + Qu ₅₀ (<i>P</i> = 0,009)	HC < Qu ₅₀ (<i>P</i> = 0,00014)	AD + Qu ₂₅ < AD (<i>P</i> = 0,009)
	Qu ₂₅ < AD (<i>P</i> = 0,009)	Qu ₂₅ < AD (<i>P</i> = 0,025)	
	Qu ₅₀ < AD (<i>P</i> = 0,009)		

^aŠtakori su raspoređeni u 6 različitih skupina (n=10) podjednake tjelesne mase s razlikom ± 10 g te tijekom 28 dana obrađeni *ip* s 0,9% NaCl (HC), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze (AD), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 25 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₂₅), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 50 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₅₀), 25 mg/kg/tm kvercetina (Qu₂₅) i 50 mg/kg/tm kvercetina (Qu₅₀). Rezultati su prikazani kao SV ± SP pojedine skupine sa statistički značajnim promjenama između skupina. Kratice: tm – tjelesna masa, *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

Rezultati koncentracije zonulina (**Tablica 12**) u uzorku crijevnog sadržaja, seruma i homogenata mozga su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška (SV \pm SP) te izražene kao ng/mg proteina u analiziranom uzorku.

Rezultati analize koncentracije zonulina u uzorku crijevnog sadržaja (**Tablica 12**) upućuju na poremećaj homeostaze u ovisnosti o obradi. Statistički značajne razlike, odnosno povišene koncentracije zonulina u odnosu na kontrolnu skupinu HC zabilježene su kod skupine AD ($P < 0,0001$) te skupine AD + Qu₂₅ i AD + Qu₅₀ ($P = 0,009$). Također je zabilježena i statistički značajno povišena vrijednost zonulina kod skupine AD u odnosu na skupinu Qu₂₅ i Qu₅₀ ($P = 0,009$).

Analizom rezultata koncentracije zonulina u uzorku seruma (**Tablica 12**) dobivene su više vrijednosti u odnosu na vrijednosti zonulina u crijevnom sadržaju. Statistički značajne razlike, odnosno povišene koncentracije zonulina u odnosu na kontrolnu HC skupinu u uzorku seruma zapažene su kod skupine AD ($P = 0,0002$), AD + Qu₅₀ ($P = 0,00007$) i Qu₅₀ ($P = 0,00014$). Statistički značajno povišena vrijednost zonulina vidljiva je i kod skupine AD ($P = 0,025$) u odnosu na skupinu Qu₂₅.

Vrijednosti zonulina u uzorku homogenata mozga (**Tablica 12**) su i do 10 puta više usporedno s vrijednostima dobivenim u uzorku crijevnog sadržaj i seruma kod istih skupina. Statistički značajno povišene vrijednosti zonulina u odnosu na kontrolnu HC skupinu vidljive su kod skupine AD ($P < 0,0001$) i AD + Qu₂₅ ($P = 0,009$) te kod skupine AD ($P = 0,009$) u odnosu na skupinu AD + Qu₂₅.

4.3. Praćenje učinka subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na rezultate analize esencijalnih i toksičnih elemenata u serumu i tkivu mozga metodom induktivno spregnute plazme s masenom spektrometrijom (ICP-MS)

Rezultati u **Tablici 13** su prikazani kao srednja vrijednost \pm pogreška ($SV \pm SP$). Rezultati Al (ppm) u uzorku seruma/tkiva mozga upućuju na poremećaj homeostaze u ovisnosti o obradi. U serumu su zapažene značajno više vrijednosti kod ispitne skupine AD ($P = 0,00014$), AD + Qu₂₅ ($P = 0,0095$) i AD + Qu₅₀ ($P = 0,0026$) u odnosu na HC. U uzorku tkiva mozga vrijednosti Al su značajno više kod ispitne skupine AD ($P = 0,00008$) i AD + Qu₅₀ ($P = 0,004$) u odnosu na HC.

Rezultati Ca (ppm) u uzorku seruma/tkiva mozga (**Tablica 13**) upućuju na poremećaj homeostaze u ovisnosti o obradi. U serumu su vidljive znatno više vrijednosti kod ispitne skupine Qu₂₅ ($P = 0,027$) u odnosu na HC te kod skupine Qu₂₅ u odnosu na AD + Qu₂₅ ($P = 0,02$) i AD + Qu₅₀ ($P = 0,045$). U uzorku tkiva mozga vrijednosti Ca su znatno više kod ispitne skupine AD u odnosu na skupinu HC ($P = 0,0002$) i Qu₂₅ ($P = 0,0006$) te kod skupine AD + Qu₅₀ u odnosu na skupinu HC ($P = 0,014$) i Qu₂₅ ($P = 0,02$).

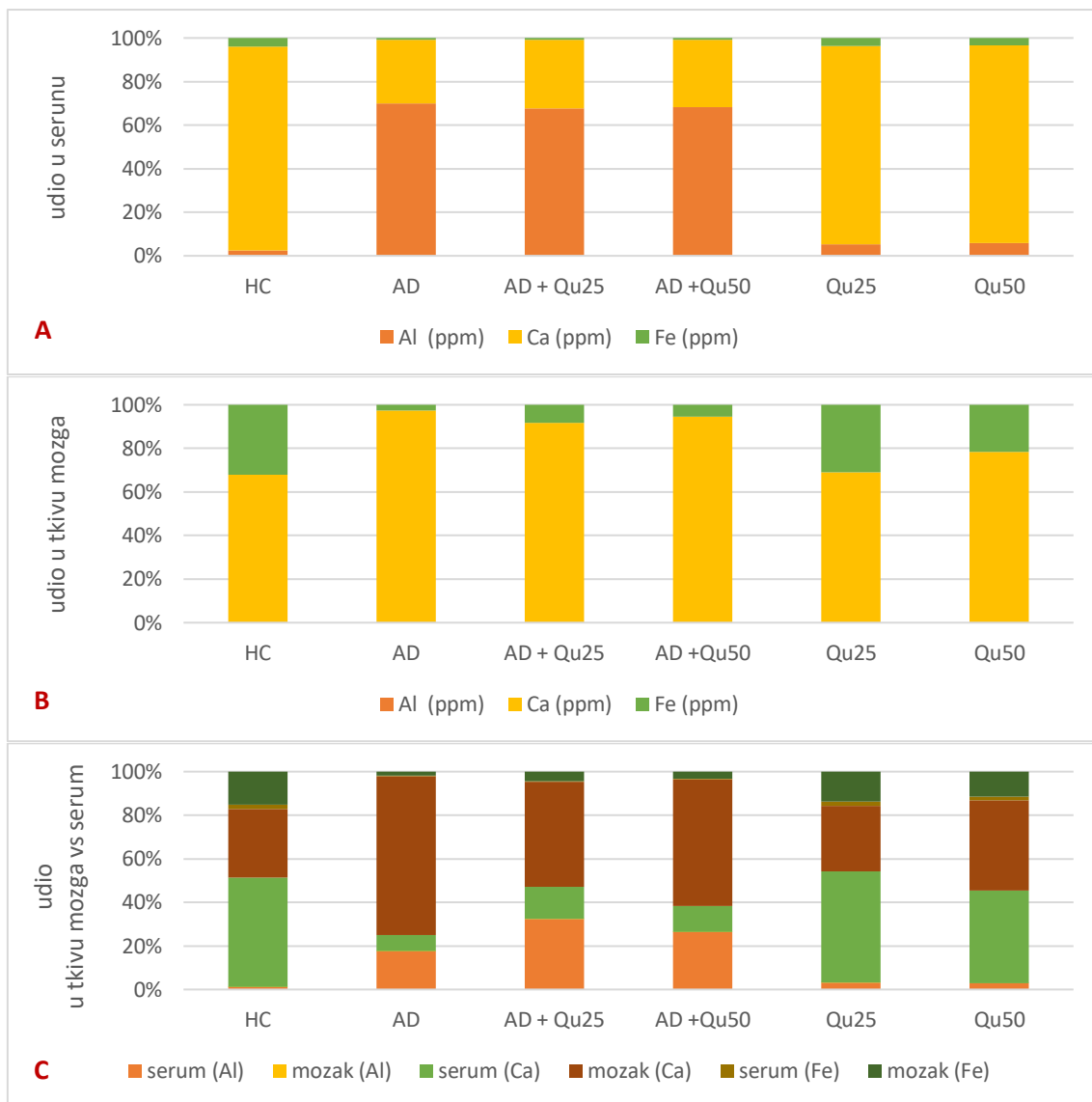
Rezultati Fe (ppm) u uzorku seruma/tkiva mozga (**Tablica 13**) upućuju na poremećaj homeostaze u ovisnosti o obradi. U serumu su vidljive znatno niže vrijednosti kod skupine AD + Qu₂₅ u odnosu na HC ($P = 0,031$) i Qu₂₅ ($P = 0,038$) te kod AD + Qu₅₀ u odnosu na HC ($P = 0,021$), Qu₂₅ ($P = 0,027$) i Qu₅₀ ($P = 0,045$) ispitnu skupinu. U uzorku tkiva mozga vrijednosti Fe su znatno niže kod AD u odnosu na HC ($P = 0,014$) ispitnu skupinu.

Rezultati usporednih odnosa udjela pojedenim elemenat u serumu i tkivu mozga pokazuju ovisnost o provedenoj obradi i lokaciji (**Slika 34C**). U ispitnim skupinama AD, AD + Qu₂₅ i AD + Qu₅₀ vrijednosti Al u tkivu mozga su statistički značajno manja u odnosu na vrijednosti Al u serumu ($P \leq 0,001$). Vrijednosti Ca u tkivu mozga kod skupine HC, Qu₂₅ i Qu₅₀ su statistički značajno više u odnosu na skupine AD, AD + Qu₂₅ i AD + Qu₅₀ ($P \leq 0,01$). Vrijednosti Fe su statistički značajno niže u serumu nego u uzorku tkiva mozga kod svih ispitnih skupina ($P \leq 0,05$).

Tablica 13. Rezultati analize esencijalnih i toksičnih elemenata u uzorku seruma i tkivu mozga nakon subkronične primjene AlCl₃ + D-gal i Qu^a

Serum	HC	AD	AD + Qu ₂₅	AD + Qu ₅₀	Qu ₂₅	Qu ₅₀	Napomena
Al (ppm)	2,10 ± 0,28	204,2 ± 9,26	177,5 ± 3,1	184,4 ± 4,90	5,2 ± 0,08	5,6 ± 0,20	HC < AD (<i>P</i> = 0,00014) HC < AD + Qu ₂₅ (<i>P</i> = 0,0095) HC < AD + Qu ₅₀ (<i>P</i> = 0,0026)
Ca (ppm)	81,80 ± 1,02	85,3 ± 0,24	82,4 ± 0,28	84,4 ± 0,81	86,9 ± 0,16	86,8 ± 0,85	HC < Qu ₂₅ (<i>P</i> = 0,027) AD + Qu ₂₅ < Qu ₂₅ (<i>P</i> = 0,02) AD + Qu ₅₀ < Qu ₂₅ (<i>P</i> = 0,045)
Fe (ppm)	3,40 ± 0,12	2,80 ± 0,04	2,00 ± 0,08	1,90 ± 0,12	3,5 ± 0,16	3,30 ± 0,20	AD + Qu ₂₅ < HC (<i>P</i> = 0,031) AD + Qu ₂₅ < Qu ₂₅ (<i>P</i> = 0,038) AD + Qu ₅₀ < HC (<i>P</i> = 0,021) AD + Qu ₅₀ < Qu ₂₅ (<i>P</i> = 0,027) AD + Qu ₅₀ < Qu ₅₀ (<i>P</i> = 0,045)
Tkivo mozga	HC	AD	AD + Qu ₂₅	AD + Qu ₅₀	Qu ₂₅	Qu ₅₀	NAPOMENA
Al (ppm)	0,07 ± 0,004	0,24 ± 0,016	0,14 ± 0,008	0,19 ± 0,008	0,08 ± 0,004	0,07 ± 0,004	HC < AD (<i>P</i> = 0,00008) HC < AD + Qu ₅₀ (<i>P</i> = 0,004)
Ca (ppm)	51,83 ± 2,12	841,84 ± 5,65	264,97 ± 5,70	406,67 ± 3,78	51,18 ± 2,38	84,3 ± 4,40	HC < AD (<i>P</i> = 0,0002) HC < AD + Qu ₅₀ (<i>P</i> = 0,014) Qu ₂₅ < AD (<i>P</i> = 0,0006) Qu ₂₅ < AD + Qu ₅₀ (<i>P</i> = 0,02)
Fe (ppm)	24,65 ± 0,50	22,1 ± 0,37	23,55 ± 0,38	23,25 ± 0,46	23,15 ± 0,23	23,41 ± 0,01	AD < HC (<i>P</i> = 0,014)

^aŠtakori su raspoređeni u 6 različitih skupina (n=10) podjednake tjelesne mase s razlikom ± 10 g te tijekom 28 dana obrađeni *ip* s 0,9% NaCl (HC), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze (AD), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 25 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₂₅), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 50 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₅₀), 25 mg/kg/tm kvercetina (Qu₂₅) i 50 mg/kg/tm kvercetina (Qu₅₀). Rezultati su prikazani kao SV ± SP pojedine skupine sa statistički značajnim promjenama između skupina. Kratice: tm – tjelesna masa, *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.



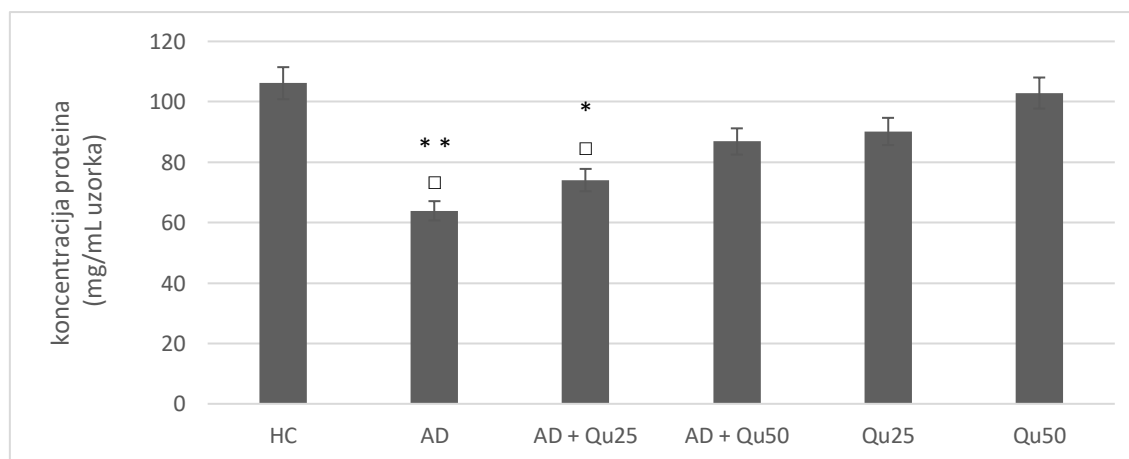
Slika 34. Odnos udjela aluminija (Al), kalcija (Ca) i željeza (Fe) u uzorku seruma (A) i tkivu mozga (B) te serum vs mozak (C) nakon subkronične primjene AlCl_3 + D-gal i Qu. Štakori su raspoređeni u 6 različitih skupina ($n=10$) podjednake tjelesne mase s razlikom ± 10 g te tijekom 28 dana obrađeni *ip* s 0,9% NaCl (HC), 10 mg/kg/tm AlCl_3 + 60 mg/kg/tm D-galaktoze (AD), 10 mg/kg/tm AlCl_3 + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 25 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₂₅), 10 mg/kg/tm AlCl_3 + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 50 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₅₀), 25 mg/kg/tm kvercetina (Qu₂₅) i 50 mg/kg/tm kvercetina (Qu₅₀). U ispitnim skupinama AD, AD + Qu₂₅ i AD + Qu₅₀ vrijednosti Al u tkivu mozga su statistički značajno manja u odnosu na vrijednosti Al u serumu ($P \leq 0,001$). Vrijednosti Ca u tkivu mozga kod skupine HC, Qu₂₅ i Qu₅₀ su statistički značajno više u odnosu na skupine AD, AD + Qu₂₅ i AD + Qu₅₀ ($P \leq 0,01$). Vrijednosti Fe su statistički značajno niže u serumu nego u uzorku tkiva mozga kod svih ispitnih skupina ($P \leq 0,05$). Kratice: tm – tjelesna masa, *ip* – intraperitonealno.

4.4. Praćenje učinka subkronične primjene AlCl_3 + D-gal i Qu na parametara oksidacijskog stresa i antioksidacijske zaštite u tkivu mozga

Učinka subkronične primjene AlCl_3 + D-gal i Qu na parametre oksidacijskog stresa učinjen je kroz određivanje koncentracije ukupnih proteina, karboniliranih proteina (PC) i malondialdehida (MDA) te procjenom antioksidacijske zaštite kroz praćenje aktivnosti katalaze (CAT), aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) i koncentraciju ukupnog glutationa (GSH).

4.4.1. Učinak subkronične primjene AlCl_3 + D-gal i Qu na koncentraciju ukupnih proteina u tkivu mozga

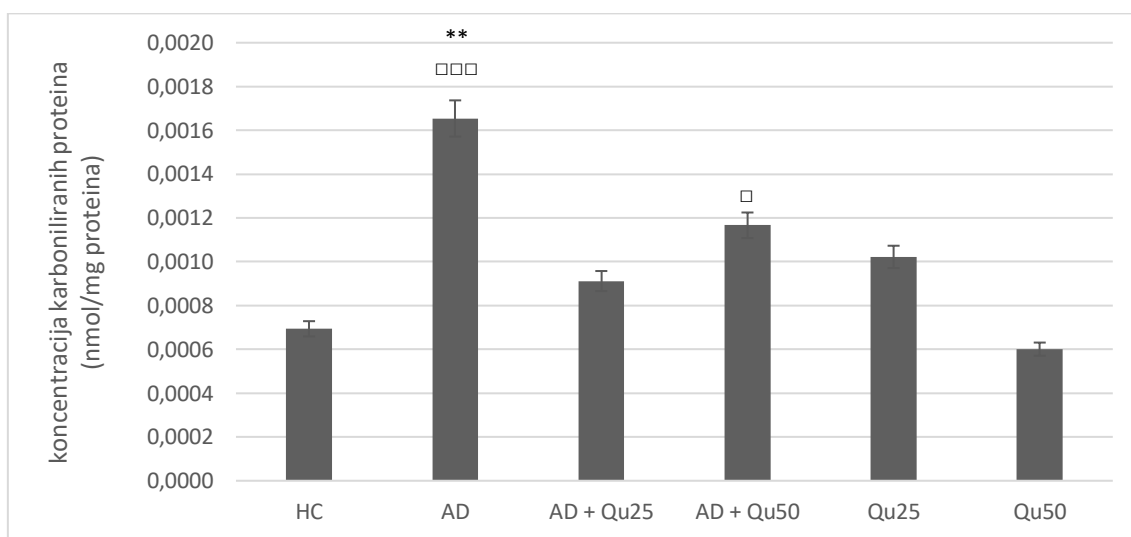
Rezultati analize ukupne koncentracije proteina u uzorku tkiva mozga (Slika 35) ukazuju na smanjenje koncentracije proteina unutar svih obrađenih skupina u odnosu na skupinu HC sa statistički značajnim odstupanjima zabilježenim kod skupine AD ($P = 0,0016$) i AD + Qu₂₅ ($P = 0,02$). Statistički značajno niže vrijednost proteina zabilježenu su i kod skupine AD ($P = 0,04$) i AD + Qu₂₅ ($P = 0,018$) u odnosu na Qu₅₀.



Slika 35. Koncentracija proteina u homogenatima tkiva mozga nakon subkronične primjene AlCl_3 + D-gal i Qu. Štakori su raspoređeni u 6 različitih skupina ($n=10$) podjednake tjelesne mase s razlikom ± 10 g te tijekom 28 dana obrađeni *ip* s 0,9% NaCl (HC), 10 mg/kg/tm AlCl_3 + 60 mg/kg/tm D-galaktoze (AD), 10 mg/kg/tm AlCl_3 + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 25 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₂₅), 10 mg/kg/tm AlCl_3 + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 50 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₅₀), 25 mg/kg/tm kvercetina (Qu₂₅) i 50 mg/kg/tm kvercetina (Qu₅₀). Rezultati su prikazani kao SV \pm SP pojedine skupine. *Statistički značajne promjene u odnosu na skupinu HC ($^*P \leq 0,05$; $^{**}P \leq 0,01$). □Statistički značajne promjene u odnosu na skupinu Qu₅₀ ($^{\square}P \leq 0,05$). Kratice: tm – tjelesna masa, *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

4.4.2. Učinak subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na koncentraciju karboniliranih proteina (PC) u tkivu mozga

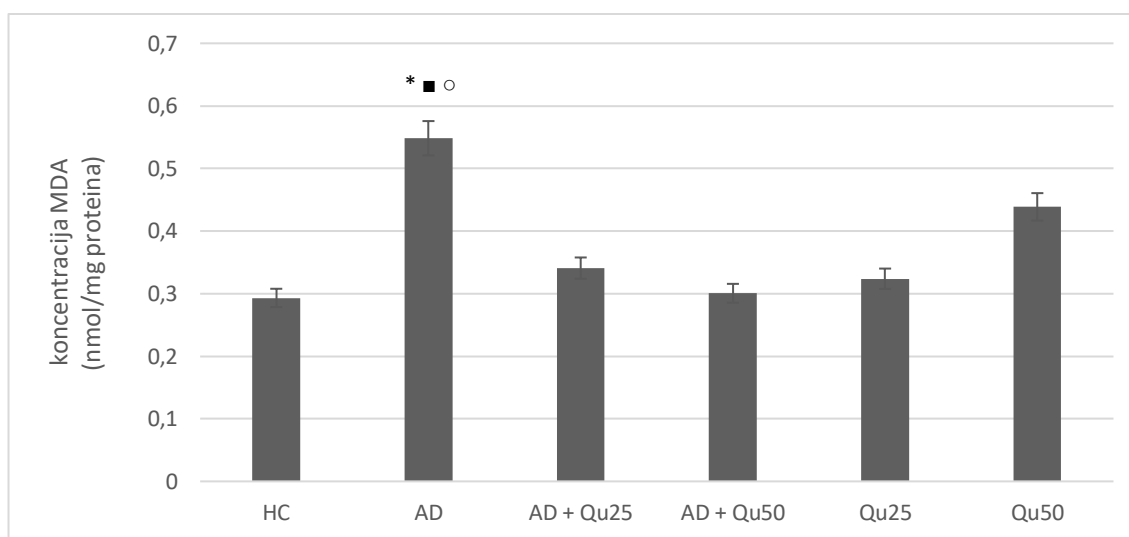
Za utvrđivanje količine oštećenja proteina određen je sadržaj karbonilnih skupina u proteinskom uzorku (**Slika 36**). Statistički značajno povišena koncentracija PC zabilježena je kod skupine AD u odnosu na skupinu HC ($P = 0,003$) i Qu₅₀ ($P = 0,0003$) te kod skupine AD + Qu₅₀ u odnosu na skupinu Qu₅₀ ($P = 0,03$).



Slika 36. Koncentracija karboniliranih proteina homogenatima tkiva mozga nakon subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu. Štakori su raspoređeni u 6 različitih skupina ($n=10$) podjednake tjelesne mase s razlikom ± 10 g te tijekom 28 dana obrađeni *ip* s 0,9% NaCl (HC), 10 mg/kg/tm $AlCl_3$ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze (AD), 10 mg/kg/tm $AlCl_3$ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 25 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₂₅), 10 mg/kg/tm $AlCl_3$ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 50 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₅₀), 25 mg/kg/tm kvercetina (Qu₂₅) i 50 mg/kg/tm kvercetina (Qu₅₀). Rezultati su prikazani kao SV \pm SP pojedine skupine. *Statistički značajne promjene u odnosu na skupinu HC (** $P \leq 0,001$). □ Statistički značajne promjene u odnosu na skupinu Qu₅₀ (□ $P \leq 0,05$; □□ $P \leq 0,001$). Kratice: tm – tjelesna masa, *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

4.4.3. Učinak subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na lipidnu peroksidaciju (malondialdehid, MDA) u tkivu mozga

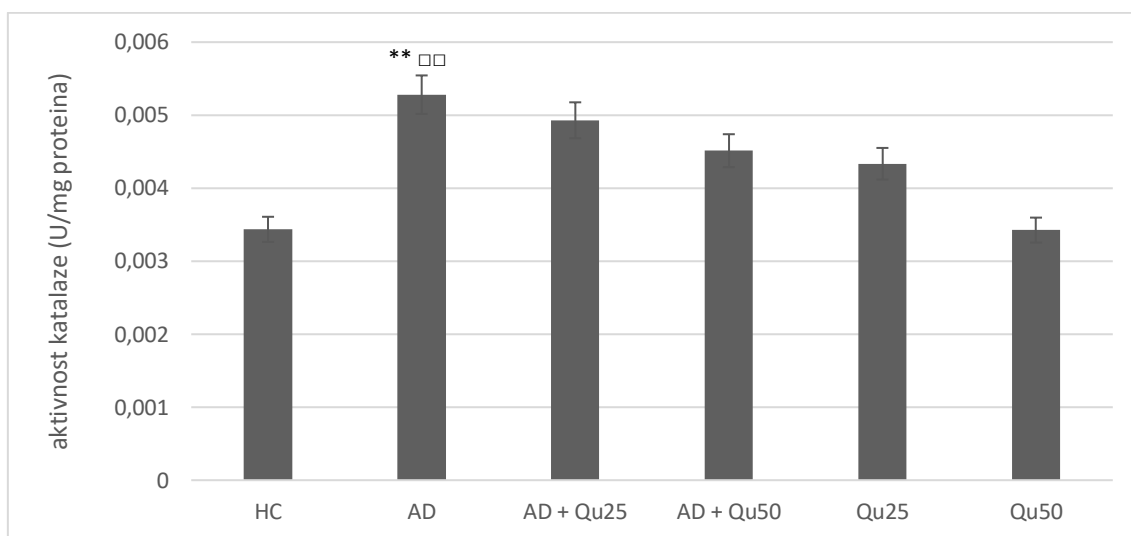
Oštećenje lipida utvrđeno je mjerenjem količine malondialdehida (MDA). Analizom koncentracije MDA u homogenatu tkiva mozga (Slika 37) zabilježena je statistički značajno povišena vrijednost kod skupine AD u odnosu na HC ($P = 0,03$) i AD + Qu₅₀ skupinu ($P = 0,02$) te u odnosu na skupinu Qu₂₅ ($P = 0,03$).



Slika 37. Koncentracija malondialdehida (MDA) u homogenatima tkiva mozga nakon subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu. Štakori su raspoređeni u 6 različitih skupina ($n=10$) podjednake tjelesne mase s razlikom ± 10 g te tijekom 28 dana obradeni *ip* s 0,9% NaCl (HC), 10 mg/kg/tm $AlCl_3$ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze (AD), 10 mg/kg/tm $AlCl_3$ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 25 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₂₅), 10 mg/kg/tm $AlCl_3$ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 50 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₅₀), 25 mg/kg/tm kvercetina (Qu₂₅) i 50 mg/kg/tm kvercetina (Qu₅₀). Rezultati su prikazani kao SV \pm SP pojedine skupine. *Statistički značajne promjene u odnosu na skupinu HC ($*P \leq 0,05$). ■ Statistički značajne promjene u odnosu na skupinu AD + Qu₅₀ ($■P \leq 0,05$). ° Statistički značajne promjene u odnosu na skupinu Qu₂₅ ($°P \leq 0,05$). Kratice: tm – tjelesna masa, *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

4.4.4. Učinak subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na enzimatsku aktivnost katalaze (CAT) u tkivu mozga

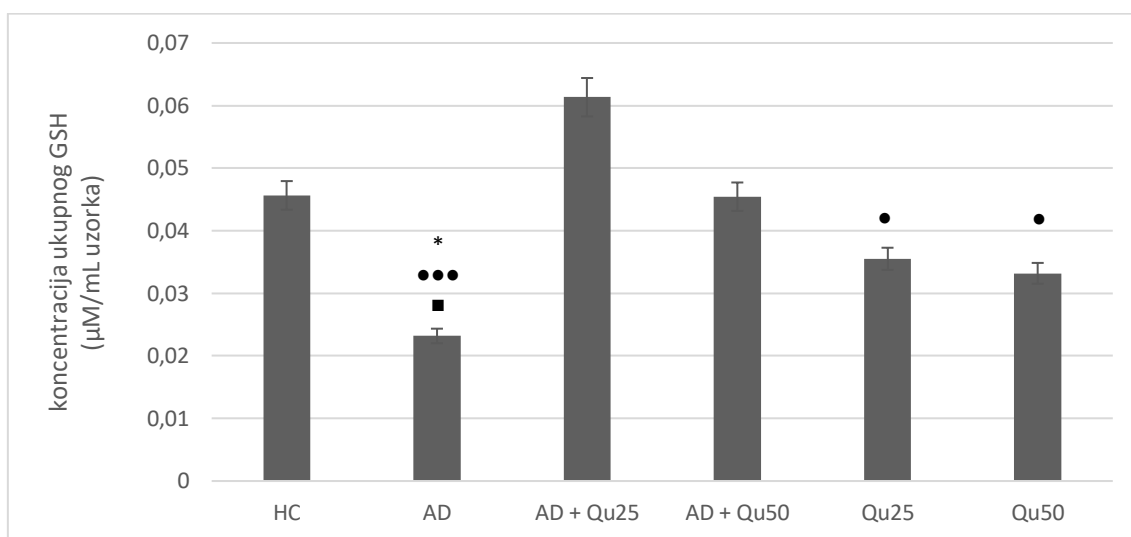
Analizom rezultata mjerenja enzimске aktivnosti CAT (Slika 38) utvrđena je povišena antioksidacijska aktivnost katalaze kod skupine AD u odnosu na skupinu HC ($P = 0,007$) i Qu₅₀ ($P = 0,008$).



Slika 38. Enzimaska aktivnost katalaze (CAT) u homogenatima tkiva mozga nakon subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu. Štakori su raspoređeni u 6 različitih skupina ($n=10$) podjednake tjelesne mase s razlikom ± 10 g te tijekom 28 dana obrađeni *ip* s 0,9% NaCl (HC), 10 mg/kg/tm $AlCl_3$ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze (AD), 10 mg/kg/tm $AlCl_3$ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 25 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₂₅), 10 mg/kg/tm $AlCl_3$ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 50 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₅₀), 25 mg/kg/tm kvercetina (Qu₂₅) i 50 mg/kg/tm kvercetina (Qu₅₀). Rezultati su prikazani kao SV \pm SP pojedine skupine. *Statistički značajne promjene u odnosu na skupinu HC (** $P \leq 0,01$). □Statistički značajne promjene u odnosu na skupinu Qu₅₀ (□ $P \leq 0,01$). Kratice: tm – tjelesna masa, *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

4.4.5. Učinak subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na ukupni glutation u tkivu mozga

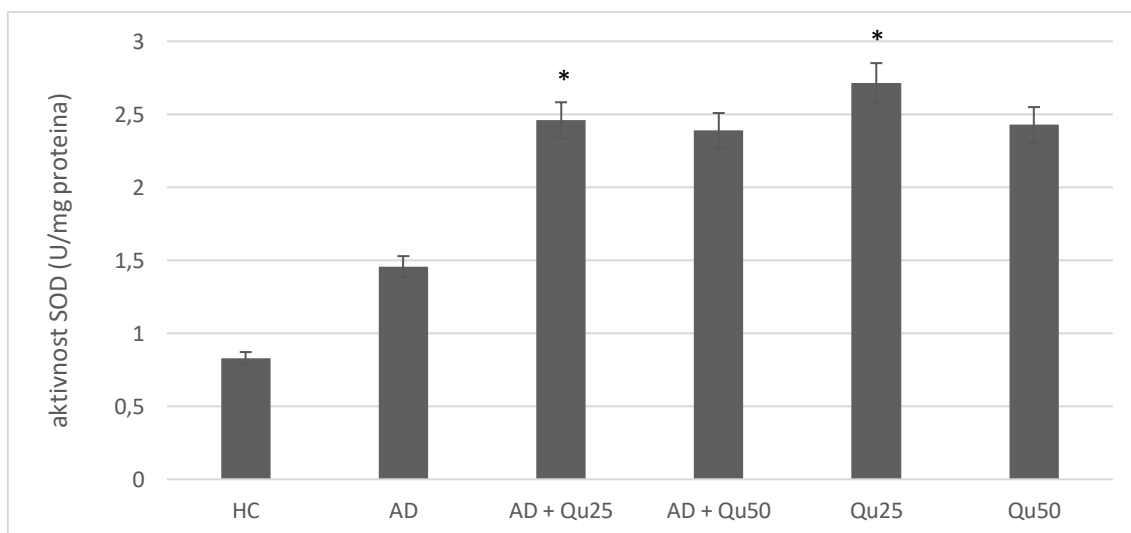
Analizom rezultata koncentracije ukupnog glutationa (GSH) u uzorku homogenata tkiva mozga (Slika 39) zabilježena je statistički značajno manja koncentracija kod skupine AD u odnosu na skupinu HC i AD + Qu₅₀ ($P = 0,03$) te skupinu AD + Qu₂₅ ($P = 0,0001$). Statistički niža vrijednost zabilježena je i kod skupine Qu₂₅ i Qu₅₀ u odnosu na skupinu AD + Qu₂₅ ($P = 0,03$).



Slika 39. Koncentracija ukupnog glutationa (GSH) u homogenatima tkiva mozg nakon subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu. Štakori su raspoređeni u 6 različitih skupina ($n=10$) podjednake tjelesne mase s razlikom ± 10 g te tijekom 28 dana obrađeni *ip* s 0,9% NaCl (HC), 10 mg/kg/tm $AlCl_3$ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze (AD), 10 mg/kg/tm $AlCl_3$ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 25 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₂₅), 10 mg/kg/tm $AlCl_3$ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 50 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₅₀), 25 mg/kg/tm kvercetina (Qu₂₅) i 50 mg/kg/tm kvercetina (Qu₅₀). Rezultati su prikazani kao SV \pm SP pojedine skupine.. *Statistički značajne promjene u odnosu na skupinu HC ($*P \leq 0,05$). •Statistički značajne promjene u odnosu na skupinu AD + Qu₂₅ ($*P \leq 0,05$; $***P \leq 0,001$). ■Statistički značajne promjene u odnosu na skupinu AD + Qu₅₀ ($■P \leq 0,05$). Kratice: tm – tjelesna masa, *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

4.4.6. Učinak subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na enzimatsku aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u tkivu mozga

Analizom rezultata enzimске aktivnosti SOD (Slika 40) uočava se statistički značajno povišena aktivnost kod skupina AD + Qu₂₅ ($P = 0,03$) i Qu₂₅ ($P = 0,016$) u odnosu na skupinu HC.



Slika 40. Enzimaska aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u homogenatima tkiva mozga nakon subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu. Štakori su raspoređeni u 6 različitih skupina ($n=10$) podjednake tjelesne mase s razlikom ± 10 g te tijekom 28 dana obrađeni *ip* s 0,9% NaCl (HC), 10 mg/kg/tm $AlCl_3$ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze (AD), 10 mg/kg/tm $AlCl_3$ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 25 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₂₅), 10 mg/kg/tm $AlCl_3$ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 50 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₅₀), 25 mg/kg/tm kvercetina (Qu₂₅) i 50 mg/kg/tm kvercetina (Qu₅₀). Rezultati su prikazani kao SV \pm SP pojedine skupine. *Statistički značajne promjene u odnosu na skupinu HC ($*P \leq 0,05$). Kratice: tm – tjelesna masa, *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

4.5. *Praćenje učinka subkronične primjene AlCl₃ + D-gal i Qu na nastanak neuropatologije*

Procjena učinka subkronične primjene AlCl₃ + D-gal i Qu učinjena je kroz neurohistopatološke analize te procjenu koncentracije moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF-a) i aktivnost acetilkolinesteraze (AChE).

4.5.1. *Neurohistopatološke promjene*

Neurodegenerativne promjene utvrđene su analizom histoloških preparata nakon bojanja modificiranom metodom po Bielschowskom (bojanje srebrom) i imunohistokemijskog označavanja biljezima 4G8, AT8, PHF1, MC1, Iba1, CD68 i HLA-DR. Pozitivan signal je uočen kod 4G8 i Iba1, ostalo je bilo negativno ili prisutan signal bio izrazito slab. Kao pozitivna kontrola za imunohistokemijske biljege korišteni su prerezi moždanog tkiva bolesnika s uznapredovalim AD-om koji su pokazali pozitivan signal na bojanje pomoću korištenih protutijela. Kao negativna kontrola korišteni su prerezi AD skupine uz izostanak označavanja primarnim protutijelom (4G8, AT8, PHF1, MC1, Iba1, CD68 i HLA-DR).

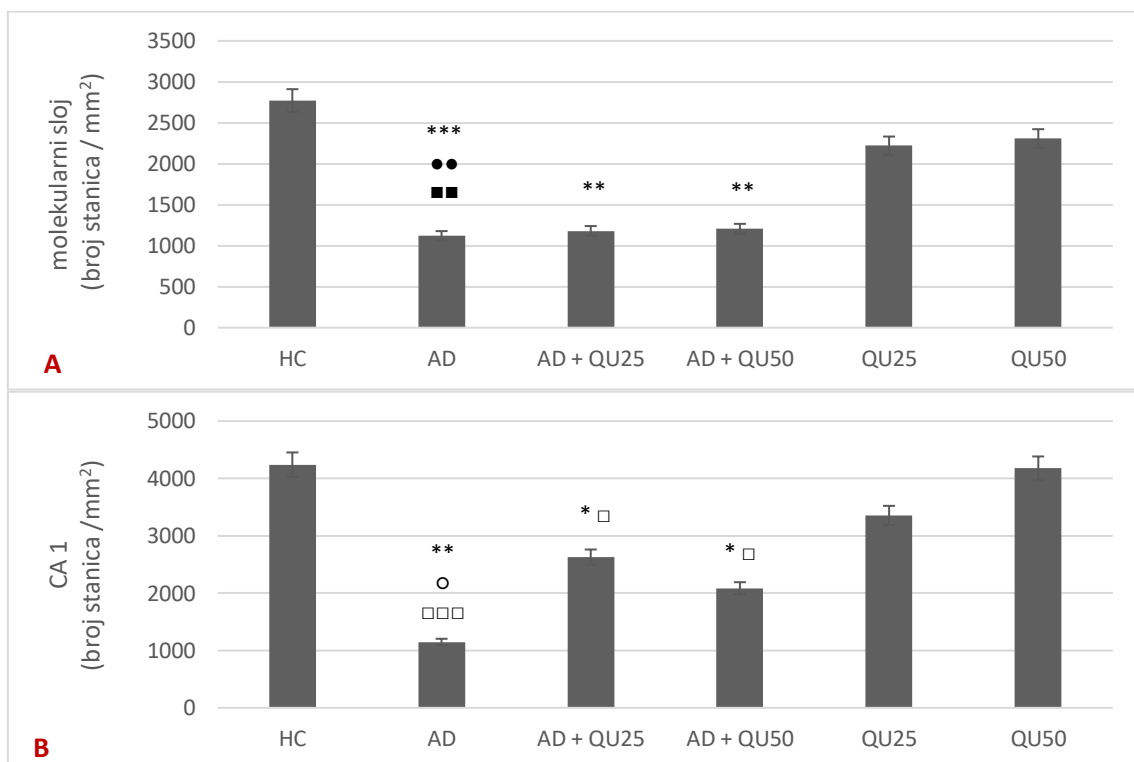
4.5.1.1. *Učinak subkronične primjene AlCl₃ + D-gal i Qu na neurohistopatološke promjene utvrđene bojanjem modificiranom metodom po Bielschowskom*

Mikroskopskom analizom preparata nakon bojanja srebrom (**Slika 42**) vidljive su promjene u molekularnom i vanjskom granularnom sloju kore velikoga mozga te u hipokampalnoj formaciji (CA1) kod obrađenih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu HC. Kvantifikacijom mikroskopskih snimaka zapažene su statistički značajne promjene u broju stanica u molekularnom sloju kore velikog mozga izmjerene u referentnom prostoru koji je bio ograničen moždanim ovojnica s jedne strane i vanjskog granularnog sloja s druge strane (**Slika 42**).

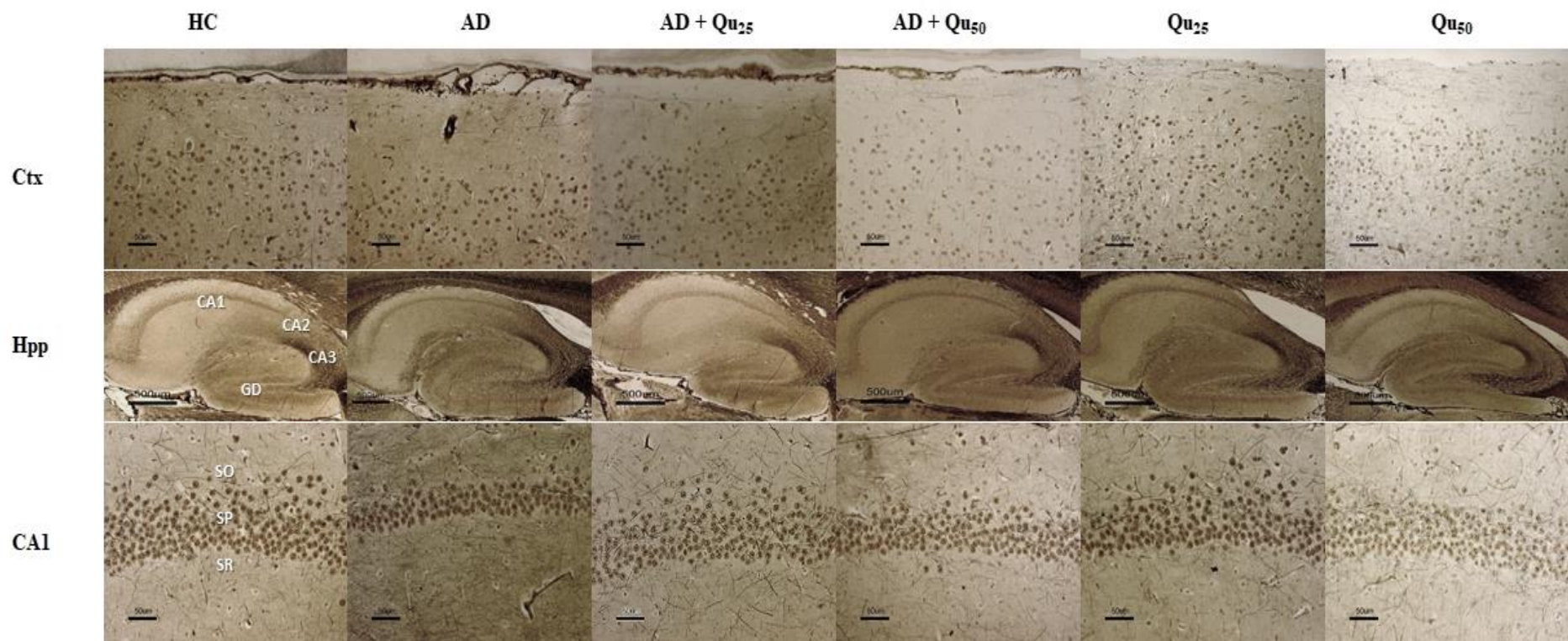
Statistički značajan gubitak stanica u molekularnom sloju kore velikoga (**Slika 41A**) vidljiv je kod skupine AD u odnosu na skupinu HC ($P = 0,00007$) te AD + Qu₂₅ i AD + Qu₅₀ ($P = 0,009$).

U odnosu na HC skupinu i dalje postoji statistički značajan gubitak stanica kod skupina AD + Qu₂₅ ($P = 0,007$) i AD + Qu₅₀ ($P = 0,009$).

Statistički značajne promjene u vidu smanjenog broja stanica vidljive su i području hipokampalne formacije CA1 (Slika 41B). Statistički značajno smanjenje broja stanica dobiveno je kod skupine AD u odnosu na skupine HC ($P = 0,0012$), Qu₂₅ ($P = 0,046$) i Qu₅₀ ($P = 0,000012$) te kod skupina AD + Qu₂₅ i AD + Qu₅₀ u odnosu na skupine HC i Qu₅₀ ($P = 0,046$).



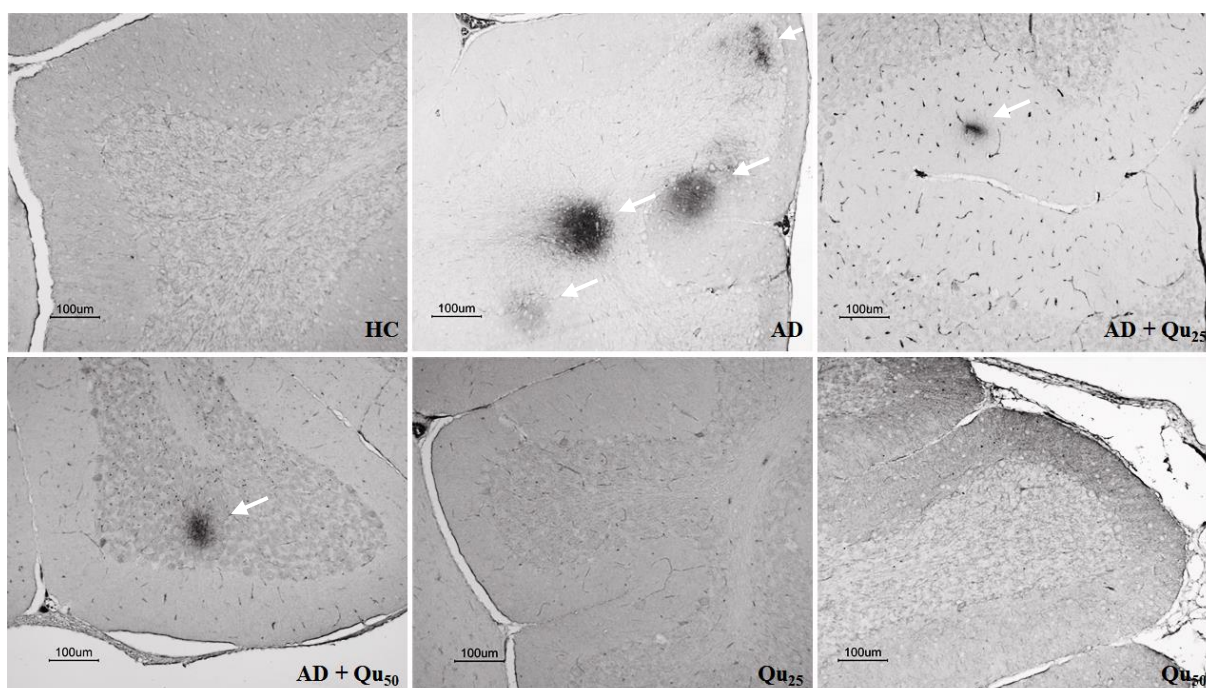
Slika 41. Broj stanica zabilježen u molekularnom sloju kore velikoga mozga i hipokampalnoj formaciji CA1 nakon subkronične primjene AlCl₃ + D-gal i Qu. Štakori su raspoređeni u 6 različitih skupina (n=10) podjednake tjelesne mase s razlikom ± 10 g te tijekom 28 dana obrađeni *ip* s 0,9% NaCl (HC), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze (AD), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 25 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₂₅), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 50 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₅₀), 25 mg/kg/tm kvercetina (Qu₂₅) i 50 mg/kg/tm kvercetina (Qu₅₀). Rezultati su prikazani kao SV ± SP pojedine skupine. *Statistički značajne promjene u odnosu na skupinu HC (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$). •Statistički značajne promjene u odnosu na skupinu AD + Qu₂₅ (** $P \leq 0,01$). ■Statistički značajne promjene u odnosu na skupinu AD + Qu₅₀ (■ $P \leq 0,01$). °Statistički značajne promjene u odnosu na skupinu Qu₂₅ (° $P \leq 0,05$). □Statistički značajne promjene u odnosu na skupinu Qu₅₀ (□ $P \leq 0,05$; □□ $P \leq 0,001$). Kratice: tm – tjelesna masa, *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.



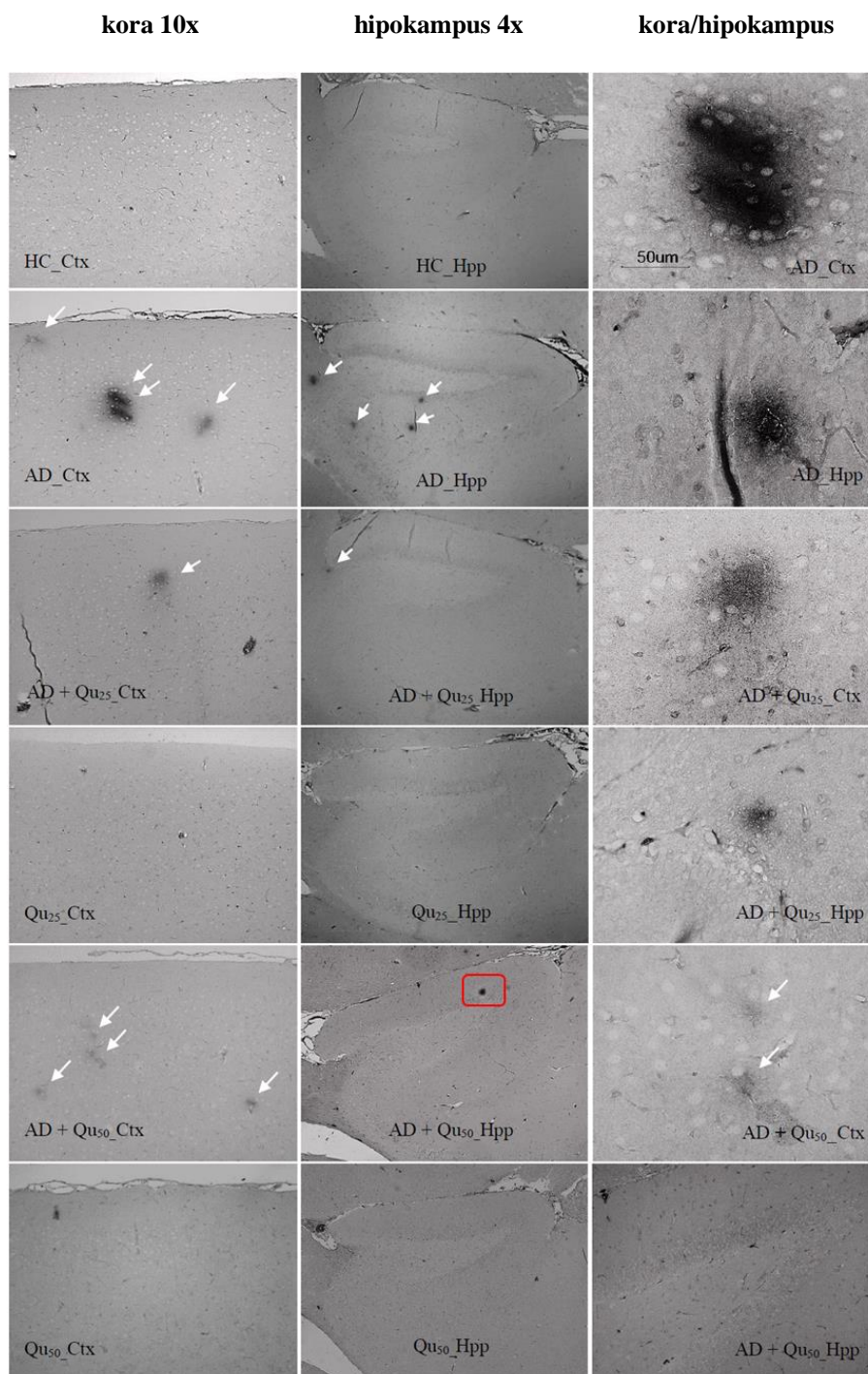
Slika 42. Prikaz bojanja srebrom kore (Ctx), hipokampusa (Hpp) i hipokampalne formacije CA1 kod reprezentativnih prereza skupine HC, AD, AD + Qu₂₅, AD + Qu₅₀, Qu₂₅ i Qu₅₀. Štakori su raspoređeni u 6 različitih skupina (n=10) podjednake tjelesne mase s razlikom ± 10 g te tijekom 28 dana obrađeni *ip* s 0,9% NaCl (HC), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze (AD), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 25 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₂₅), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 50 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₅₀), 25 mg/kg/tm kvercetina (Qu₂₅) i 50 mg/kg/tm kvercetina (Qu₅₀). Hipokampalna formacija: GD – nazubljena vijuga (lat. *gyrus dentatus*) i Amonov rog (CA1-CA3, lat. *cornu ammonis*). Slojevi CA1 regije: SO – lat. *stratum oriens*, SP- lat. *stratum Pyramidale* i SR – lat. *stratum radiatum*. Mjerilo na stvarnom povećanju objektiva 20x (Ctx i CA1) je 50 μ m i na povećanju objektiva 2x (Hpp) je 500 μ m. Kratice: tm – tjelesna masa, *ip* – intraperitonealno.

4.5.1.2. Praćenje učinka subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na izraženost biljega 4G8

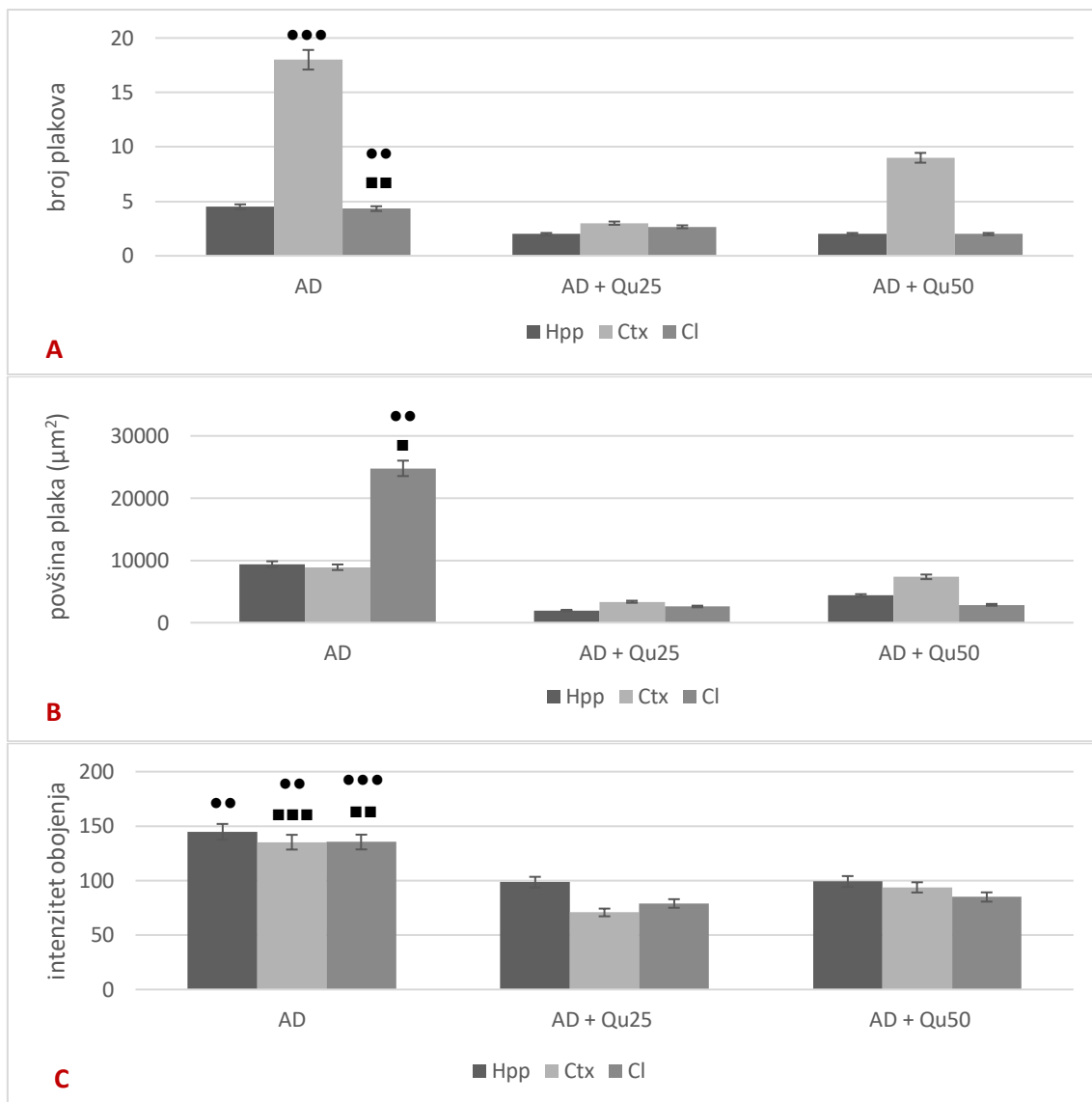
Imunohistokemijskim bojanjem analizirana je izraženost biljega anti amiloid beta ($A\beta$), klon 4G8. Protutijelo se veže na aminokiselinske ostatke 17-24 $A\beta$ -peptida prepoznavajući epitop koji leži unutar aminokiselina 18-22 $A\beta$. 4G8 amiloidno protutijelo prepoznaje pogrešno obrađene izoforme i prekusorske oblike $A\beta$ peptida. Imunohistokemijskim bojanjem analizirana je izraženost biljega 4G8 (Slika 43 i 44) u području maloga mozga (lat. *cerebellum*, Cl), kore velikog mozga (lat. *cortex*, Ctx) i hipokampalne formacije (lat. *hippocampus*, Hpp). Prosječna izraženost biljega je veća u području kore velikoga mozga u odnosu na hipokampus te je prisutna kod sve tri skupine obrađene $AlCl_3$ i D-gal (AD, AD + Qu₂₅ i AD + Qu₅₀). U kontrolnim uzorcima (HC) i uzorcima tretiranim samo kvercetinom (Qu₂₅ i Qu₅₀) izraženost biljega nije zabilježena.



Slika 43. Izraženost biljega 4G8 u području maloga mozga kod reprezentativnih prereza skupine HC, AD, AD + Qu₂₅, AD + Qu₅₀, Qu₂₅ i Qu₅₀. Štakori su raspoređeni u 6 različitih skupina (n=10) podjednake tjelesne mase s razlikom ± 10 g te tijekom 28 dana obrađeni *ip* s 0,9% NaCl (HC), 10 mg/kg/tm $AlCl_3$ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze (AD), 10 mg/kg/tm $AlCl_3$ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 25 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₂₅), 10 mg/kg/tm $AlCl_3$ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 50 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₅₀), 25 mg/kg/tm kvercetina (Qu₂₅) i 50 mg/kg/tm kvercetina (Qu₅₀). Mjerilo na stvarnom povećanju objektiva 10x je 100 μ m, pozitivan signal označen bijelom strelicom. Kratice: tm – tjelesna masa, *ip* – intraperitonealno.



Slika 44. Izraženost biljega 4G8 u području kore i hipokampusa kod reprezentativnih prereza skupine HC, AD, AD + Qu₂₅, AD + Qu₅₀, Qu₂₅ i Qu₅₀ vizualiziran imunohistokemijskim bojanjem. Štakori su raspoređeni u 6 različitih skupina (n=10) podjednake tjelesne mase s razlikom ± 10 g te tijekom 28 dana obradeni *ip* s 0,9% NaCl (HC), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze (AD), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 25 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₂₅), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 50 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₅₀), 25 mg/kg/tm kvercetina (Qu₂₅) i 50 mg/kg/tm kvercetina (Qu₅₀). Mjerilo na stvarnom povećanju objektiva 40x je 50 μm, pozitivan signal označen bijelom strelicom. Artefakt nastao prilikom izrade histološkog preparata istaknut crvenim pravokutnikom. Kratice: tm – tjelesna masa, *ip* – intraperitonealno, Ctx – kora (korteks), Hpp- hipokampus.



Slika 45. Kvantitativna analiza izraženosti biljega G48 u području hipokampalne formacije, kore velikoga mozga i maloga mozga nakon subkronične primjene AlCl_3 + D-gal i Qu. Štakori su raspoređeni u 6 različitih skupina ($n=10$) podjednake tjelesne mase s razlikom ± 10 g te tijekom 28 dana obrađeni *ip* s 0,9% NaCl (HC), 10 mg/kg/tm AlCl_3 + 60 mg/kg/tm D-galaktoze (AD), 10 mg/kg/tm AlCl_3 + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 25 mg/kg/tm kvercetin (AD + Qu₂₅), 10 mg/kg/tm AlCl_3 + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 50 mg/kg/tm kvercetin (AD + Qu₅₀), 25 mg/kg/tm kvercetin (Qu₂₅) i 50 mg/kg/tm kvercetin (Qu₅₀). Rezultati su prikazani kao SV \pm SP pojedine skupine. *Statistički značajne promjene u odnosu na skupinu AD + Qu₂₅ (** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$). [■]Statistički značajne promjene u odnosu na skupinu AD + Qu₅₀ ([■] $P \leq 0,05$; [■] $P \leq 0,01$; [■] $P \leq 0,001$). Kratice: tm – tjelesna masa, *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

U području hipokampalne formacije nisu zabilježene statistički značajne promjene u broju i površini prisutnih plakova (**Slika 45A-B**) usporedbom obrađenih skupina. Statistički značajne promjene zabilježene su u intenzitetu obojenja (**Slika 45C**), koje je veće kod skupine AD u odnosu na skupinu AD + Qu₂₅ ($P = 0,0094$).

U području kore velikoga mozga zapažen je statistički značajno veći broj plakova (**Slika 45A**) kod skupine AD u odnosu na skupinu AD + Qu₂₅ ($P = 0,00046$) bez statistički značajnih promjena u površini plakova (**Slika 45B**) unutar ispitnih skupina. Statistički značajne promjene zapažene su i u intenzitetu obojenja (**Slika 45C**) koje je veće kod skupine AD u odnosu na skupine AD + Qu₂₅ ($P = 0,0021$) i AD + Qu₅₀ ($P = 0,000147$).

Analizom rezultata u području malog mozga vidljiv je statistički značajno veći broj plakova (**Slika 45A**) kod skupine AD u odnosu na skupine AD + Qu₂₅ i AD + Qu₅₀ ($P = 0,01$), veća površina plakova (**Slika 45B**) kod skupine AD u odnosu na skupine AD + Qu₂₅ ($P = 0,0044$) i AD + Qu₅₀ ($P = 0,047$) te intenzitet obojenja (**Slika 45C**) AD + Qu₂₅ ($P = 0,0002$) i AD + Qu₅₀ ($P = 0,0036$).

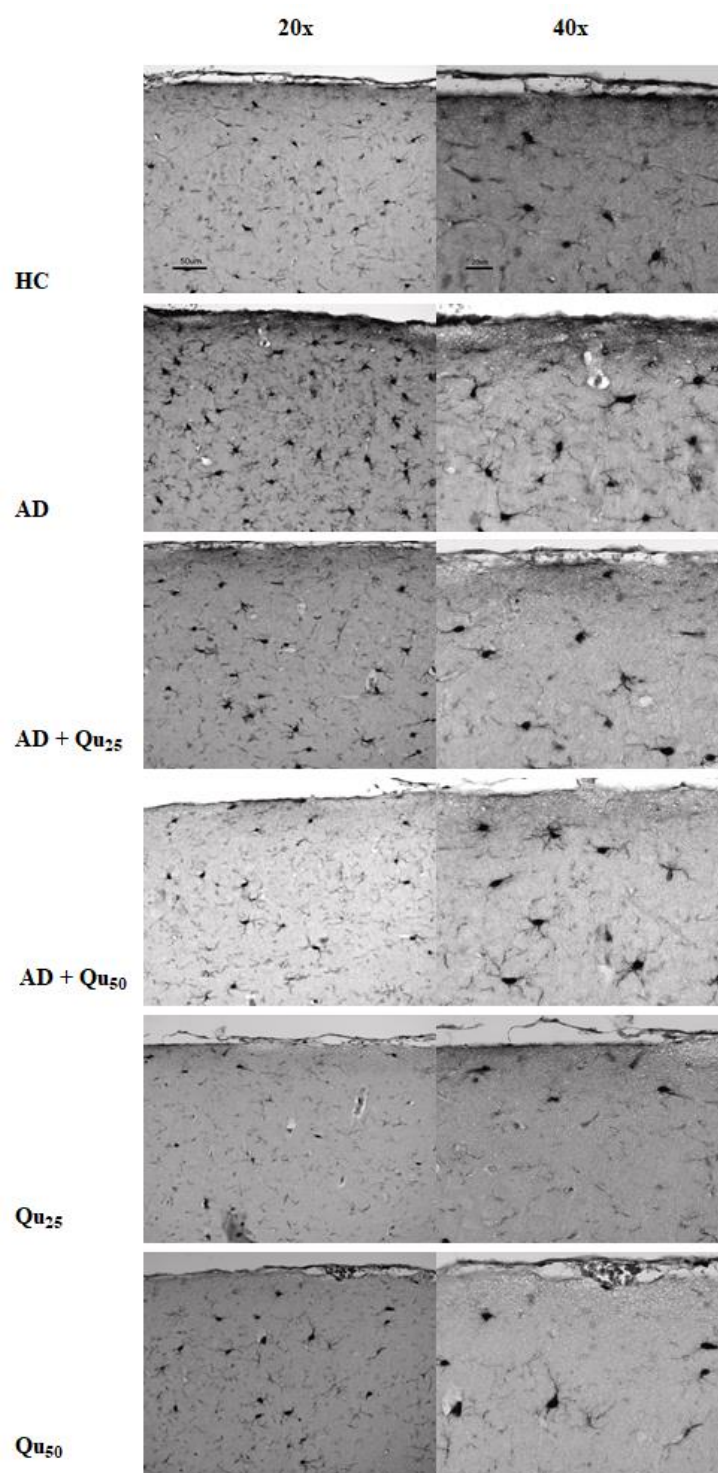
4.5.1.3. Praćenje učinka subkronične primjene AlCl₃ + D-gal i Qu na izraženost biljega Iba1

Imunohistokemijskim bojanjem analizirana je izraženost biljega Iba1. Protein Iba1 ključan je u procesima fagocitoze i nabiranja membrane. Biljeg označava mikroglija stanice u mirovanju i u početnoj fazi aktivacije, a njegovom upotrebom dobro je vidljiva morfologija stanice, posebice dugi razgranati nastavci.

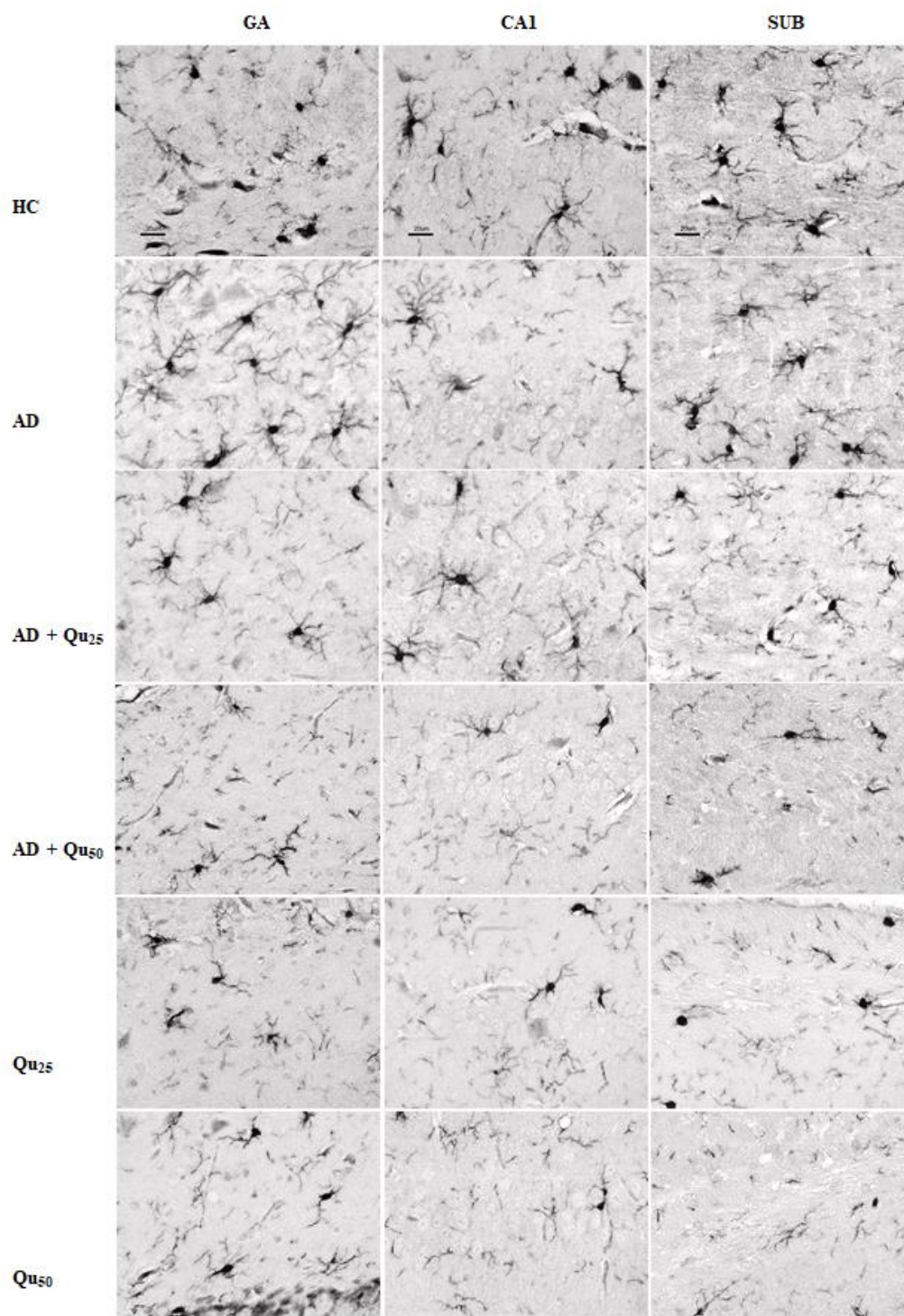
Izraženost biljega Iba1 prikazana je na **Slikama 46-48** i u **Tablici 14**. Semikvantitativnom analizom mikroskopskih snimaka i kvantitativnom obradom podataka može se zaključiti da je prema izraženosti biljega Iba1 imunoreaktivnost povećana kod AD skupine u područje kore velikoga mozga (**Slika 46**) u odnosu na ostale obrađene skupine ($P = 0,0083$).

Među uzorcima hipokampalne formacije (**Slika 47**) vidljiva je povećana imunoreaktivnost u području: GD kod skupine AD i AD + Qu₂₅ u odnosu na skupine HC ($P = 0,00013$) i Qu₅₀ ($P = 0,0083$); CA1 kod skupina HC, AD i AD + Qu₂₅ u odnosu na skupine AD + Qu₅₀, Qu₂₅ i Qu₅₀ ($P = 0,0012$); SUB kod skupina HC i AD u odnosu na skupine Qu₂₅ i Qu₅₀ ($P = 0,00013$).

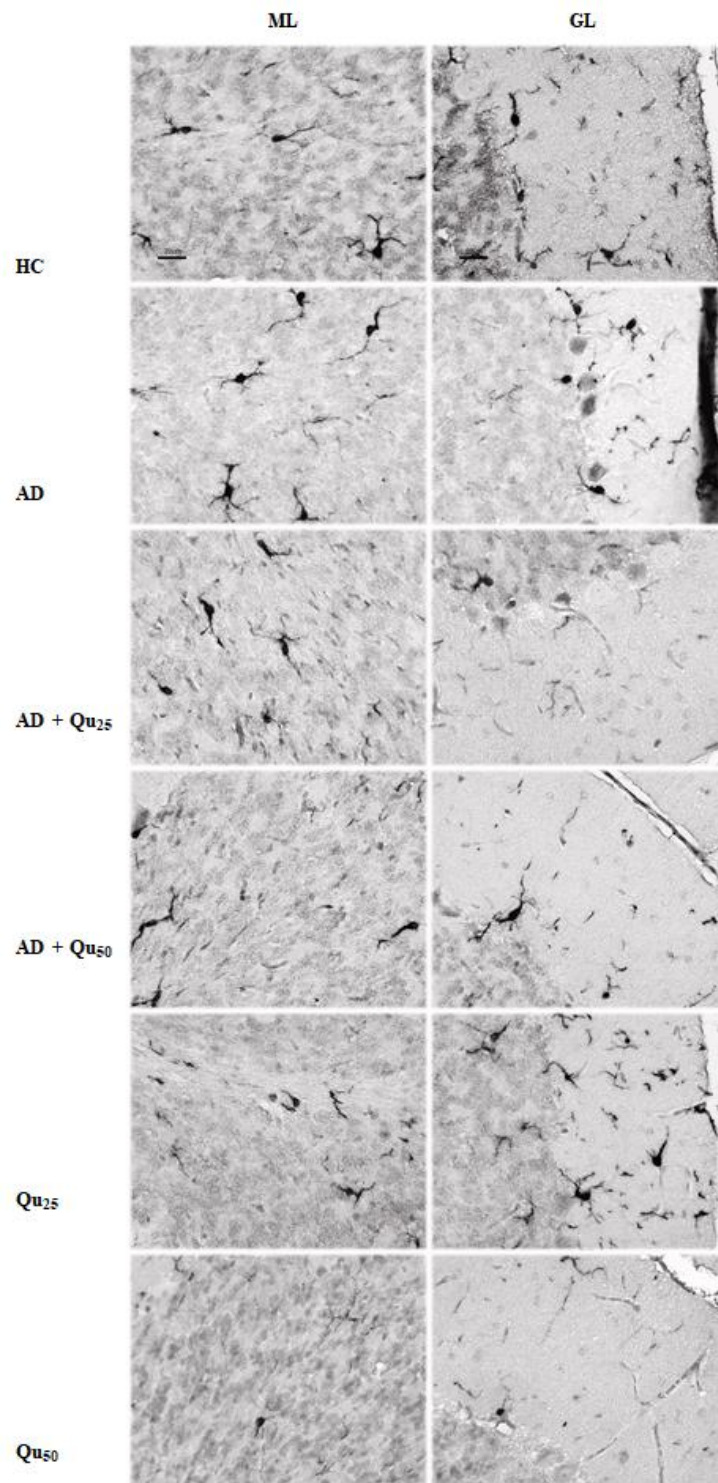
Područje malog mozga (**Slika 48**) ima najmanju izraženost biljega Iba1. Biljeg je pojačano izražen kod skupine AD u molekularnom sloju u odnosu na skupinu Qu₂₅ i Qu₅₀ ($P = 0,00013$) i granularnom sloju kod skupine HC i AD u odnosu na skupine AD + Qu₂₅, AD + Qu₅₀, Qu₂₅ i Qu₅₀ ($P = 0,046$).



Slika 46. Izraženost biljega Iba1 u vanjskom području kore velikoga mozga (Ctx) kod reprezentativnih prereza skupine HC, AD, AD + Qu₂₅, AD + Qu₅₀, Qu₂₅ i Qu₅₀. Štakori su raspoređeni u 6 različitih skupina (n=10) podjednake tjelesne mase s razlikom ± 10 g te tijekom 28 dana obrađeni *ip* s 0,9% NaCl (HC), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze (AD), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 25 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₂₅), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 50 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₅₀), 25 mg/kg/tm kvercetina (Qu₂₅) i 50 mg/kg/tm kvercetina (Qu₅₀). Rezultati su prikazani kao SV \pm SP pojedine skupine. Mjerilo na stvarnom povećanju objektiva 20x je 50 μ m i objektiva 40x 20 μ m. Kratice: tm – tjelesna masa, *ip* – intraperitonealno.



Slika 47. Izraženost biljega Iba1 u odabranim područjima hipokampalne (Hpp) formacije (GD, lat. *gyrus dentatus*; CA1, lat. *cornu ammonis*; SUB, lat. *subiculum*) kod reprezentativnih prereza skupine HC, AD, AD + Qu₂₅, AD + Qu₅₀, Qu₂₅ i Qu₅₀. Štakori su raspoređeni u 6 različitih skupina (n=10) podjednake tjelesne mase s razlikom ± 10 g te tijekom 28 dana obrađeni *ip* s 0,9% NaCl (HC), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze (AD), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 25 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₂₅), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 50 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₅₀), 25 mg/kg/tm kvercetina (Qu₂₅) i 50 mg/kg/tm kvercetina (Qu₅₀). Mjerilo na stvarnom povećanju objektiva 40x je 20 μm. Kratice: tm – tjelesna masa, *ip* – intraperitonealno.



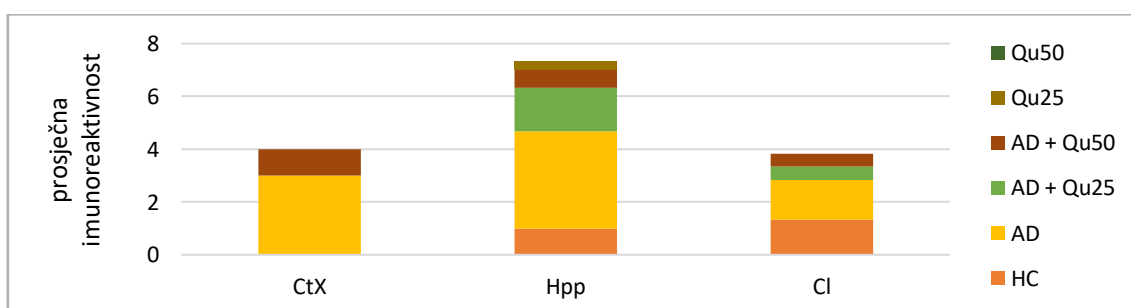
Slika 48. Izraženost biljega Iba1 u molekularnom (ML, engl, *molecular layer*) i granularnom (GL, engl. *granular layer*) sloju maloga mozga (CI) kod reprezentativnih prereza skupine HC, AD, AD + Qu₂₅, AD + Qu₅₀, Qu₂₅ i Qu₅₀. Štakori su raspoređeni u 6 različitih skupina (n=10) podjednake tjelesne mase s razlikom ± 10 g te tijekom 28 dana obrađeni *ip* s 0,9% NaCl (HC), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze (AD), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 25 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₂₅), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 50 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₅₀), 25 mg/kg/tm kvercetina (Qu₂₅) i 50 mg/kg/tm kvercetina (Qu₅₀). Mjerilo na stvarnom povećanju objektiva 40x je 20 μm. Kratice: tm – tjelesna masa, *ip* – intraperitonealno.

Tablica 14. Semikvantitativna izraženost biljega Iba1 u području kore velikoga mozga, hipokampalne formacije i maloga mozga nakon subronične primjene AlCl₃ + D-gal i Qu

Pokusne skupine ^a	Ctx		Hpp			Cl	
		GD	CA1	SUB	ML	GL	
HC	0	0	2	3	1	1	
AD	3	4	3	4	2	1	
AD + Qu ₂₅	0	2	2	1	1	0	
AD + Qu ₅₀	1	1	0	1	1	0	
Qu ₂₅	0	1	0	0	0	0	
Qu ₅₀	0	0	0	0	0	0	

0 = imunoreaktivnost nije prisutna
 1 = prisutno je nekoliko imunoreaktivnih stanica, sve stanice su razgranate
 2 = umjeren broj imunoreaktivnih stanica, uglavnom su razgranate, manji broj aktiviranih
 3 = mnogo difuzno raspoređenih imunoreaktivnih stanica, sve su aktivirane
 4 = mnogo velikih nakupina aktiviranih mikroglia stanica

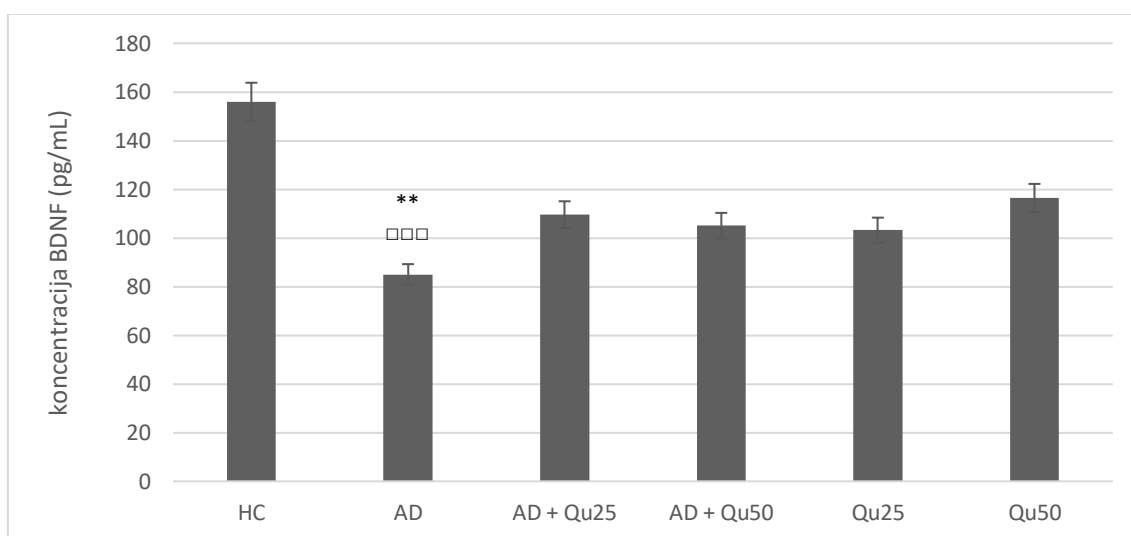
^aŠtakori su raspoređeni u 6 različitih skupina (n=10) podjednake tjelesne mase s razlikom ± 10 g te tijekom 28 dana obrađeni *ip* s 0,9% NaCl (HC), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze (AD), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 25 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₂₅), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 50 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₅₀), 25 mg/kg/tm kvercetina (Qu₂₅) i 50 mg/kg/tm kvercetina (Qu₅₀). Mjerilo na stvarnom povećanju objektiva 40x je 20 μm. Kratice: tm – tjelesna masa, *ip* – intraperitonealno, Ctx – kora velikoga mozga (lat. *cortex*), Hpp – hipokampalna formacija: GD, lat. *gyrus dentatus*; CA1, lat. *cornu ammonis*; SUB, lat. *subiculum*, Cl – mali mozak (lat. *cerebellum*): ML – molekularni sloj (engl. *molecular layer*) i GL - granularni sloj (engl. *granular layer*).



Slika 49. Prosječna imunoreaktivnost kod skupine HC, AD, AD + Qu₂₅, AD + Qu₅₀, Qu₂₅ i Qu₅₀ u području kore velikoga mozga (Ctx), hipokampalne formacije (Hpp) i maloga mozga (Cl). Štakori su raspoređeni u 6 različitih skupina (n=10) podjednake tjelesne mase s razlikom ± 10 g te tijekom 28 dana obrađeni *ip* s 0,9% NaCl (HC), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze (AD), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 25 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₂₅), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 50 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₅₀), 25 mg/kg/tm kvercetina (Qu₂₅) i 50 mg/kg/tm kvercetina (Qu₅₀). Kratice: tm – tjelesna masa, *ip* – intraperitonealno, Ctx – kora velikoga mozga (lat. *cortex*), Hpp – hipokampalna formacija, Cl – mali mozak (lat. *cerebellum*).

4.5.2. Učinak subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na koncentraciju moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF-a) u tkivu mozga

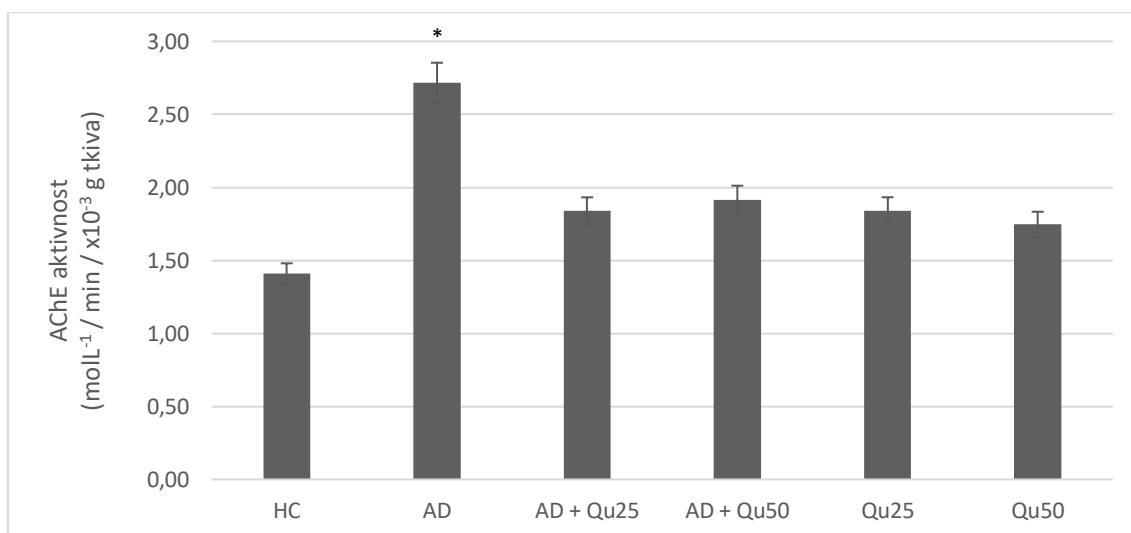
Analizom rezultata mjerenja koncentracije BDNF-a (Slika 50) zabilježena je statistički značajno niža koncentracija kod skupine AD u odnosu na skupinu HC ($P = 0,006$) i skupinu Qu₅₀ ($P = 0,00003$).



Slika 50. Koncentracije moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF-a) u homogenatima tkiva mozga nakon subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu. Štakori su raspoređeni u 6 različitih skupina ($n=10$) podjednake tjelesne mase s razlikom ± 10 g te tijekom 28 dana obrađeni *ip* s 0,9% NaCl (HC), 10 mg/kg/tm $AlCl_3$ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze (AD), 10 mg/kg/tm $AlCl_3$ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 25 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₂₅), 10 mg/kg/tm $AlCl_3$ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 50 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₅₀), 25 mg/kg/tm kvercetina (Qu₂₅) i 50 mg/kg/tm kvercetina (Qu₅₀). Rezultati su prikazani kao SV \pm SP pojedine skupine. *Statistički značajne promjene u odnosu na skupinu HC (** $P \leq 0,01$). □□□Statistički značajne promjene u odnosu na skupinu Qu₅₀ (□□□ $P \leq 0,001$). Kratice: tm – tjelesna masa, *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

4.5.3. Učinak subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na aktivnost acetilkolinesteraze (AChE) u tkivu mozga

Analizom rezultata aktivnosti AChE (Slika 51) zabilježena je povišena aktivnost u odnosu na HC skupinu kod skupine AD ($P = 0,026$) te kod skupine AD + Qu₂₅. AD + Qu₅₀, Qu₂₅ i Qu₅₀ ($P \geq 0,05$) bez statističke značajnosti.



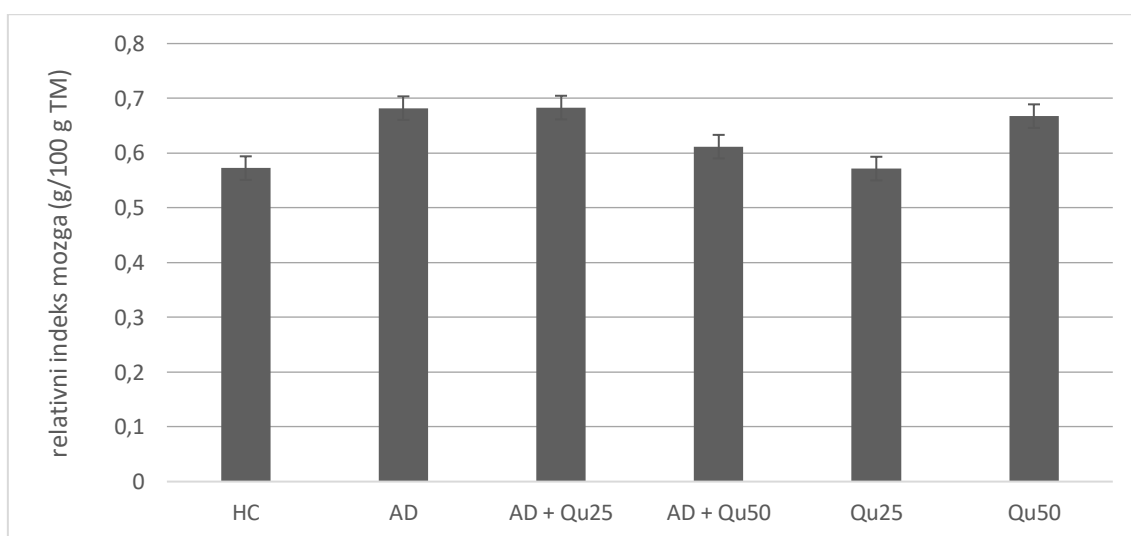
Slika 51. Aktivnosti acetilkolinesteraze (AChE) u homogenatima tkiva mozga nakon subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu. Štakori su raspoređeni u 6 različitih skupina ($n=10$) podjednake tjelesne mase s razlikom ± 10 g te tijekom 28 dana obrađeni *ip* s 0,9% NaCl (HC), 10 mg/kg/tm $AlCl_3$ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze (AD), 10 mg/kg/tm $AlCl_3$ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 25 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₂₅), 10 mg/kg/tm $AlCl_3$ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 50 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₅₀), 25 mg/kg/tm kvercetina (Qu₂₅) i 50 mg/kg/tm kvercetina (Qu₅₀). Rezultati su prikazani kao SV \pm SP pojedine skupine. *Statistički značajne promjene u odnosu na skupinu HC ($*P \leq 0,05$). Kratice: tm – tjelesna masa, *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

4.6. Praćenje učinka subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu u nastanku neuropale

Procjena učinka subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal u nastanku neuropale i protektivnog učinka Qu učinjena je analizom rezultata relativnog indeksa mozga, koncentracije nitrita, aktivnosti arginaze i koncentracije prupalnih/protuupalnih citokina.

4.6.1. Učinka subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na relativni indeksa mozga

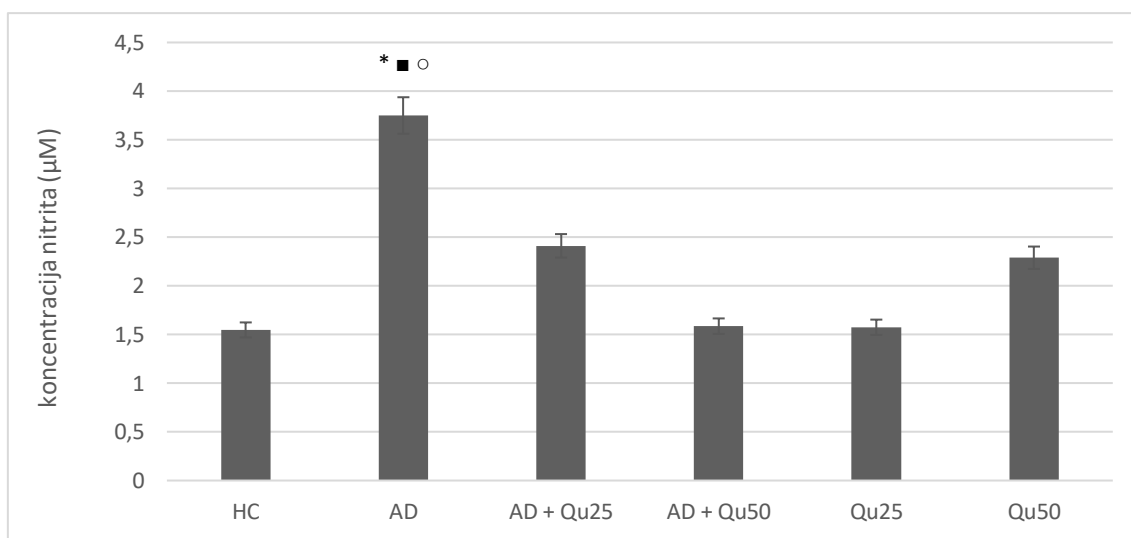
Na Slici 52 vidljiva razlika između ispitnih, ali analizom rezultata relativnog indeksa mozga nisu zabilježena statistički značajna odstupanja ($P \geq 0,05$).



Slika 52. Prikaz relativnog indeksa mozga nakon subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu. Štakori su raspoređeni u 6 različitih skupina ($n=10$) podjednake tjelesne mase s razlikom ± 10 g te tijekom 28 dana obrađeni *ip* s 0,9% NaCl (HC), 10 mg/kg/tm $AlCl_3$ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze (AD), 10 mg/kg/tm $AlCl_3$ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 25 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₂₅), 10 mg/kg/tm $AlCl_3$ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 50 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₅₀), 25 mg/kg/tm kvercetina (Qu₂₅) i 50 mg/kg/tm kvercetina (Qu₅₀). Rezultati su prikazani kao SV \pm SP pojedine skupine bez statistički značajnih promjena ($P \geq 0,05$). Kratice: tm – tjelesna masa, *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

4.6.2. Učinka subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na koncentraciju nitrita (NO_2^-) u tkivu mozga

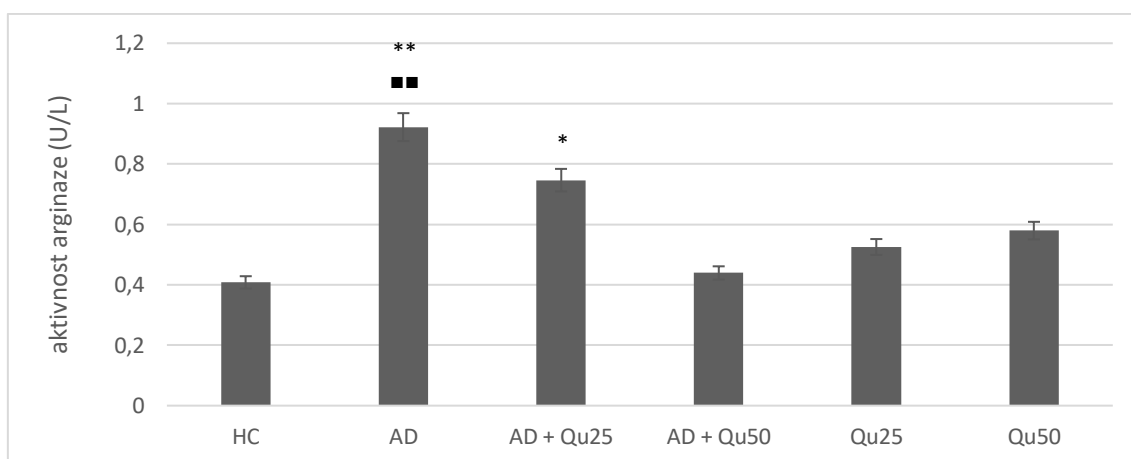
Analizom rezultata koncentracije nitrita (Slika 53) zabilježena je statistički značajno povišena koncentracija kod skupine AD u odnosu na skupine HC, AD + Qu₅₀ i Qu₂₅ ($P = 0,04$).



Slika 53. Koncentracija nitrita (NO_2^-) u homogenatima tkiva mozga nakon subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu. Štakori su raspoređeni u 6 različitih skupina ($n=10$) podjednake tjelesne mase s razlikom ± 10 g te tijekom 28 dana obrađeni *ip* s 0,9% NaCl (HC), 10 mg/kg/tm $AlCl_3$ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze (AD), 10 mg/kg/tm $AlCl_3$ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 25 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₂₅), 10 mg/kg/tm $AlCl_3$ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 50 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₅₀), 25 mg/kg/tm kvercetina (Qu₂₅) i 50 mg/kg/tm kvercetina (Qu₅₀). Rezultati su prikazani kao SV \pm SP pojedine skupine. *Statistički značajne promjene u odnosu na skupinu HC (* $P \leq 0,05$). ■ Statistički značajne promjene u odnosu na skupinu AD + Qu₅₀ (■ $P \leq 0,05$). ° Statistički značajne promjene u odnosu na skupinu Qu₂₅ (° $P \leq 0,05$). Kratice: tm – tjelesna masa, *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

4.6.3. Učinka subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na aktivnosti arginaze (Arg) u tkivu mozga

Analizom rezultata koncentracije arginaze (Slika 54) u homogenatima tkiva mozga zapažena je statistički povišena koncentracija kod skupine AD u odnosu na skupine HC i AD + Qu₅₀ ($P = 0,003$) te kod skupine AD + Qu₂₅ u odnosu na skupinu HC ($P = 0,04$).



Slika 54. Aktivnost arginaze (Arg) u homogenatima tkiva mozga nakon subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu. Štakori su raspoređeni u 6 različitih skupina ($n=10$) podjednake tjelesne mase s razlikom ± 10 g te tijekom 28 dana obrađeni *ip* s 0,9% NaCl (HC), 10 mg/kg/tm $AlCl_3$ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze (AD), 10 mg/kg/tm $AlCl_3$ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 25 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₂₅), 10 mg/kg/tm $AlCl_3$ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 50 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₅₀), 25 mg/kg/tm kvercetina (Qu₂₅) i 50 mg/kg/tm kvercetina (Qu₅₀). Rezultati su prikazani kao SV \pm SP pojedine skupine. *Statistički značajne promjene u odnosu na skupinu HC (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$). ■Statistički značajne promjene u odnosu na AD + Qu₅₀ (■■ $P \leq 0,01$). Kratice: tm – tjelesna masa, *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

4.6.4. Učinka subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na proupalne i protuupalne citokine u tkivu mozga

Analizom rezultata proupalnih i protuupalnih citokina (Tablica 15) zabilježene su povišene vrijednosti unutar skupina koje su obrađene s $AlCl_3$ (AD) u odnosu na kontrolnu skupinu (HC). Statistički značajne promijene zabilježene su kod skupine AD u odnosu na skupinu HC ($P = 0,008$) za IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IFN- γ , TNF- α i GM-CSF. Povišene vrijednosti zabilježene su i kod IL-4 za skupine AD + Qu₅₀ ($P = 0,03$) i AD ($P = 0,02$) u odnosu na skupinu HC te kod RANTES za skupinu AD + Qu₅₀ u odnosu na HC ($P = 0,01$).

Tablica 15. Rezultati koncentracije citokina u uzorku tkiva mozga nakon subkronične primjene AlCl₃ + D-gal i Qu^a

Citokini	HC	AD	AD + Qu ₂₅	AD + Qu ₅₀	Qu ₂₅	Qu ₅₀	Napomena
IL-1α (pg/mL)	2,30 ± 0,02	4,22 ± 0,07	2,76 ± 0,02	3,39 ± 0,06	2,55 ± 0,03	2,8 ± 0,02	HC < AD (<i>P</i> = 0,008)
IL-1β (pg/mL)	79,15 ± 0,03	168,25 ± 0,13	118,9 ± 0,04	149,16 ± 0,2	91,89 ± 0,06	117,4 ± 0,1	HC < AD (<i>P</i> = 0,008)
IL-2 (pg/mL)	6,30 ± 0,03	11,25 ± 0,10	8,81 ± 0,03	10 ± 0,15	6,45 ± 0,01	7,71 0,02	HC < AD (<i>P</i> = 0,008)
IL-4 (pg/mL)	0,86 ± 0,03	1,59 ± 0,02	1,14 ± 0,04	1,51 ± 0,03	0,95 ± 0,02	1,14 ± 0,02	HC < AD (<i>P</i> = 0,02) HC < AD + Qu ₅₀ (<i>P</i> = 0,03)
IL-6 (pg/mL)	23,72 ± 0,2	51,36 ± 0,30	33,23 ± 0,2	43,57 ± 0,16	25,36 ± 0,13	31,73 ± 0,06	HC < AD (<i>P</i> = 0,008)
IL-10 (pg/mL)	103,34 ± 0,2	243,54 ± 0,20	146,67 ± 0,4	194,29 ± 0,15	78,45 ± 0,03	69,81 ± 0,07	Qu ₅₀ < AD (<i>P</i> = 0,008)
IL-12 (pg/mL)	2,90 ± 0,03	5,09 ± 0,06	3,47 ± 0,18	4,16 ± 0,10	2,97 ± 0,02	4,27 ± 0,03	HC < AD (<i>P</i> = 0,008)
IL-13 (pg/mL)	17,24 ± 0,08	34,19 ± 0,06	21,60 ± 0,07	28,66 ± 0,20	17,53 ± 0,05	23,50 ± 0,10	HC < AD (<i>P</i> = 0,008)
IFN-γ (pg/mL)	18,70 ± 0,2	45,87 ± 0,06	28,48 ± 0,18	42,09 ± 0,05	23,88 ± 0,06	32,15 ± 0,03	HC < AD (<i>P</i> = 0,008)
TNF-α (pg/mL)	2,31 ± 0,04	4,60 ± 0,20	2,95 ± 0,04	4,01 ± 0,01	2,87 ± 0,03	3,27 ± 0,09	HC < AD (<i>P</i> = 0,008)
GM-CSF (pg/mL)	1,45 ± 0,04	2,70 ± 0,08	1,93 ± 0,02	2,31 ± 0,06	1,54 ± 0,04	1,80 ± 0,03	HC < AD (<i>P</i> = 0,008)
RANTES (pg/mL)	1,74 ± 0,02	2,95 ± 0,10	2,47 ± 0,05	3,13 ± 0,10	1,96 ± 0,01	2,30 ± 0,05	HC < AD + Qu ₅₀ (<i>P</i> = 0,01)

^aŠtakori su raspoređeni u 6 različitih skupina (n=10) podjednake tjelesne mase s razlikom ± 10 g te tijekom 28 dana obrađeni *ip* s 0,9% NaCl (HC), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze (AD), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 25 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₂₅), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 50 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₅₀), 25 mg/kg/tm kvercetina (Qu₂₅) i 50 mg/kg/tm kvercetina (Qu₅₀). Rezultati su prikazani kao SV ± SP pojedine skupine sa statistički značajnim promjenama. Kratice: tm – tjelesna masa, *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, IL – interleukin, IFN – interferon, TNF – čimbenik nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor*), GM-CSF – čimbenik stimulacije granulocitno-makrofagnih kolonija (engl. *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*).

4.7. Praćenje učinka subkronične primjene AlCl₃ + D-gal i Qu na motoričku i senzornu percepciju kroz neurološki pregled jedinki (engl. *neurological screening, NS*)

Neurološki pregled je učinjen dan prije početka obrade i 24 sata po završetku iste kako bi se utvrdilo da nastale promjene nisu dio urođene ili prisutne patologije. Tijekom prvoga pregleda nisu uočena odstupanja niti u jedne jedinke. U **Tablici 16** su prikazani rezultati zabilježeni 24 sata prije i po završetku obrade. Analizom rezultat neurološkog pregleda (n = 10) nisu zapažena odstupanja prilikom procjene motoričke i senzorno percepcije.

Tablica 16. Procjena motoričke i senzorne percepcije nakon subkronične primjene AlCl₃ + D-gal i Qu

Pokusne skupine ^a	Uspravljanje	Povlačenje udova	Trzaj uha	Treptaj oka	Vizualna orijentacija	Slušna orijentacija	Olfaktorna orijentacija
HC	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +
AD	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +
AD + Qu ₂₅	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +
AD + Qu ₅₀	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +
Qu ₂₅	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +
Qu ₅₀	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +

^aŠtakori su raspoređeni u 6 različitih skupina (n=10) podjednake tjelesne mase s razlikom ± 10 g te tijekom 28 dana obrađeni *ip* s 0,9% NaCl (HC), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze (AD), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 25 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₂₅), 10 mg/kg/tm AlCl₃ + 60 mg/kg/tm D-galaktoze + 50 mg/kg/tm kvercetina (AD + Qu₅₀), 25 mg/kg/tm kvercetina (Qu₂₅) i 50 mg/kg/tm kvercetina (Qu₅₀). Kratice: tm – tjelesna masa, *ip* – intraperitonealno, (+) - pozitivan odgovor na podražaj, (-) - negativan odgovor na podražaj.

5. RASPRAVA

Os crijeva-mozak (engl. *gut-brain axis*, GBA) sastoji se od dvosmjernog komuniciranja između središnjeg i enteričnog živčanog sustava, povezujući emocionalne i kognitivne centre u mozgu s perifernom funkcijom crijeva. Mehanizmi komunikacije su brojni i uključuju neuralne, humoralne i upalne putove, ovisno o domaćinu i okolišnim čimbenicima. Na ovaj kompleksni simbiotski međuodnos probavnog sustava, crijevne mikrobiote i mozga domaćina snažno utječe prehrana; optimalan odnos između prehrane i crijevne mikrobiote može biti koristan za probavu hrane, unos hranjivih tvari te zdravlje imunostnog i živčanog sustava. Jedan od značajnijih problema s kojima se susrećemo u istraživanju i testiranju novih terapijskih pristupa u liječenju Alzheimerove bolesti je odgovarajući animalni model koji bi najbolje oponašao ranu fazu bolesti prisutnu u ljudi, obzirom na uočene nedostatke transgeničnih mišjih AD modela (213). Štakorski model A1 inducirane AD upotrebljava se od 70-ih godina dvadesetog stojeća (214, 215). Iako je njegova uloga u razvoju AD i dalje kontroverzna, A1 se i dalje primjenjuje na različite načine (enteralno i parenteralno) jer obrazac njegove neurotoksičnosti nalikuje progresivnoj neurodegeneraciji koja je zabilježena u AD (216-218).

U ovome istraživanju, provedenom *in vivo* na induciranom štakorskom modelu AD, istraženi su protektivni učinci otopine kvercetina na posljedice subkronične intoksikacije uzrokovane $AlCl_3$ i D-gal. U svrhu procjene toksičnosti istraživanih pripravaka na razini cjelokupnog organizma praćene su promjene u tjelesnoj masi te vrijednosti esencijalnih i toksičnih elemenata u uzorku seruma i tkivu mozga. Istražene su strukturne i funkcionalne promjene crijevne mikrobiote te njihov utjecaj na homeostatke i patološke promjene u mozgu u svrhu provjere djelotvornosti kvercetina kao snažnog antioksidansa nazočnog u voću, povrću i pčelinjim proizvodima. Kvercetin jest važna sastavnica funkcionalne hrane te mogući terapeutik u prevenciji i liječenju brojnih kroničnih bolesti uključujući neurodegenerativne promjene u ranoj fazi AD bolesti. Protuoksidacijska i protuupalna svojstva kvercetina istražena su određivanjem parametara oksidacijskog stresa i antioksidacijske zaštite u uzorku tkiva mozga određivanjem razine lipidne preoksidacije (MDA), koncentracije karboniliranih proteina (PC), koncentracije ukupnog glutationa (GSH), razine enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) i enzimske aktivnosti katalaze (CAT). Nadalje, analizom histoloških preparata nakon bojanja modificiranom metodom po Bielschowskom (bojanje srebrom) i imunohistokemijskog označavanja biljezima 4G8, AT8, PHF1, MC1, Iba1, CD68 i HLA-DR utvrđene su neurodegenerativne promjene. Uvidom u koncentraciju moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF-a) i aktivnosti acetilkolinesteraze (ACh) istražene su promjene na razini kolinergičkog

sustava. Provedena je provjera prisutnosti neuroupale određivanjem relativnog indeksa mozga, koncentracije nitrita (NO_2^-), aktivnosti arginaze, upalnih citokina i hematoloških parametara.

5.1. Praćenje učinka subkronične primjene AlCl_3 + D-gal i Qu na tjelesnu masu pokusnih životinja

Čovjek je u evoluciji stvorio mehanizme za održavanje homeostaze unutarnjeg mikrokoliša. Međutim, nagomilani ekološki produkti su se toliko povećali, da adaptacijski i evolucijski mehanizmi čovjeka to nisu u mogućnosti pratiti pa se koncentracija iona teških metala, u organskim strukturama, sve više povećava. Zaštitni mehanizmi protiv metala, kao što su minimalna permeabilnost sluznica, nepropusnost kože, detoksikacijski mehanizmi (jetra i krvno-moždana barijera), također postaju nedostatni. Tako je teškim metalima otvoren put inkorporacije u ultramikrostrukturu, odnosno aktivno uplitanje iona metala u biokemijske reakcije u organizmu (219, 220).

Prema Paulingu (221), četiri petine svih elemenata na našoj planeti su tzv. esencijalni metali/elementi (Cu, Zn, Fe, Mn i Mg), koji su funkcionalni sastojak živih struktura, bez kojih nema života. Svi su drugi metali kojima nije namijenjena takva uloga (neesencijalni/teški metali), a nađu se u organizmu, toksični. Teški metali arsen (As), aluminij (Al), bakar (Cu), kadmij (Cd), krom (Cr), nikal (Ni), olovo (Pb), srebro (Ag), stroncij (Sr) i živa (Hg), se međusobno razlikuju po fizikalnim i kemijskim svojstvima, kao i po afinitetu prema organskim strukturama. Imaju zajedničko svojstvo, da oblikuju stabilne komplekse, s različitim ligandima. Vežu se za aktivna mjesta u biomolekulama, dovodeći do narušavanja niza funkcija, s uzročno-posljedičnim slijedovima (219, 222).

Lanac kontaminacije teškim metalima gotovo uvijek slijedi ciklički poredak u okolišu kao što su industrija, atmosfera, tlo, voda, hrana i ljudi. Kako je jasno da kronična izloženost teškim metalima i metaloidima na niskim razinama izaziva štetne učinke, dokazano je da su teški metali toksični za zdravlje ljudi i okoliša. Toksičnost teških metala smatra se glavnom prijetnjom i s njim je povezano nekoliko zdravstvenih rizika. Ponekad mogu djelovati kao pseudo elementi tijela, no u određenim trenucima mogu ometati metaboličke procese. Malo metala, poput Al, može se ukloniti eliminacijskim aktivnostima, dok se neki metali nakupljaju u tijelu i prehrambenom lancu, pokazujući kroničnu prirodu. Različiti javnozdravstveni

postupci poduzeti su za kontrolu, sprječavanje i liječenje toksičnosti metala koja se javlja na različitim razinama, poput profesionalne izloženosti i okolišnih čimbenika. Toksičnost metala ovisi o apsorbiranoj dozi, načinu izlaganja i trajanju izlaganja, što može dovesti do različitih poremećaja (oštećenja središnjih živčanih funkcija, kardiovaskularnog i probavnog sustava, pluća, bubrega, jetre, endokrinih žlijezda i kosti) i rezultirati pretjeranim oštećenjima biološkog sustava (223).

Al je treći najzastupljeniji element u zemljinoj kori, a prirodno se javlja u okolišu čineći 8% težine zemljine krute površine (224), prehrambenim proizvodima i vodi za piće (225). Međutim, samo ~0,1% oralno unesenog Al apsorbira se iz probavnog sustava i postaje bioraspoloživo (226). Kvercetin, član obitelji flavonoida, jedan je od najistaknutijih dijetalnih antioksidansa. Sveprisutan je u hrani uključujući povrće, voće, čaj i vino, kao i u bezbroj dodataka prehrani. Procijenjena apsorpcija kvercetin glukozida, prirodni oblik kvercetina, kreće se 3-17% u zdravih pojedinaca koji su primili dozu od 100 mg (136). Stoga kako bi osigurali bolju apsorpciju korištenih komponenti (otopina $AlCl_3$ i D-gal; otopina Qu) u ovome istraživanju iste su injicirane intraperitonealno (*ip*). U štakora (200 g) površina peritonealne površine procjenjuje se na 125 cm² (227), a intraperitonealna tekućina ima sličan sastav krvnoj plazmi (sadrži oko 2% proteina) te injicirane komponente „nestaju“ difuzijom u okolna tkiva. U principu, prijenos u sustavni krvotok se odvija (a) mezenterijalno - portalnim krvožilnim sustavom, (b) mezenterijalno - ekstraportalnim i izvan - mezenterijalnim krvožilnim sustavom i (c) limfnim žilama (228). Osim navedenog treba istaći i činjenicu da bi intragastrični unos kanilom tijekom 28 dana prouzročio dodatni stres kod životinja što bi narušilo brojne homeostatske procese u organizmu, posebice, fiziološke, psihološke i bihevioralne promjene. Točnije, destruktivna snaga stresnih reakcija prenosi se na somatsku razinu promjenama neuroprijenosnog, hormonalnog i imunskog odgovora s promjenom funkcije niza tkiva i organa dovodeći do „degenerativne kaskade“ i nastanka morfoloških promjena, koje u konačnici dovode do povećanog rizika nastanka neurovaskularnih bolesti kroz slijed brzih i dugotrajnih promjena u moždanim stanicama znanim kao astrociti. Nadalje, treba istaknuti da stres pridonosi značajnim promjenama u sastavu crijevne mikrobiote pridonoseći disbiozi crijevne barijere.

Tijekom ovoga istraživanja štakori su raspoređeni u 6 različitih skupina ovisno o obradi na osnovu tjelesne mase (**Tablica 4**). Procjena toksičnosti na nivou cijelog organizma utvrđena je vaganjem životinja tijekom istraživanja i praćenjem promjena u tjelesnoj masi. Gubitak tjelesne mase (**Slika 23 i 24**) tijekom perioda istraživanja vidljiv je kako slijedi kod AD, AD + Qu₂₅ i

AD + Qu₅₀ ispitne skupine, ali bez statistički značajne razlike ($P \geq 0,05$) u odnosu na skupinu Qu₂₅ i Qu₅₀, kao niti u odnosu na HC skupinu gdje je zabilježen porast u tjelesnoj masi tijekom trajanja istraživanja. Na temelju rezultata i razlike u porastu tjelesne mase tijekom subkroničnog perioda trajanja obrade (28 dana) ne uočava se protutoksični učinak kvercetina. Naprotiv, najveći gubitak tjelesne mase tijekom perioda obrade, iako bez statistički značajnog odstupanja usporedno s HC i ostalim skupinama, zapažen je kod ispitne skupine AD + Qu₂₅ i AD + Qu₅₀.

Brojna istraživanja na animalnim modelima imaju oprečne rezultate što se tiče gubitka tjelesne mase nakon oralne primjene Al (229-231). Znatno veći broj istraživanja proveden *ip* primjenom Al na animalnom modelu temelji se na njegovom neurotoksičnom učinku (232-234), stoga nemamo literaturni podatak o promjenama tjelesne mase nakon *ip* primjene Al. Ipak, iz literature je poznato da simptomi trovanja teškim metalom ovise o vrsti i dozi akumuliranog metala. Uobičajeni simptomi trovanja Al mogu uključivati probavne (projev, kolike), bubrežne i neurološke simptome poput glavobolje, razdražljivosti, psihoze, stupora, kome i konvulzija (235). Kod ispitne skupine AD, AD + Qu₂₅ i AD + Qu₅₀ četvrti dan po početku obrade zapažena je stolica mekše konzistencije (zadržala se do kraja obrade), što usporedno s ostalim skupinama (HC, Qu₂₅ i Qu₅₀) koje su imale dobro formiranu stolicu (čvrste konzistencije) upućuje na slabiju apsorpciju vode i hranjivih sastojaka u probavnom putu te promjene u sadržaju crijevne mikrobiote. Stoga, gubitak tjelesne mase u skupina obrađenih s AlCl₃ je očekivan. Nadalje, dosadašnja *in vivo* istraživanja iz područja Al toksičnosti potvrdila su kelirajuća, protuoksidacijska, protuupalna i protutoksična svojstva kvercetina (236-245). Međutim, očekivani protektivni učinak Qu u vidu sprječavanja gubitka tjelesne mase kod ispitane skupine AD + Qu₂₅ i AD + Qu₅₀ nije utvrđen. Između ostalog Qu se smatra i ergogenim dodatkom prehrani (242, 246, 247) i istražen je njegov utjecaj na redukciju adipoznosti (248) Međutim rezultati mnogobrojnih istraživanja o utjecaju Qu na tjelesnu masu su različiti. Tako rezultati pojedinih Qu istraživanja pokazuju redukciju tjelesne mase kod adipoznih štakora (249, 250), dok u istraživanju na mršavim štakorima nije zabilježen porast u tjelesnoj masi (251-253). Nadalje, Qu može djelovati na lipogenezu indirektno preko inzulina i direktno preko ekspresije gena, sudjelujući u redukciji triglicerida u adipocitima te redukciji broja adipocita. Tako, dugoročno uzimanje Qu snižava tjelesnu težinu, nakupljanje masti u jetri, poboljšava hiperglikemiju, hiperinzulinemiju, dislipidemiju. Njegova djelotvornost potvrđena je na brojnim animalnim modelima dijabetesa i pretilosti kao i u smanjenju posljedica dijabetesa i dijabetesu pridruženih bolesti u ljudi i životinja. *In vitro* istraživanja i istraživanja na miševima

s dijabetesom su pokazale da poboljšava razinu glukoze u krvi reducirajući apsorpciju, štiti gušteraču od oksidacijskog stresa induciranog H₂O₂ i poboljšava osjetljivost na inzulin (253).

Čini se da su toksičnost AlCl₃ zajedno s Qu i njegovim utjecajem na lipogenezu i adipocite (254) ključni u redukciji tjelesne težine u našem istraživanju (**Slika 24**). Osim navedenog promjena mikrobne populacije mogu voditi disbozi i crijevnoj propusnosti, te posljedično proupalne komponente bakterija mogu voditi kroničnoj upali epitela. Nazočnost upale prisutnošću Al i redukcija komenzalnih bakterija, posebice *Firmicutes* i *Bacteroidetes* te povećane razine *Proteobacteria* i *Actinobacteria* poznato je da mogu voditi smanjenju količine kratkolančanih masnih kiselina koje imaju zaštitinički učinak (inhibiraju upalne citokine, povećavaju produkciju mucina i antimikrobnih peptida te pružaju energiju kolonocitima).

5.2. Praćenje učinka subkronične primjene AlCl₃ + D-gal i Qu na razvoj crijevne disbioze

Mikrobiota ljudskog probavnog sustava je najveći rezervoar mikroba u ljudima, a sadrži otprilike 10¹⁴ mikroorganizama iz najmanje 1000 različitih mikrobnih vrsta koje se razlikuju u raznolikosti i stabilnosti među pojedincima te nadbrojavaju stanice domaćina u omjeru 100 000:1. Gustoća bakterija u ljudskom crijevu iznosi i do 10¹² po mL, što je najveća gustoća u bilo kojem poznatom mikrobnom ekosustavu (255, 256). Procjenjuje se da ljudski mikrobiom kodira približno 4 × 10⁶ gena, što ukupno nadbrojava 26 600 ljudskih gena za oko 150:1 (257-259). Zbog trenutačnih ograničenja uzgoja mikroorganizama iz crijevnih uzoraka, točan sastav mikrobiote crijeva nije u potpunosti poznat. Međutim, *Bacteroidetes* i *Firmicutes* su dva dominantna koljena crijevne mikrobiote (255, 260). Crijevna mikrobiota potrebna je za različite funkcije za koje se zna da blagotvorno djeluju na zdravlje domaćina, uključujući održavanje cjelovitosti crijevne barijere, inhibiciju adhezije patogena na crijevnim površinama, sintezu vitamina K i B (B1, B2, B3, B6, B12), spašavanje energije iz neiskorištene hrane proizvodnjom kratkolančanih masnih kiselina (SCFA), regulacija i pravilno sazrijevanje imunskog sustava (260, 261).

Os mikrobiota - crijeva - mozak (GBA) je dvosmjerni komunikacijski sustav koji je povezan neuronskim, imunskim, endokrinim i metaboličkim putovima (262-265). Najnovija istraživanja pokazuju da mikrobiota crijeva igra ključnu ulogu u modulaciji funkcija crijeva i

mozga (265-268). Disbioza (neravnoteža) i promjene u sastavu crijevne mikrobiote doprinose razvoju i napredovanju mnogih bolesti kod ljudi, uključujući upalnu bolest crijeva (269, 270), dijabetes melitus tipa 2 (271, 272), pretilost (273, 274) kardiovaskularne bolesti (275, 276), autizam (271-278), depresija (279, 280), Parkinsonovu bolest (281-283) i multiple sklerozu (284, 285). Nakupljanje dokaza također podržava moguću vezu između mikrobiote crijeva i Alzheimerova bolest (AD).

Temeljeno na prethodnim istraživanjima primjena funkcionalne prehrane bogate flavonoidima predstavlja alternativni pristup ublažavanju i/ili otklanjanju čimbenika rizika, a kvercetin je samo jedna od karika u lancu (286-289).

U ovome istraživanju promjene vezane uz disbiozu crijevne mikrobiote utvrđene su određivanjem pH vrijednosti, mjerenjem glikolitičke aktivnosti mikrobnih enzima, izolacijom probiotičkih sojeva na krutim i selektivnim podlogama (identifikacije pomoću API testova), 16S rRNA metagenomskom analizom crijevne zajednice i određivanjem koncentracije zonulina. Ispitivanja su provedena na sadržaju izoliranom iz crijevnog kolona AD, AD + Qu₂₅, AD + Qu₅₀, Qu₂₅ i Qu₅₀ ispitne skupine.

5.2.1. Učinak subkronične primjene AlCl₃ + D-gal i Qu na pH vrijednosti crijevnog sadržaja kolona

Izvor vodikovih iona u probavnom sustavu su sekrecijske parijetalne stanice želuca. Izlučivanje kontroliraju neuralni (*n. vagus*) i hormonalni (želučani) mehanizmi povratne sprege. Dosadašnja istraživanja utvrdila su da kada kiseli sadržaj želuca dosegne duodenum stimulira se lučenje alkalne tekućine iz gušterače bogate bikarbonatnim anionima (pH 8). Ova tekućina, zajedno s žuči i alkalnim tekućinama, izlučenim sluznicom tankog crijeva, neutralizira kiseli sadržaj koji dopire do duodenuma (260, 290). Daljnja mjerenja luminalnog pH u normalnom probavnom sustavu ljudi pokazala su progresivno povećanje pH od duodenuma do terminalnog ileuma, smanjenje u slijepome crijevu i zatim polagani porast duž debelog crijeva (kolon) do rektuma (261). Aktivnost crijevne mikrobiote ima velik utjecaj na ekosustav probavnog sustava. Na primjer, kao rezultat proizvodnje kiselih metabolita mikrobiote, pH sadržaj slijepog crijeva i debelog crijeva je općenito niži u konvencionalnom soju usporedno s „germfree“ sojem štakora (291). Te aktivnosti mogu posredno utjecati na metabolizam hranjivih tvari ili na

raspoloživost oralno primijenjenih ksenobiotika što je dokazano na štakorskom i humanom modelu (292, 293). Temeljem navedenog, pH vrijednost i koncentracija kisika ključan je čimbenik koji određuje zastupljenost dominantnih mikrobnih rodova u crijevu. Tako, primjerice optimalan pH za rast bifidobakterija je 6,0-7,0, a prestaju rasti pri pH 4,5-5,0 i nižim ili pri pH 8,0-8,5 ili iznad. Nasuprot tome, povećanjem koncentracije kratkolančanih masnih kiselina (SCFA) i razgradnjom ugljikohidrata snižava se pH vrijednost u lumenu crijeva, vodeći stvaranju nepovoljnih uvjeta za kolonizaciju patogenih bakterija potičući diferencijaciju i proliferaciju epitelnih stanica debelog crijeva. Niža pH vrijednost u lumenu crijeva smanjuje sekreciju i žučnih kiselina i aktivnost specifičnih proteolitičkih enzima.

U ovome istraživanju određivanjem pH vrijednosti crijevnog sadržaja kolona unutar ispitnih skupina (**Slika 25**) vidljiva je razlika između HC skupine i ostalih skupina u vidu snižene ili povišene pH vrijednosti (raspon pH = 7,1-7,5 mmol/dm³). Najveće odstupanje u odnosu na ostale skupine pokazuje skupina AD + Qu₅₀, čija je pH vrijednost statistički značajno veća u odnosu na AD skupinu ($P = 0,028$). Isto tako statistički značajna razlika ($P = 0,017$) zabilježena je kod skupine AD + Qu₂₅, gdje je pH crijevnog sadržaja niži nego kod AD + Qu₅₀ skupine. Iz navedenih rezultata možemo zaključiti kako ispitni uzorci imaju statistički značajan utjecaja na promjene pH vrijednosti kod skupine AD i AD + Qu₂₅, međutim pH vrijednosti kod svih obrađenih skupina su unutar fiziološkog (neutralnog) raspona koji je zabilježen u lumenu crijeva čovjeka (292).

Komparativnom usporedbom pH vrijednosti u različitim područjima probavnog sustava štakora i ljudi utvrđena je varijabilnost vrijednosti. Tako pH u želucu štakora ima raspon 3,3-5,5 vs 1,5-3,5 kod čovjek, u tankome crijevu štakora 6,5-7,1 vs 5-7 čovjek i u debelom crijevu štakora 6,6 vs 5-7,0 čovjek (292). Iz dosadašnjih istraživanja poznato je da luminalni pH u debelom crijevu utječe na proizvodnju mukoznih bikarbonata i laktata, bakterijsku fermentaciju ugljikohidrata i mukoznu apsorpciju SCFA, i eventualno crijevnu peristaltiku. Promjene u tim čimbenicima moguće je objasniti kao rezultat bolesti sluznice, promjene u prehrani i primjene (ne)farmakoloških dodataka.

5.2.2. Učinak subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na glikolitičku aktivnost enzima crijevne mikrobiote u uzorku izoliranom iz kolona

Iako su bakteriološka ispitivanja (npr. identifikacija odabranih skupina) korisna u opisivanju osnovne ekologije crijeva, manje su vrijedna u istraživanjima metabolizma i prehrane. Alternativni pristup je upotreba biokemijskih ispitivanja koja mjere funkcionalnu aktivnost mikrobiote u cjelini. Uz to, odabirom aktivnosti mikrobnih enzima ili metaboličkih krajnjih točaka koje rezultiraju spojevima s potencijalno toksičnim ili korisnim učincima, mogu se procijeniti vjerojatne zdravstvene posljedice za domaćina (293).

Mikroorganizmi u probavnom sustavu se natječu za izvore ugljika u obliku jednostavnih i složenih ugljikohidrata i pokazalo se da djeluju sinergijski na obradu dijetalnih vlakana koja domaćin ne može razgraditi (294, 295). Mikrobno iskorištavanje ugljikohidrata igra ključnu ulogu u raznolikosti, obilju i metaboličkoj aktivnosti komenzalnih i potencijalno patogenih bakterija u crijevima sisavaca (296, 297). Kao što su istraživanja pokazala, mogućnost pristupa energiji prisutnoj u oligosaharidima pruža konkurentsku prednost za pripadnike koljena *Bacteroidetes* koji čuvaju lokus za iskorištavanje polisaharida (engl. *polysaccharide-utilization loci*, PULs), koji kodira brojne enzime koji kataboliziraju niz složenih ugljikohidrata (297-303). To dovodi do pitanja kako se ostali članovi mikrobiote, kojima nedostaje PUL, mogli natjecati za energiju unutar probavnog sustava. GUS operon, koji je prvi put opisan prije više od 30 godina u *Escherichia coli*, daje potencijalni odgovor na ovo pitanje (304-308). Ovaj operon kodira proteine koji su uključeni u obradu glukuronidiranih liganda, uključujući β -glukuronidazu (GUS). GUS enzimi su glikozilne hidrolaze koje uklanjaju šećere glukuronske kiseline (GlcA) povezane s endobiotskim i ksenobiotskim spojevima pomoću faze II metabolizma UDP-glukuronosiltransferaze (UGT) u zaštitnim tkivima domaćina (npr. jetri i crijevima) (309-314). Širok spektar kemikalija konjugiran je na GlcA, uključujući hormone, neuroprijenosnike, zagađivače okoliša i lijekove poput kemoterapeutika, imunosupresiva i nesteroidnih protuupalnih lijekova (NSAID) (315-318). Mikrobna GUS-reaktivacija ovih spojeva u crijevima može igrati ulogu u njihovom izlaganju u serumu enterohepatičkom recirkulacijom (319-322). Ovaj put također uzrokuje crijevna oštećenja i ograničava dozu toksičnosti kemoterapeutika i nekoliko NSAID-a (323-325). Slični operoni su otkriveni i drugim vrstama porodice *Enterobacteriaceae* uključujući *Salmonella sp.*, *Klebsiella sp.*, *Yersinia sp.* i *Shigella sp.*, sve navedene vrste su potencijalni crijevni i sustavni patogeni.

β -glukuronidaza (glukuronohidrolaza β -D-glukuronida) hidrolizira β -D-glukuronide u glukuronsku kiselinu i aglikon koji mogu imati oblik alkohola, ostatka organske kiseline, amina, imina ili tiolnog spoja (326). Stvaranje glukuronida katalizira UDP-glukuroniltransferaza. Iz jetre, gdje se odvija njihova sinteza, djelomično se uklanjaju s žuči u duodenum. Tamo su pod utjecajem bakterijske β -glukuronidaze podvrgnuti hidrolizi na aglikone (327, 328). U bolesnika sa dijagnosticiranim tumorom debelog crijeva opažena je visoka aktivnost β -glukuronidaza, što upućuje da ovaj enzim igra važnu ulogu u promociji tumora debelog crijeva (329). Među crijevnom mikrobitom najveću aktivnost β -glukuronidaze pokazuju *Escherichia coli*, *Clostridium paraputrificum*, *Clostridium clostridioforme*, *Clostridium perfringens*, *Bacteroides fragillis*, *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides uniformie*, *Ruminococcus gnavus* i vrste koje pripadaju rodovima *Peptostreptococcus*, *Staphylococcus* i *Eubacterium* (328, 330).

β -glukozidaza (β -D-glukozid glukohidrolaza, amigdalaza) hidrolizira glikozide u šećerne skupine, tj. glikone, i na skupine bez šećera, tj. na aglikone (331). Dijeta koja se sastoji od velike količine glikozida biljnog podrijetla (npr. flavonoidi) može biti razlog za stvaranje štetnih tvari u debelom crijevu. Glikozidi koji nisu probavljeni prenose se u debelo crijevo gdje se hidroliziraju pod utjecajem bakterijske β -glukozidaze. Tako nastali aglikoni često pokazuju toksična i kancerogena svojstva, npr. Qu koji je jedan od promotora tumora debelog crijeva i nastaje u procesu transformacije rutina koji uključuje β -glukozidazu (332). Ovaj enzim prisutan je u stanicama nekih mikroorganizama koji se nalaze u debelom crijevu, a najveću aktivnost pokazuje kod *Bacteroides uniformis*, *Clostridium paraputrificum*, *Clostridium clostridioforme* i *Enterococcus faecalis* (330, 332). Kvalitativni i kvantitativni sastav crijevne mikrobiote u zdravih ljudi sadrži dominantan broj mikroorganizama povoljnih za njihovo zdravlje i relativno je uravnotežen. Dominacija nekih vrsta crijevnih bakterija i porast aktivnosti takozvanih fekalnih enzima može dovesti do povećane proizvodnje kancerogenih, toksičnih i proupalnih spojeva (326).

β -galaktozidaza iz *Escherichie coli* hidrolizira laktozu i druge β -galaktozide u monosaharide. Enzim je genski produkt *lacZ* operona i kao takav ima jedinstveno mjesto u povijesti molekularne biologije (333). Funkcionalni oblik β -galaktozidaze je tetramer građen od četiri identične podjedinice (334), sastavljene od 1023 aminokiselinskih ostataka (335, 336). Tetramer (~Mr = 465 412 Da) sadrži četiri katalitička mjesta koja ne pokazuju kooperativnost ili alosterične učinke. β -galaktozidaza ima tri enzimska djelovanja što u konačnici rezultira potpunim razgradnjom disaharid laktoze u galaktozu i glukozu. Prvo, može cijepati disaharid

laktozu da bi tvorio glukozu i galaktozu, koji mogu ući u glikolizu. Drugo, enzim može katalizirati transgalaktozilaciju laktoze u alolaktozu, i treće, alolaktoza se može odcijepiti do monosaharida. Alolaktoza se veže na *lacZ* represija i stvara petlju pozitivne povratne informacije koja regulira količinu β -galaktozidaze u stanici (333). Adultna intolerancija laktoze (adultna hipolaktazija) najčešći je uzrok maldigestije i malapsorpcije laktoze (337, 338). Tipični simptomi intolerancije na laktozu su proljev, natečenost, bol u trbuhu, mučnina i povraćanje. Njihova pojava je rezultat bakterijske fermentacije neprobavljene laktoze djelovanjem crijevnih bakterija *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* i *Streptococcus*, koje imaju enzim β -galaktozidazu (333). Sekundarna malapsorpcija i netolerancija laktoze uzrokovana je upalnim oštećenjem sluznice tankog crijeva (Chronovu bolest).

U ovome istraživanju utvrđena je niža aktivnost enzima β -glukuronidaze, β -glukozidaze i β -galaktozidaze kod skupine AD i AD + Qu₅₀ sa statistički značajnim odstupanjem u odnosu na HC i ostale ispitne skupine (**Slika 26**). Smanjena aktivnost β -glukuronidaze (**Slika 26A**) značajna je kod skupine AD u odnosu na HC ($P = 0,005$) i Qu₅₀ ($P = 0,004$) te kod skupine AD + Qu₅₀ u odnosu na HC ($P = 0,003$) i Qu₅₀ ($P = 0,002$). Smanjena aktivnost β -glukozidaze (**Slika 26B**) značajna je kod skupine AD u odnosu na HC ($P = 0,03$) i Qu₅₀ ($P = 0,002$) te kod skupine AD + Qu₅₀ u odnosu na skupinu Qu₅₀ ($P = 0,018$). Smanjena aktivnost β -galaktozidaze (**Slika 26C**) značajna je kod skupine AD u odnosu na HC ($P = 0,0004$) i Qu₅₀ ($P = 0,0007$) te kod skupine AD + Qu₅₀ u odnosu na HC ($P = 0,03$).

Iz rezultata zaključujemo da primjena Qu kod skupina Qu₂₅ i Qu₅₀ nije utjecala na enzimsku aktivnost β -glukuronidaze, β -glukozidaze i β -galaktozidaze te nisu zabilježena statistički značajna odstupanja u odnosu na HC skupinu. Statistički značajno snižena aktivnost enzima zabilježena je samo kod dvije skupine obrađene AlCl₃ i D-gal, AD i AD + Qu₅₀. Što dovodi u centar pažnje skupinu AD + Qu₂₅. Kod ove skupine nisu zabilježena statistički značajna odstupanja usporedno niti s jednom skupinom. Međutim, zanimljivo je da je enzimska aktivnost β -glukuronidaze, β -glukozidaze i β -galaktozidaze kod skupine AD + Qu₂₅ upola niža nego kod skupina HC, Qu₂₅ i Qu₅₀ te duplo viša nego kod skupina AD i AD + Qu₅₀. Što upućuje na snažnu supresiju svih enzimskih aktivnosti uzrokovanih AlCl₃ te protektivni učinak niže doze Qu (25 mg/kg).

Rezultati dobiveni u ovome istraživanju kontradiktorni su rezultatima prikazanim u dosadašnjim istraživanjima. Macfarlane i Cummings su još 1991. (339) zaključili da se povećanje aktivnosti β -galaktozidaze i α -glukozidaze i smanjenje β -glukuronidaze može se smatrati korisnim za domaćina. Aktivnosti β -galaktozidaze i α -glukozidaze mogu poboljšati

fermentaciju rezistentnog škroba i laktoze što dovodi do SCFA i mliječne kiseline koji su izvor energije za tkiva, dok dostupne glukuronidaze sudjeluju u stvaranju toksičnih i kancerogenih metabolita u crijevu (340, 286). Međutim, povećanje aktivnosti β -glukozidaze je dvosmislena jer njena hidrolatna aktivnost je odgovorna i za stvaranje toksina (341), kao i za proizvodnju bakterijskih derivata glukozida za koje se pretpostavlja da su odgovorni za zaštitu od kemijski induciranoog karcinoma (342).

Mehanizmi koji bi mogli utjecati na glikolitičku aktivnost bakterija su promjene u obrascu mikrobne populacije ili modifikacije crijevnoga medija (pH). Juśkiewicz i Zenon (343) u svome istraživanju utvrđuju da velika količina laktoze i drugih neprobavljivih oligosaharida uzrokuje proljev u animalnom modelu štakora. Proljev snižava koncentracije enzimskih proteina i SCFA u cekumu te aktivnost bakterijske β -glukuronidaze, α - i β -galaktozidaze, α - i β -glukozidaze u probavnom sustavu, u usporedbi s štakorima bez proljeva (343). Na temelju navedenog možemo zaključiti da je u našem istraživanju snižena enzimska aktivnost najvjerojatnije posljedica maladigestije i malapsorpcija, što je uzrokovalo nemogućnost formiranja stolice normalne konzistencije i gubitak tjelesne mase tijekom perioda obrade kod skupine AD, AD + Qu₂₅ i AD + Qu₅₀. Nadalje, kod prethodno prikazanih rezultata pH vrijednosti crijevnoga sadržaja nalazimo korelaciju kod skupine AD gdje je statistički značajno niža vrijednost pH i aktivnosti enzima u odnosu na HC skupinu. Međutim, promjena pH vrijednosti kod AD skupine i dalje nije dovoljna kako bi se objasnile promjene u enzimskoj aktivnosti.

5.2.3. Učinak subkronične primjene AlCl₃ + D-gal i Qu na rast probiotičkih kolonija na selektivnim podlogama i identifikacija roda Lactobacillus

Mikrobna kolonizacija započinje odmah nakon rođenja s fakultativnim anaerobima, kao što su laktobacili, enterokoki i enterobakterije, koji su prvi kolonizatori. Slijedi kolonizacija anaerobnim mikroorganizmima, uključujući *Bifidobacterium*, *Bacteroides* i *Clostridium*, što rezultira postupnim smanjivanjem odnosa fakultativnih anaeroba i strogih anaeroba tijekom vremena (344). Bifidobakterije su zajedno s laktobacilima važan dio normalne crijevne mikrobiote različitih vrsta sisavaca, a također su najbolje karakterizirani i široko komercijalizirani probiotici. Laktobacili i bifidobakterije su bakterije koje stvaraju gram, pozitivne, mliječno kiseline koje ne tvore spore, LAPB (engl. *lactic acid producing bacteria*)

(345). Laktobacili imaju ograničene biosintetske sposobnosti i fermentiraju rafinirane šećere, stvarajući mliječnu kiselinu kao glavni krajnji proizvod (346), dok su bifidobakterije važan proizvođač kratkih lanaca masnih kiselina (SCFA) (347). Unatoč nekim uobičajenim svojstvima, laktobacili i bifidobakterije pripadaju dvije taksonomsko različite skupine: rod *Lactobacillus* koljenu *Firmicutes* i rod *Bifidobacterium* koljenu *Actinobacteria*. U odraslih osoba *Firmicutes* i *Bacteroidetes* koljena obično dominiraju, dok su *Actinobacteria*, *Proteobacteria* i *Verrucomicrobia* znatno omanje prisutni u mikrobioti crijeva (348).

Iako nisu najdominantniji u odrasloj dobi, laktobacili i bifidobakterije ostaju stabilna populacija normalne crijevne mikrobiote, održavajući važne funkcije tijekom života, a njihova je disbioza povezana s mnoštvom patoloških stanja (349). Provedene su brojna istraživanja s različitim sojevima *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* *in vitro* i *in vivo*, na ljudima i životinjama kako bi se istražila njihova imunomodulatorna svojstva i probiotski potencijal u liječenju različitih zaraznih, alergijskih i upalnih stanja (350, 346, 347, 351). Iako nisu uvijek uvjerljivi, većina njih naglasila je korisne učinke ovih probiotičkih bakterija koje su ponekad i specifične za vrstu domaćina te ovisne o udjelu patogenih bakterija u crijevnoj mikrobioti.

U ovome istraživanju rezultati dobiveni metodom brojanja kolonija (engl. *colony-forming unit*, CFU) naraslih na selektivnim podlogama za bakterijske rodove *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* su prikazani na **Slici 27**. Ova metoda je pokazala značajne razlike u broju kolonija koje su stvorile bakterije rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* u skupine AD u odnosu na ostale skupine. Statistički značajne vrijednosti prisutne su kod roda *Bifidobacterium* (**Slika 27A**) gdje je CFU/g smanjen kod skupine AD u odnosu na HC i AD + Qu₅₀ ($P < 0,05$) te kod roda *Lactobacillus* (**Slika 27B**) gdje je CFU/g smanjen kod skupine AD u odnosu na HC ($P < 0,05$) i Qu₂₅ ($P < 0,001$). Iz rezultata zaključujemo da AlCl₃ ima inhibicijski utjecaj na oba probiotička roda. Nadalje, na osnovu statistički značajno nepromijenjenog broja kolonija, kod skupine AD + Qu₂₅, AD + Qu₅₀, Qu₂₅ i Qu₅₀ usporedno s HC skupinom, ispitne doze Qu imaju protektivni učinak. Međutim obzirom na različit udio zatupljenosti rodova u probavnom sustavu domaćina kontradiktoran je iznimno velik broj kolonija roda *Bifidobacterium* što upućuje na nedovoljnu selektivnost korištene podloge (TOSagar, Merck). Stoga ove rezultate ne možemo uzeti u daljnje razmatranje.

Prema rezultatima API testova sa selektivnih podloga za bakterije roda *Lactobacillus* identificirane su dominantne vrste: *L. brevis* (63,3%), *L. plantarum* (25,4%) i *Lactococcus lactis ssp. lactis* (10,2%) kod HC skupine; *L. plantarum* (97,1%) kod AD skupine; *Lactococcus lactis ssp. lactis* (51%), *L. brevis* (31,9%) i *L. plantarum* (15,6%) kod skupine AD + Qu₂₅; *L.*

brevis (81,3%), *L. plantarum* (10,8%) i *Lactococcus lacti ssp. lacti* (7,6%) kod skupine AD + Qu₅₀; *L. brevis* (63,3%), *L. plantarum* (25,4%) i *Lactococcus lactis ssp. lactis* (10,2%) kod skupine Qu₂₅; *L. plantarum* (98,4%) kod skupine Qu₅₀. Na temelju ovih rezultata iz našega istraživanja vidljivo je da obzirom na obradu postoji i promjena u udjelu pojedine vrste unutar roda *Lactobacillus*. Mehanizmi koji ublažuju toksičnost teških metala i odnos probiotika i zaštite barijere crijeva u procesu patogeneze teških metala slabo su poznati, kao i same promjene unutar crijevne mikrobiote na razini roda *Lactobacillus*.

Većina laktobacila prisutnih u probavnom sustavu štakora i miševa su autohtoni jer čine stabilnu populaciju tijekom života domaćina (352, 353). Sojevi laktobacila imaju zaštitne učinke protiv teških metala, istovremeno smanjujući oksidacijski stres i modulirajući imunski odgovor (354-356). Rezultati qRT-PCR pokazuju da *L. brevis* 23017 održava normalnu mukoznu barijeru modulacijom proteina čvrstog spoja (357). Ono što je važno, ovo *in vivo* istraživanje na animalnom modelu pokazuje da *L. brevis* 23017 učinkovito ublažava ozljede tankog crijeva smanjujući upalu crijeva i ublažava oksidacijski stres. Nadalje, *L. brevis* 23017 blokira oksidacijski i stres i upalu kroz MAPK i NF-κB putove (357).

L. plantarum se susreće u mnogim prehrambenim proizvodima i prirodni je stanovnik ljudskog probavnog sustava (358). Također se prodaje kao probiotik (359-360). *L. plantarum* WCFS1 izvorno je izoliran iz ljudske sline (366). Jedna od njegovih karakteristika je sposobnost fermentacije velikog broja ugljikohidrata, poput monosaharida (glukoza, manozna i galaktoza), disaharida (saharoza, laktoza i trehaloza) i oligosaharida (rafinoza i melelitoza) (361). Pokazano je i da preživljava prolazak kroz želudac, a ostaje aktivan i otporan dulje od 6 dana u ljudskom probavnom sustavu bez kolonizacije crijeva (362). Ispitana je genetska osnova ove otpornosti, a rezultati su pokazali da je induciran niz gena kodiranih funkcija povezanih s metabolizmom šećera *in situ* u probavnom sustavu (363).

Lactococcus lactis je nepatogena gram-pozitivna bakterija koja je usko povezana s rodnom *Streptococcus*. *L. lactis* u prirodi zauzima nišu koja se odnosi na biljne ili životinjske površine i životinjski probavni sustav. Smatra se da se na biljnim površinama nalazi u dormatnom stanju, i da se razmnožava u probavnom sustavu nakon što ga proguta preživač. Ima homofermentativni metabolizam, što znači da proizvodi mliječnu kiselinu iz šećera. Također se navodi da proizvode ekskluzivnu L - (+) - mliječnu kiselinu (364). Međutim, Åkerberg i sur. (365) izvjestili su da proizvodi i štetnu D - (-) - mliječnu kiselinu pri niskom pH. Koristeći flagelarnu salmonelu kao eksperimentalnu skupinu, Nakamurin tim (366) otkrio je da je proizvod fermentacije laktoze uzrok oštećenja pokretljivosti u salmoneli. Pretpostavlja se da *L.*

lactis uglavnom utječe na pokretljivost salmonele ometajući rotaciju flagela, ali ne i nepovratna oštećenja morfologije i fiziologije. Fermentacijom laktoze *L. lactis* proizvodi acetat koji smanjuje unutarstanični pH salmonela, što usporava rotaciju njihovih flagela (367). Ovi rezultati ističu potencijalnu uporabu *L. lactis* za sprječavanje infekcija više bakterijskih vrsta (368). Motiliteti sojeva *Pseudomonas*, *Vibrio* i *Leptospira* također su ozbiljno poremećeni upotrebom laktoze *L. lactis* (366).

5.2.4. Identifikacija sastava crijevnoga mikrobioma sekvenciranjem

16S rRNA sekvence intenzivno su korištene u razvrstavanju i identifikaciji bakterija i arheja. Usporedba gotovo kompletnih sljedova gena od 16S rRNA naširoko se koristi za uspostavljanje taksonomskih odnosa između prokariotskih sojeva, s 98,65% sličnosti koja je trenutno prepoznata kao granica za razgranične vrste (369). Usporedba sekvence gena 16S rRNA izolata s sekvencama tipova sojeva svih prokariotskih vrsta pruža precizan i prikladan način za rutinsku klasifikaciju i identifikaciju prokariota.

Na sastav ljudskog ekosustava crijeva utječu višestruki i različiti čimbenici, kao što su dob, podrijetlo, okoliš, prehrambene navike (uključujući prebiotike i probiotike) i primjena antibiotika. Na temelju 16S rRNA analize uzorka crijevnog sadržaja uzetog od različitih pojedinaca pokazalo se da, unatoč velikoj raznolikosti bakterijskih vrsta, većina (98% svih vrsta) pripada u samo četiri bakterijska koljena (*phyle*): *Firmicutes* (64%), *Bacteroidetes* (23%), *Proteobacteria* (8%) i *Actinobacteria* (3%), dok su druge manje taksonomske podjele prilično raznolike (360-372). Treba naglasiti da omjer između tih skupina snažno ovisi o lokaciji unutar crijeva i o etničkoj pripadnosti domaćina. *Firmicutes* i *Bacteroidetes* dominiraju u debelom crijevu, dok su u jejunumu *Proteobacteria* obilnije od *Bacteroidetes*. U ileumu odraslih Japanaca nisu otkriveni *Bacteroidetes*, dok dominiraju u mikrobioti zdravih švedskih žena (373-375). Sastav crijevne mikrobiote također može varirati u starijih osoba neovisno o prehrani zbog niza fizioloških i imunskih čimbenika, poput smanjene funkcionalnosti imunskog sustava. Mikrobiotu povezanu sa starijim pojedincima odlikuje smanjenje udjela *Ruminococcus* i *Blautia spp.* i nekoliko proizvođača butirata, dok je udio *Escherichia* povećan u usporedbi s mladim kontrolama (376). Omjer *Firmicutes* i *Bacteroidetes* (F/B) jedan je od parametara za koje se zna da se mijenjaju tijekom cijelog životnog vijeka. Omjer je niži u prvoj godini života (0,4), povećava se u odrasloj dobi (10,9), a smanjuje se tijekom starosti (0,6) (377). Ravnoteža između imunskog sustava domaćina i utjecaja crijevne mikrobiote ključna

je za održavanje zdravlja. Ako se ova ravnoteža poremeti (disbioza), odnos domaćin-mikrobi može napredovati prema bolesti (378, 379). Jasno je da su mikrobi prisutni u ljudskom crijevu neophodni za proces probave. Tijekom anaerobne fermentacije, njihov metabolizam uzrokuje raspad neprobavljivih spojeva poput otpornog škroba i biljnih polisaharida, što rezultira proizvodnjom SCFA. Drugi primjeri metabolizma specifičnog za mikrobe su sinteza vitamina i aminokiselina (378). Suprotno tome, neki spojevi prisutni u prehrani mogu modulirati mikrobiotski sastav (teški metali, toksini, polifenoli i sl.), rezultirajući promjenama u metaboličkoj aktivnosti crijevnih bakterija (380).

Mnoga istraživanja pokazuju potencijalne učinke polifenola na crijevne patogene. Međutim, postoji samo nekoliko istraživanja koja pokazuju utjecaj polifenola na sastav i aktivnost nepatogene mikrobne zajednice crijeva. Najmoćniji inhibitori rasta mikroorganizama su vjerojatno polifenolni spojevi iz zelenog i crnog čaja. Pokazano je da bioaktivne komponente čaja, koje uključuju epigalokatehin galat, epikatehin galat, epigalokatehin, galokatehin, epikatehin i katehin (381), mogu inhibirati rast mnogih patogena, uključujući *Helicobacter pylori* (382), *Staphylococcus aureus*, *E. coli* O157: H7 (383, 384), *Salmonella typhimurium* DT104, *Listeria monocytogenes*, bakterija *S. aureus* rezistentna na meticilin (385, 386), *Pseudomonas aeruginosa* (387), virus hepatitisa C (388), virus gripe (389), HIV (390-392), virus *Epstein-Barr* (388) i gljivice roda *Candida* (393). Razlike između djelovanja polifenola koji pripadaju istoj skupini (flavonoli ili flavanoni) vjerojatno ovisi o 4-karbonilnoj skupini u C prstenu kostura flavona. Rezultati Duda-Chodak (380) sugeriraju da je prisutnost ove skupine presudna za inhibicijsku aktivnost flavonola i flavanonskih aglikona. Pokazano je da flavonoidni aglikoni (u dozama 4-250 µg/mL), ali ne i njihovi glikozidi, mogu inhibirati rast nekih crijevnih bakterija. Pokazalo se da rutin (glikolizidni oblik kvercetina) nije imao inhibicijski utjecaj na analizirane crijevne bakterije, naprotiv uočen je blagi stimulacijski učinak na rast *Lactobacillus spp.* Suprotno tome, njegov aglikonski kvercetin djelovao je inhibirajuće ovisno o dozi (osim na *Bifidobacterium catenulatum*) posebno na rast *Ruminococcus gausvreauii*, *Bacteroides galacturonicus* i *Lactobacillus spp.* (u dozama 20–50 µg/mL). Anaerobne bakterije kao što su *Bacteroides distasonis*, *B. uniformis* i *B. ovatus* mogu otpustiti aglikon iz kvercetin glikozida zahvaljujući β-glukozidaznoj aktivnosti (394). Enterobakterije razgrađuju i kvercetin aglikon za proizvodnju svojih prstenastih proizvoda kao što su 3,4-dihidroksifenilacetaticid, m-hidroksifeniloctena kiselina i m-homovanijska kiselina (395). Aglikon se pretvara u svoj konjugirani metaboliti sa ili bez O-metilacije i zatim se prenosi u jetru putem portalne vene. Neki konjugirani metaboliti vjerojatno će se prenijeti u sustavnu

cirkulaciju putem limfe. Kvercetin glukuronidi su druga vrsta kvercetinovog metabolita u ljudi i njihova koncentracija u plazmi kao i biološka aktivnost ovisi o položaju konjugacije.

Flavonoli mogu također modulirati mikrobiotu crijeva utječući na adheziju bakterija na crijevnim stanicama, ali utjecaj *flavan-3-ola* na adheziju bakterija uvelike se razlikuje između spojeva, soja i stupnja diferencijacije crijevnih stanica (396). Svi testirani *flavan-3-oli* značajno inhibiraju adheziju *Lactobacillus acidophilus* LA-5 i *Lactobacillus plantarum* IFPL379, osim epigalokatehina galata, koji pojačava adheziju *L. acidophilus* LA-5 na stanice Caco-2 (293). Nadalje, pored djelovanja na pospješivanje rasta, flavonoidi imaju antibakterijska svojstva, koja između ostalog mogu biti posljedica poremećaja funkcije membrane ili inhibicije enzima. To može rezultirati u modulaciji mikrobiotskog sastava. Pretvorba flavonoida s bakteriostatskim ili baktericidnim učinkom u neaktivne metabolite može se smatrati sredstvom za detoksikaciju ovih ksenobiotika promičući opstanak i rast crijevnih bakterija koje su osjetljive na flavonoide. Crijevna mikrobiota opremljena je velikim nizom različitih enzima sposobnih za različite modifikacije sastojaka hrane koji ulaze u debelo crijevo. Može hidrolizirati glikozide, glukuronide, sulfate, amide, estere i laktone djelovanjem enzima kao što su: α -rnosnosidaza, β -glukuronidaza, β -glukozidaza, sulfataza i esteraza. Ostale reakcije katalizirane mikrobnim enzimima u crijevima su aromatično cijepanje prstena, redukcije (reduktaze, hidrogenaze), dekarboksilacija (dekarboksilaza), demetilacija (demetilaza), izomerizacija (izomeraza) i dehidroksilacija (dehidroksilaza). Primijećeno je da istodobna primjena flavonoida i klinički korištenih lijekova može uzrokovati međureakcije flavonoid-lijek. Takve međureakcije modulacijom farmakokinetike lijekova, može povećati njihovu toksičnost ili umanjiti njihov terapijski učinak, ovisno o strukturi flavonoida (397). Naringenin, glavni flavanon prisutan u soku grejpa, djeluje inhibitorno na crijevni CYP3A4 u roku od 30 min. To znači da je metabolizam određenih lijekova, poput onih koji pripadaju antagonistu kalcijevih kanala ili imunosupresivnih skupina (npr. felodipin, nitrendipin, nikardipin, amlodipin, nisoldipin, verapamil terfenadin, ciklosporin, midazolam, triazolam), oslabljen ako se istodobno primjenjuju s sokom od grejpa (398).

5.2.4.1. *Praćenje učinka subkronične primjene AlCl₃ + D-gal i Qu na promijene u crijevnom mikrobiomu na razini koljena*

Prema brojčanom udjelu glavna koljena crijevnih bakterija kod ljudi su *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* i *Fusobacteria* (399). *Firmicutes* su gram-pozitivne bakterije s niskim sadržajem GC parova (baze DNA), uključujući veliku klasu *Clostridia* i bakterije mliječne kiseline, dok su *Actinobacteria* gram-pozitivne bakterije s visokim sadržajem GC parova, uključujući *Colinsella* i *Bifidobacterium spp.* Bakterije mliječne kiseline i bifidobakterije dvije su važne autohtone vrste koje koloniziraju crijevo od rođenja ili bivaju umnožene unosom prebiotika (jedan od izvora su i polifenoli) i probiotika. *Lactobacillus* i *Leuconostoc spp.* su glavne bakterije mliječne kiseline koje se nalaze u ljudskom crijevu. *Bifidobacterium spp.* je prevladavajuća bakterija pronađena među prvim kolonizatorima novorođenčadi, a perzistira na niskoj razini kod odraslih (400). Crijevne bakterije igraju važnu ulogu u ljudskom zdravlju, doprinose obrambenom sustavu crijeva domaćina i pomažu u održavanju normalne funkcije crijeva, dok je njihov sastav pod utjecajem domaćina. U ovome istraživanju promjene varijabilnost crijevne mikrobiote u ovisnosti o provedenoj obradi prikazane su razini koljena (**Slika 28**), porodice (**Slika 29-33**) i probiotičkih vrsta (**Slika 31**).

Obzirom na provedenu obradu (**Slika 28**) identificirano je 8 koljena (*Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cynobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Saccharibacteria*, *Spirochaetae* i *Tenericutes*). Među njima ističu se dva dominantna koljena *Firmicutes* (59-66%) i *Bacteroidetes* (19,7-31,9%), i dva najosjetljivija *Spirochaetae* (0,3-1,6%) i *Actinobacteria* (0,6-1,5%). U rezultatima na razini koljena nisu zabilježene statistički značajne promjene unutar ispitnih skupina (HC, AD, AD + Qu₂₅, AD + Qu₅₀, Qu₂₅ i Qu₅₀). Usporedbom podataka ovoga istraživanja provedenog na štakorskom animalnom modelu uočavamo da se prema literaturnim navodima sastav crijevne mikrobiote ne razlikuje puno od ljudske. Kod obje vrste očita je prevlast dva koljena *Firmicutes* i *Bacteroidetes*. Razlike u prisustvu ostalih koljena moguće je opravdati načinom prehrane i morfologije probavnog sustava.

5.2.4.2. Praćenje učinka subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na promijene u crijevnom mikrobiomu na razini porodice

Daljnjom taksonomskom analizom unutar navedenih koljena identificirano je 27 porodica (**Slika 29**). Od toga dvije porodice do sada nisu izolirane u mikrobiološkim kulturama (engl. *uncultured bacterium*, UC) i ostale su neidentificirane te ovisno o obradi njihov udio je 0,1-1,6%. Jedna je nepoznata porodica (engl. *unknown family*, UF) čiji udio ovisno o obradi čini 1,8-12,1% crijevnih mikrobiota. Kako bi lakše utvrdili statistički značajne promjene ($P \leq 0,05$) unutar 27 porodica učinjena je raspodjela obzirom na udio bakterija u HC skupini (10-30%, 1-10% i 0,1-1%).

5.2.4.2.1. Praćenje učinka subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na dominantne porodice

Četiri dominantne porodice *Lactobacillaceae*, *Ruminococcaceae*, *Bacteroidales S24-7 group* i *Prevotellaceae* čine 10-30% crijevnih mikrobiota HC skupine (**Slika 30**). Kod porodice *Lactobacillaceae* značajno smanjenje u udjelu je zabilježeno kod skupine AD + Qu₂₅ u odnosu na Qu₅₀ ($P = 0,04$), kod AD + Qu₅₀ u odnosu na HC ($P = 0,01$), kod AD + Qu₅₀ u odnosu na Qu₂₅ ($P = 0,01$) i kod AD + Qu₅₀ u odnosu na Qu₅₀ ($P = 0,002$). Statistički značajno smanjenje u udjelu zabilježeno je kod porodice *Ruminococcaceae* kod skupine HC u odnosu na AD + Qu₂₅ ($P = 0,04$), kod AD u odnosu na Qu₅₀ ($P = 0,02$), kod Qu₅₀ u odnosu na AD + Qu₂₅ ($P = 0,04$) i kod Qu₅₀ u odnosu na AD + Qu₅₀ ($P = 0,02$). Porodica *Bacteroidales* obzirom na obradu nema statistički značajne promjene unutar obrađenih skupina ($P \geq 0,05$). Statistički značajno smanjenje u udjelu kod porodice *Prevotellaceae* prisutno je kod skupine AD + Qu₂₅ u odnosu na HC ($P = 0,01$) i AD + kod Qu₂₅ u odnosu na Qu₂₅ ($P = 0,01$).

Unutar četiri dominantne porodice učinci kvercetina su različiti. Kod porodice *Lactobacillaceae* vidljiv je inhibitorni učinak na bakterijske stanice kod skupine AD + Qu₂₅ i AD + Qu₅₀, u ovisnosti o dozi isti je izraženiji kod doze 50 mg/kg. Iz dostupne literature nije poznato koji su krajnji metaboliti kvercetina nakon *ip* primjene, ali zbog gubitak tjelesne mase, neformirane stolice i gubitka glikolitičke aktivnosti bakterija kod ove dvije skupine vjerujemo da je riječ o sinergijskom utjecaju $AlCl_3$ i Qu na inhibiciju adhezivne sposobnosti porodice

Lactobacillaceae (293). Za razliku od porodice *Lactobacillaceae* kod porodice *Ruminococcaceae* učinak je suprotan. Crijevne bakterija iz porodice *Ruminococcaceae* proizvode sekundarne žučne kiseline u crijevima koje imaju ulogu u regulaciji upale u crijevima, što ide u prilog protuupalnim svojstvima Qu. Na osnovu rezultata (Slika 30B/C) gubitak bakterija iz porodice *Lactobacillaceae* kompenziran je porastom u udjela porodice *Ruminococcaceae*. Unutar ostalih skupina AD, Qu₂₅ i Qu₅₀ nije došlo do gubitka u udjelu crijevne mikrobiote u odnosu na HC skupinu, što potvrđuje protutoksični učinak Qu na intoksikaciju AlCl₃. Kod pedijatrijskih pacijenata s upalnim bolestima crijeva (Crohnova bolest) uočena je povećana količina bakterijskih porodica *Enterobacteriaceae*, *Pasteurellaceae*, *Verrucomicrobiaceae* i *Fusobacteriaceae*, a smanjena količina *Erysipelotrichales*, *Bacteroidales* i *Clostridiales*, što je u korelaciji s razinom upale (401). Sukladno tome, statistički nepromijenjen udio porodice *Bacteroidales* u crijevnome mikrobiomu može biti indikator stabilnosti crijevne mikrobiote i epitela kao i nedostatka značajnog procesa upale. Prehrambeni sastojci sadržavaju supstrate koji tijekom fermentacije mogu rezultirati različitim produktima. Promjene u mikrobnj strukturi zbog prehrambenih modifikacija rezultat su sposobnosti određene bakterijske zajednice da bolje metabolizira ponuđene supstrate. Isti supstrat može se koristiti u više metaboličkih puteva, obzirom na tip bakterije koji kolonizira crijeva. Jedan od takvih primjera je laktat. Laktat se može transformirati u butirir ili u SCFA poput acetata, sukcinata i propionata tijekom anaerobne bakterijske fermentacije, ovisno o tipu mikrobiote (402). Kada imamo prisutne bakterijske rodove *Prevotella* i *Akkermansia* laktat se razgrađuje do butirata, koji doprinosi sintezi mukoze i sklapanju čvrstih međustaničnih veza (TJs). Kada su brojniji rodovi *Bacteroides* i *Veillonella*, laktat se razgrađuje do sukcinata, acetata i propionata. Ovi spojevi narušavaju sintezu mukoze i povećavaju propusnost crijevne barijere (401). Prema navedenom promjene na razini porodice *Prevotellaceae* upućuju na mogućnost postojanje crijevne propusnosti kod ispitnih skupina AD, AD + Qu₂₅, AD + Qu₅₀ i Qu₅₀ sa statističkom značajnošću prisutnom samo kod skupine AD + Qu₂₅ u odnosu na skupinu HC i Qu₂₅.

Daljnjom analizom unutar dvije probiotičke porodice *Lactobacillaceae* (7,4-30,33%) i *Bifidobacterium* (0-0,003%) očita je prevlast porodice *Lactobacillaceae* te je identificirano 15 vrsta unutar ove porodice. Bez statistički značajnog odstupanja ($P \geq 0,05$) vidljiva je raznolikost vrsta unutar porodice *Lactobacillaceae* uz očitu prevlast vrsta *Lactobacillus johnsonii* (2,4-10,1%), *Lactococcus lactis* (2,2-4,1%) i *Lactobacillus reuteri* (0,4-3,7%) ovisno o obradi. Ovi rezultati upućuju na nepouzdanost rezultat dobivenih izolacijom i brojanjem kolonija na selektivnim podlogama za probiotičke sojeve.

5.2.4.2.2. Praćenje učinka subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na porodice čiji udio u kontrolnoj skupini (HC) čini 1-10%

Uvidom u promjene unutar porodica koje čine 1-10% (**Slika 32**) uočava se osjetljivost (smanjenje zastupljenosti) porodice *Christensenellaceae* kod skupine AD + Qu₂₅ usporedno s AD + Qu₅₀ ($P = 0,02$) te porodice *Desulfovibrionaceae* kod skupine Qu₂₅ usporedno s AD + Qu₅₀ ($P = 0,012$).

Iz rezultat uočavamo osjetljivost crijevne mikrobiote na nepovoljno sinergijsko djelovanje $AlCl_3$ i Qu, kao i samoga Qu. Goodrich i sur. su 2014. (403) proveli istraživanje na 1081 fekalnih uzoraka od 977 ljudi (171 par identičnih blizanaca; 245 parova ne-identičnih blizanac; 145 individualnih blizanaca) te identificirali porodicu *Christensenellaceae* kao visoko nasljednu bakterijsku porodicu koja je češća kod osoba s niskom tjelesnom težinom. U našem istraživanju gubitak u udjelu crijevne mikrobiote kod porodice *Christensenellaceae* korelira s gubitkom tjelesne mase kod skupine AD + Qu₂₅. Svi članovi porodice *Desulfovibrionaceae* su strogo anaerobni, imaju respiratorni tip ili fermentativni tip metabolizma, i svi nepotpuno oksidiraju organske supstrate u acetat (404) što upućuje na postojanje crijevne propusnosti kod skupine AD + Qu₅₀.

5.2.4.2.3. Praćenje učinka subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na porodice čiji udio u kontrolnoj skupini (HC) čini 0,1-1%

Unutar porodica čiji udio u HC skupini čini 0,1-1% (**Slika 33**) identificirano je 15 porodica (*Bifidobacteriaceae*, *Coriobacteriaceae*, *Rikenellaceae*, *Streptococcaceae*, *Peptococcaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Veillonellaceae*, *Rhodospirillaceae*, *Alcaligenaceae*, *Helicobacteraceae*, *Spirochetaceae*, *Porphyromanadaceae*, *Acidaminococcaceae*) što upućuje na visoku varijabilnost i osjetljivost cijevne mikrobite unutar porodica s najmanjom zastupljenošću. Kod pojedinih porodica vidljiv je porast usporedno s HC skupinom sa statističkom značajnošću ($P \leq 0,01$): *Bifidobacteriaceae* (AD i AD + Qu₅₀), *Streptococcaceae* (Qu₅₀), *Peptostreptococcaceae* (AD). Porodice *Porphyromanadaceae* i *Acidaminococcaceae* bilježe manji udio u mikrobiomu ($P \leq 0,01$) kod skupine AD + Qu₂₅ usporedno s HC skupinom.

Bifidobacteriaceae i *Streptococcaceae* su predstavnici komezalnih bakterija. Porodica *Bifidobacteriaceae* kod ispitne skupine AD i AD + Qu₅₀ zauzima nišu porodice *Lactobacillaceae* čime se umanjuje mogućnost kolonizacije patogenim sojevima. Porodica *Peptostreptococcaceae* je pripadnik reda *Clostridiales*, uključuju mezofilne, psihrotolerantne i umjerene termofilne vrste (405). Svi sojevi rastu pri pH blizu 7,0. *Peptostreptococcus spp.* stvaraju vrlo visoku koncentraciju amonijaka, ali nisu u stanju hidrolizirati netaknute proteine i ne koriste ugljikohidrate, zauzimaju nišu razgradnje peptida i aminokiselina te ovise o proteolitičkim bakterijama (406). U kliničkim analizama su izolirani različiti sojevi koji se povezuju s fiziološkim i patološkim stanjima domaćina (infekcije oralne regije, uro-vaginalnog sustava i ulceroznih rana, različiti apscesi gingive i potkožja, pojava proljeva uzrokovanog *Clostridioides difficile*). U skladu s navedenim, kod skupine AD tijekom perioda obrade zabilježen je gubitak tjelesne mase usporednu s HC skupinom, ali bez statističke značajnosti, kao i nepotpuno formirana stolica. Nadalje, odsustvo porodice *Porphyromanadaceae* (koljeno *Bacteroidetes*) povezuje se isto s *Clostridioides difficile* infekcijom i pojavom proljeva (407), što korelira s gubitkom tjelesne mase i prisutnošću neformirane stolice kod skupine AD + Qu₂₅. U drugim uvjetima, prisutnost *Alcaligenaceae* i *Porphyromanadaceae* u bolesnika s cirozom jetre i prisutnom depresijom i agitiranim stanjem upućuje mogućem riziku od razvoja encefalopatije uz prisutnosti ili riziku razvoja upale, endotoksemije i/ili endotelne disfunkcije (408). Za porodicu *Acidaminococcaceae* nema dostupne literature, stoga nam je njena uloga nepoznata.

5.2.5. Učinak subkronične primjene AlCl₃ + D-gal i Qu na koncentraciju zonulina (ZON) u crijevnom sadržaju, serumu i tkivu mozga

Osim probavljanja hranjivih sastojaka i apsorpcije topljenih tvari i elektrolita, crijevni epitel sa svojom barijerskom funkcijom zadužen je za strogo kontrolirani promet antigena iz crijevnog lumena u submukozu. Ova razmjena diktira osjetljivu ravnotežu između tolerancije i imunskog odgovora koji uzrokuje upalu. Gubitak funkcije barijere sekundarno aktivira ZON, jedini poznati fiziološki modulator međustanično tijesnih veza, dovodi do nekontroliranog priljeva prehranbenim i mikrobnih antigena. Dodatni uvidi u mehanizam djelovanja ZON i nedavna uvažavanje uloge koju promijenjena propusnost crijevnog epitela može igrati u razvoju i napredovanju kroničnih upalnih poremećaja povećalo je zanimanje osnovnih znanstvenika i

kliničara za potencijalnu ulogu ZON u patogenezi ovih bolesti. Crijevno epitelna barijera (engl. *intestinal epithelial barrier*, IEB) i krvno-moždana barijera (BBB) reguliraju prolazak neškodljivih antigena iz hrane, iona, hranjivih tvari i metabolita, ali IEB sprječava prolazak crijevne mikrobiote (uključuje bakterije, toksične metabolite probave i bakterijske toksine), a BBB regulira prolazak imunskih stanica (409). IEB i BBB građene su od epitelnih i endotelnih stanica, odnosno pokazuju strukturne i regulacijske sličnosti. Stanice koje tvore BBB i IEB regulirane su međureakcijama s glija stanicama koje su povezane s CNS-om i enteričkim živčanim sustavom (409). Obje barijere su stabilizirane čvrstim međustaničnim spojevima (engl. *tight junctions*, TJs) i osjetljive na poremećaje koje aktiviraju upalni posrednici, uključujući lipopolisaharide (LPS) i citokine (409). TJs su dinamična apikalna struktura koja povezuje barijerne stanice i sastoje se od transmembranskih proteina uključujući okcludin, kladine, molekule spojne adhezije (engl. *junctional adhesion molecules*, JAMs) i tricelulin. TJs djeluju s proteinima citoplazmatske mreže (tj. zonula okcludenima) koji su usidreni u citoskeletu aktina (410, 411). Zanimljivo je da oštećenja IEB-a i povećana propusnost crijevnog epitela nisu samo uključeni u patogenezu upalnih bolesti crijeva, celijakije ili mikrobnih infekcije (409), već se pojavljuju u kombinaciji s neuropalnom i cerebrovaskularnom propusnošću (412-415). Raspad BBB igra važnu ulogu u etiologiji neuroloških bolesti poput moždanog udara, epilepsije i multiple skleroze (MS) (416). Temeljem navedenog, pretpostavljamo da poremećaj TJs kod BBB-a i IEB-a može biti pokrenut uzajamnim mehanizmom, pružajući novo mehaničko objašnjenje patofiziološke umiješanosti GBA u bolesti CNS-a (412-415) uključujući i neurodegenerativne poremećaje (npr. AD). Konkretno, ZON se pojavljuje kao važan posrednik porasta crijevne propusnosti kod ljudi (412, 417, 418). Zonulin proizvodi epitel tankog crijeva sisavaca pod utjecajem okolišnih čimbenika (412). Primjeri upalnih medijatora koji mogu poremetiti TJs su interferon IFN- γ i IL-17A, citokini koje proizvode stanice Th17 i Th1 i neke druge podvrste leukocita (418-424). IFN- γ i IL-17A uključeni su u patogenezu bolesti CNS-a, uključujući MS, epilepsiju i moždani udar (419-428).

Rezultati koncentracije zonulina u uzorku crijevnog sadržaja, seruma i homogenata prikazani su u **Tablici 12**. Rezultati analize koncentracije zonulina u uzorku crijevnog sadržaja (kolona) upućuju na poremećaj homeostaze u ovisnosti o obradi. Statistički značajne razlike, odnosno povišene koncentracije zonulina u odnosu na HC skupinu zabilježene su kod skupine AD ($P < 0,0001$) te skupina AD + Qu₂₅ i AD + Qu₅₀ ($P = 0,009$). Također je zabilježena i statistički značajno povišena vrijednost kod skupine AD u odnosu na skupinu Qu₂₅ i Qu₅₀ ($P = 0,009$). Temeljem navedenog i prethodno utvrđene crijevne disbioze kod skupina AD, AD + Qu₂₅ i AD

+ Qu₅₀ zaključujemo da je došlo do oštećenja IEB uzorkovane modulacijom crijevne mikrobiote kod navedenih skupina.

Analizom rezultata koncentracije zonulina u uzorku seruma zabilježena su povišene vrijednosti u odnosu na vrijednosti zonulina u crijevnom sadržaju. Statistički značajne povišene koncentracije zonulina u odnosu na HC skupinu u uzorku seruma zabilježene su kod skupine AD ($P = 0,0002$), AD + Qu₅₀ ($P = 0,00007$) i Qu₅₀ ($P = 0,00014$) te kod skupine AD ($P = 0,025$) u odnosu na skupinu Qu₂₅. Znanstvena osnova za mjerenje razine zonulina u serumu kao dijagnostički pokazatelj uglavnom proizlazi iz rada objavljenog od strane Saponia i sur. (426) 2006. godine koji je pokazao povezanost zonulinske regulacije i povećane propusnosti crijeva u podskupini bolesnika s dijabetesom tipa 1. Treba uzeti u obzir da postoje unutarnevne i svakodnevne varijabilnosti razine zonulina u serumu te njihov utjecaj na uporabu ZON kao dijagnostičkog biljega za IEB (427). Međutim, na osnovu korelacije razine ZON u uzorku crijevnog sadržaja i uzorku seruma kod skupina AD i AD + Qu₅₀ kod kojih je utvrđena disbioza vjerujemo da je opravdana upotreba ZON kao jedinog dijagnostičkog biljega za IEB. Smanjeni udio porodice *Prevotellaceae* u crijevnom mikrobiomu (bez statističke značajnosti) i povišena razina ZON u serumu upućuju na mogućnost postojanje crijevne propusnosti i kod skupine Qu₅₀. Međutim, ostali rezultati nepotvrđuju postojanje propusnosti IEB za skupinu Qu₅₀. Stoga vjerujemo da je povišena razina ZON u serumu skupine Qu₅₀ posljedica unutarnevne i svakodnevnih varijabilnosti ZON te vjerujemo da nije dovoljna kao jedini dijagnostički biljeg za utvrđivanje oštećenja IEB.

Zabilježene vrijednosti zonulina u uzorku homogenata mozga su i do 10 puta više usporedno s vrijednostima zabilježenim u uzorku crijevnog sadržaja i seruma kod istih skupina. Statistički značajno povišene vrijednosti zonulina u odnosu na HC skupinu zabilježene su kod skupine AD ($P < 0,0001$) i AD + Qu₂₅ ($P = 0,009$) te kod skupine AD ($P = 0,009$) u odnosu na skupinu AD + Qu₂₅. Na temelju navedenih rezultata i postojanja sukladnosti s prethodnim rezultatima (gubitak tjelesne mase i disbioza) za skupinu AD i AD + Qu₂₅ zaključujemo da je povišena razina ZON posljedica narušene propusnosti BBB. Disfunkcija BBB koja vodi do „leaky brain“ može se povezati s različitim neurološkim bolestima, uključujući poremećaj autističnog spektra (ASD) (428), demenciju, Alzheimerovu bolest, depresiju i shizofreniju (429, 430). Poremećaj BBB zabilježen je kod bolesnika s većim psihijatrijskim bolestima (431). Nadalje, BBB može postati „leaky“ u odabranim neurološkim bolestima koje imaju imunosnu komponentu, poput multiple skleroze (MS) (432, 433), Alzheimerove bolesti, traume mozga, edema, raka mozga (434), amiotrofične lateralne paralizacije, meningitisa (435) i sistemske bolesti

poput zatajenja jetre (436). Štoviše, ko-metabolizam unutar međureakcije s crijevima i mozgom i endokrinom igraju ulogu u istim neurodegenerativnim poremećajima, uključujući Parkinsonovu bolest (PD), pa čak i autizam, čini se da imaju promjenjenu mikrobnu komponentu kao dio njihove patogeneze (437). Točnije, promjena mikrobne populacije vodi disbozi i crijevnoj propusnosti; posljedica navedenog može biti smanjena produkciji butirata, koji ima važna protuupalna svojstva, smanjuje aktivnost proupalnih citokina (IL-6 i IL-12) kroz regulaciju neutrofila i drugih upalnih stanica i doprinosi sintezi mukusa i sklapanju čvrstih međustaničnih veza. Štoviše, poznati mikrobi su uključeni u doprinos osjetljivosti i patogenezi ove bolesti, a propusnost i poremećaj BBB utvrđeni su u Alzheimerova bolest (AD), koja može omogućiti da periferna krv, amiloid beta i citokini uđu u mozak i doprinesu patogenezi osjetljivih neurona (438, 439).

5.3. Praćenje učinka subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na rezultate analize esencijalnih i toksičnih elemenata u serumu i tkivu mozga metodom induktivno spregnute plazme s masenom spektrometrijom (ICP-MS)

Do sada nijedno mjerodavno tijelo, kao što je Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju (IUPAC), nije definiralo izraz „teški metali“ (440). U literaturi iz područja biotehničkih znanosti, u Republici Hrvatskoj, najčešće se kao granica navodi $5g/cm^3$. Ovu grupu kemijskih elemenata u svijetu najčešće nazivaju i „elementi u tragovima“, a definirana je kao grupa elementa koji su u vrlo niskim koncentracijama (mg/kg ili manje) prisutni u većini tla, biljaka i živih organizama (441).

Živčani sustav ranjiva je meta toksičnih tvari zbog kritičnih membranskih potencijala koji se moraju održavati u stanicama i svih reakcija kad naponi dosegnu graničnu razinu (225). Mnoga istraživanja su izvijestili da je Al ima potencijal da bude neurotoksin u čovjeka i životinja (442, 443, 234). Nadalje, različita istraživanja potvrdile su da Al uzrokuje velika oštećenja živčanog sustava ubrzavanjem oksidacijskih reakcija uzrokujući oštećenja biomolekula poput lipidnih, proteinskih i nukleinskih kiselina (444-447). Potvrđeno je akumulacija Al u kostima, jetri testisima, bubrezima i mozgu (234). Do sad su provedena brojna istraživanja na animalnom modelu koja su potvrdila neurotoksične učinke $AlCl_3$ na staničnoj i molekularnoj razini (445-451) kao i protektivne učinke kvercetina (225, 452-454).

U normalnim fiziološkim uvjetima Al se potpuno eliminira filtracijom bubrega. Razlog visoke koncentracije Al u seruma je njegov (Al^{3+}) visoki afinitet prema proteinima koje je sposoban umrežiti. Zbog svoje visoke kompetitivnosti s metalima $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ veže na transferin (Al-transferin) i kao takav putem endocitoze posredovane transferinskim receptorom (TfR-ME) premošćuje BBB (455).

Rezultati analize Al (ppm) u uzorku seruma/tkiva mozga (**Tablica 13**) upućuju na poremećaj homeostaze u ovisnosti o obradi. U serumu su zabilježene značajno više vrijednosti kod ispitne skupine AD ($P = 0,00014$), AD + Qu₂₅ ($P = 0,0095$) i AD + Qu₅₀ ($P = 0,0026$) u odnosu na HC. U uzorku tkiva mozga vrijednosti Al su značajno više kod ispitne skupine AD ($P = 0,00008$) i AD + Qu₅₀ ($P = 0,004$) u odnosu na HC. U ispitnim skupinama AD, AD + Qu₂₅ i AD + Qu₅₀ vrijednosti Al u tkivu mozga su statistički značajno manja u odnosu na vrijednosti Al u serumu ($P < 0,001$) (**Slika 34**), što upućuje na održivost i selektivnu propusnost BBB i pri visokim vrijednostima Al u sustavnom krvotoku. Rezultati povišene koncentracije Al u uzorku tkiva mozga i seruma upućuju na akumuliranje Al u organizma zbog neučinkovitog uklanjanja bubrežnom filtracijom.

Mnogobrojna istraživanja provedena o međureakciji Al s drugih metala omogućile su uvid u mehanizme njegovog djelovanja u biološkom sustavu. Tako ukoliko je unos Al veći od izbačenoga, s napredovanjem dobi dolazi do neto povećanja intraneuronalnog Al (456). Al je odgovoran za dvije glavne vrste toksičnih oštećenja u stanicama. Kao prooksidans, Al uzrokuje oksidacijska oštećenja sama po sebi i u sinergiji s željezom (456, 457). Al se također natječe i zamjenjuje esencijalne metale, prvenstveno Mg^{2+} , ione željeza i Ca^{2+} u proteinima i njihovim ko-faktorima. Intraneuronski Al ometa metabolizam i signalizaciju Ca^{2+} u mozgu. Ionski kalcij (Ca^{2+}), fiziološki aktivni oblik kalcija, je sveprisutni glasnik koji ima središnju regulatornu ulogu u metabolizmu svih stanica. Ca^{2+} signali kontroliraju raznoliki skup bioloških procesa u neuronima od transkripcije gena, rasta i diferencijacije stanica do neuroprijenosa, sinaptičke plastičnosti, obrade memorije i stanične smrti (456). Zdravi neuroni imaju mehanizme koji strogo kontroliraju svoj unutarstanični sadržaj Ca^{2+} jer produženo povećana koncentracije Ca^{2+} je ekscitotoksična. Na primjer, koncentracije Ca^{2+} u neuronima povećavaju se tijekom neuronske aktivnosti s razine mirovanja na vrhunac, a zatim se vraćaju na razinu odmaranja, pripremajući tako neurone za njihov sljedeći napad aktivnosti. To zahtijeva normalno funkcioniranje Ca^{2+} transportnih mehanizama, Ca^{2+} pufernih proteina i unutarstaničnih Ca^{2+} sustava za pohranu (456). Mnoga od pregledanih istraživanja pokazala su da intraneuronalni Al uzrokuje metaboličke promjene usporedive s onima povezanim sa starenjem. Te promjene

uključuju povišenje razine Ca^{2+} u neuronskoj citoplazmi pri mirovanju i vrhu aktivnosti (tj. nema izmjene razine između faze odmora i neuronske aktivnosti), manji unos Ca^{2+} i sporiju brzinu uklanjanja Ca^{2+} iz citoplazme.

Rezultati Ca (ppm) u uzorku seruma/tkiva mozga (**Tablica 13**) upućuju na poremećaj homeostaze u ovisnosti o AlCl_3 . U serumu su zabilježene znatno više vrijednosti kod ispitne skupine Qu_{25} ($P = 0,027$) u odnosu na HC te kod skupine Qu_{25} u odnosu na $\text{AD} + \text{Qu}_{25}$ ($P = 0,02$) i $\text{AD} + \text{Qu}_{50}$ ($P = 0,045$). U uzorku tkiva mozga vrijednosti Ca su znatno više kod ispitne skupine AD ($P = 0,0002$; $P = 0,0006$) i $\text{AD} + \text{Qu}_{50}$ ($P = 0,014$; $P = 0,02$) u odnosu na HC i Qu_{25} . Poznato je da oksidacijski stres može prouzročiti staničnu smrt dugotrajnim povišenjima unutarstaničnih koncentracija Ca^{2+} (458). Povišena razina koncentracije Ca^{2+} vodi povećanju energetske izdataka i posljedično propadanja citoskeleta, što može dovesti do moždanog udara i akutnog gubitka neurona (458). Međutim, kvercetin može zaštititi stanice od oksidacijskog stresa te spriječiti smrt ovisnu o Ca^{2+} (459). Primjerice, u ljudi koji su uzimali dozu flavonola veću od 30 mg/dnevno, rizik za moždani udar bio je manji za 60% (460).

Iz dosadašnjih istraživanja poznato je da su ioni željeza i kalcija ključni za održavanje normalne moždane funkcije. Željezo je potrebno za oksidacijsku fosforilaciju, Krebsov ciklus, sintezu hema, sinaptičku plastičnost i razvoj kognitivnih funkcija. Disregulacija jednog od tih procesa rezultira disregulacijom drugog, stvarajući začarani krug koji završava neuronskom smrću (457).

Rezultati Fe (ppm) u uzorku seruma/tkiva mozga (**Tablica 13**) upućuju na poremećaj homeostaze u ovisnosti o obradi i AlCl_3 . U serumu su zabilježene znatno niže vrijednosti Fe kod skupine $\text{AD} + \text{Qu}_{25}$ u odnosu na HC ($P = 0,031$) i Qu_{25} ($P = 0,038$) te kod $\text{AD} + \text{Qu}_{50}$ u odnosu na HC ($P = 0,021$), Qu_{25} ($P = 0,027$) i Qu_{50} ($P = 0,045$) ispitnu skupinu. U uzorku tkiva mozga vrijednosti Fe su znatno niže kod AD u odnosu na HC ($P = 0,014$) ispitnu skupinu.

Rezultati ovoga istraživanja upućuju na poremećenu homeostazu Ca i Fe uzrokovanu opterećenjem organizma aluminijem. U uzorku seruma i tkiva mozga vidljiv je pozitivan učinak Qu u vidu nižih vrijednosti Al, ali bez statističke značajnosti ($P \leq 0,05$). Kvercetin veže ione $\text{Cu}^{2+} < \text{Fe}^{2+} < \text{Fe}^{3+} < \text{Al}^{3+}$ uzlaznim slijedom kako je prikazano (461), što je u skladu s prikazanim rezultatima ovoga istraživanja. Kvercetin je lipofilan dovoljno da lako može prelaziti lipidne dvoslojeve bez međureakcije s prijenosnicima, stoga je u mogućnosti tvoriti kompleks s metalima i nakon ulaska u stanicu (462). Citosolno i izvanstanično keliranje

pojedinih elemenata isto može uzrokovati narušavanje homeostaze te omogućiti nakupljanje pojedinih elemenata u tkivima (462).

5.4. Praćenje učinka subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na parametare oksidacijskog stresa i antioksidacijske zaštite u tkivu mozga

Brojna istraživanja ukazuju na povezanost Al s etiologijom AD i nekim drugim neurodegenerativnim bolestima, pokazalo se da je oštećenje uzrokovano oksidacijom jedan od važnih mehanizama (463-466). Al može izazvati neurotoksičnost stvaranjem slobodnih radikala (465, 466), iako sam Al nije prijelazni metal i ne može katalizirati redoks reakcije (467). Ioni Al imaju snažan afinitet prema bio-membranama, mogu povećati stanični oksidacijski okoliš potencirajući pro-oksidacijska svojstva prijelaznih metala (467-470). Izlaganje Al također je povezano s oštećenjem mitohondrijskih funkcija *in vitro* (471) i *in vivo* (472), također narušava antioksidacijski obrambeni sustav, što može dovesti do stvaranja oksidacijskog stresa (463, 464), posebice u moždanim stanicama koje su podložne oksidacijskom stresu zbog niske koncentracije antioksidacijskih enzima, velike potrebe za kisikom, brojnih mitohondrija, povećane nazočnosti Fe i visokog sadržaja polinezasićenih masnih kiselina u membranama mozga.

D-gal je monosaharid koji se u velikom postotku nalazi u mlijeku, tj. nastaje razgradnjom laktoze. Za D-gal 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 (473).

Qu posjeduje snažnu antioksidacijsku sposobnost uklanjanjem slobodnih radikala i vezanjem iona prijelaznih metala, inhibirajući lipidnu peroksidaciju (474). Istraživanja *in vitro* pokazale su njegovu neuroprotektivnu sposobnost, štoviše, postoje dokazi da unos Qu u svakodnevnoj prehrani može smanjiti neurodegeneraciju i spriječiti ili preokrenuti gubitke kognitivnih sposobnosti ovisnih o godinama (473).

Nakon subkronične primjene ispitnih komponenti kako je prikazano u **Tablici 4** u uzorcima tkiva mozga određena je koncentracija ukupnih proteina (**Slika 35**) te parametri oksidacijskog stresa (PC i MDA, **Slika 36-37**) i antioksidacijske zaštite (CAT, GSH i SOD, **Slika 43-45**).

5.4.1. Učinak subkronične primjene AlCl₃ + D-gal i Qu na koncentraciju ukupnih proteina u tkivu mozga

Dosadašnja istraživanja su potvrdila da se sinteza proteina odvija na endoplazmatskom retikulumu (ER) pod kontrolom mRNA uz pomoć čimbenika potrebnih za rast, popravak i plastičnost neurona (475). Kapacitet ER, posebno s obzirom na proces smatanja novih proteina, je ograničen, a preopterećenje može doprinijeti staničnoj smrti (475). Nadalje, proteini osiguravaju neuronsku strukturu (membrane) i katalizatore (enzime) koji posreduju funkcionalnu aktivnost. Iako neuroni mogu trajati cijeli život i čini se da su anatomske stabilni, njihovi sastojci proteini su u dinamičkoj ravnoteži između sinteze i razgradnje, s vremenom poluživota u rasponu od nekoliko minuta do tjedana (475). U homogenatu tkiva mozga je određena ukupna koncentracija proteina (**Slika 35**) kao referentna osnova prema kojoj su određene vrijednosti PC, MDA, CAT, GSH i SOD. U istraživanju je zabilježena smanjenu koncentraciju proteina (mg/mL tkiva mozga) kod skupine AD u odnosu na HC ($P = 0,0016$), Qu₂₅ ($P = 0,04$) i Qu₅₀ ($P = 0,018$) te kod skupine AD + Qu₂₅ u odnosu na HC ($P = 0,02$). Rezultati upućuju na gubitak proteina uslijed međureakcije s ispitnim komponentama, što može imati za posljedica nemogućnosti sinteze proteina ili gubitka stanica uslijed apoptoze. Ne postoji literatura s kojom bi mogli usporediti rezultate ovoga istraživanja, iako je poznato iz drugih istraživanja da sinteza proteina može biti utišana usred ishemijskog šoka (476) ili privremenog djelovanja farmakoloških lijekova (477).

5.4.2. Učinak subkronične primjene AlCl₃ + D-gal i Qu na koncentraciju karboniliranih proteina (PC) u tkivu mozga

Oksidacijska modifikacija proteina mozga može poremetiti neuronske funkcije smanjenjem aktivnosti ključnih metaboličkih enzima i utjecajem na stanične signalne sustave (478). Razina

oštećenja proteina raste u stresnim uvjetima i u načelu može biti pokazatelj izloženosti ROS-u. Postoje dva načina karbonilacije proteina. Primarna karbonilacija proteina nastaje zbog oksidacije aminokiselinskih ostataka Pro, Arg, Lys, i Thr (C=O), inicirane ROS-om i RNS-om, često katalizirane metalima. Sekundarna karbonilacija proteina nastaje dodatkom aldehida, koji nastaju uglavnom u procesu peroksidacije lipida (LPO), ali mogu biti i nusproizvodi glikolize i procesa glikacije (479). Zbog ireverzibilne prirode takvih promjena, karbonilacija predstavlja najštetniji oblik oksidacijskog oštećenja proteina (480). Iz rezultata koncentracije karbonilnih skupina (**Slika 36**) u proteinskom uzorku vidljivo je statistički značajno povećanje kod skupine AD u odnosu na HC ($P = 0,003$) i Qu₅₀ ($P = 0,0003$) te kod skupine AD + Qu₅₀ u odnosu na Qu₅₀ ($P = 0,03$). Iako bez statističke značajnosti, niže vrijednosti su zabilježene kod skupine AD + Qu₂₅ i AD + Qu₅₀ u odnosu na AD. Prikazani rezultati potvrđuju prooksidacijski učinak AlCl₃ i protuoksidacijsku sposobnost Qu. U istraživanju provedenom na Wistar štakorima tijekom 30 dana, potvrđen je inhibitorski utjecaj kvercetina (doza 50 mg/kg tm) na formiranje karbonilnih proteina kao i ostalih produkata ROS-a u hipokampalnom području mozga (481). Slične rezultate su dala i *in vitro* istraživanja na hipokampalnim stanicama (482), kao i druga *in vivo* istraživanja na animalnom modelu štakora (483, 484).

5.4.3. Učinak subkronične primjene AlCl₃+D-gal i Qu na lipidnu peroksidaciju (MDA) u tkivu mozga

MDA je nusprodukt lipidne peroksidacije (LPO) i njegova koncentracija jako dobro odražava razinu peroksidacije lipida (253). Oštećenje lipida utvrđeno je povišenom koncentracijom MDA (**Slika 37**) u homogenatu tkiva mozga kod skupine AD u odnosu na HC ($P = 0,03$), AD + Qu₅₀ ($P = 0,02$) i Qu₂₅ ($P = 0,03$). Blago povišena koncentracija MDA je zabilježena i kod skupine Qu₅₀, ali bez statističke značajnosti u odnosu na ostale ispitne skupine. Međutim, treba istaknuti da je potvrđeno da polifenolne tvari (kao što su kvercetin i galna kiselina) mogu pokazati anitoksidacijsku aktivnost pri niskim koncentracijama (do 50 μmol) dok pri visokim koncentracijama (50-250 μmol) mogu povećati proizvodnju reaktivnih kisikovih spojeva autooksidacijom (127).

Iz navedenih rezultata kvercetin može ometati proizvodnju ROS-a djelujući kroz dva mehanizma za smanjenje oštećenja tkiva, kelirajućim učinkom i poništavanjem LPO. Izloženost štakora AlCl₃ u koncentraciji od 100 mg/kg/dnevno može dovesti do povećanja

razine LPO (485). U istraživanju provedenom na animalnom modelu miša, uz primjenu doze AlCl_3 10, 50 ili 300 mg/kg/dnevno tijekom 100 dana razina MDA se značajno povećala u stanicama hipokampusa i korteksa (486). Nadalje, ioni Al^{3+} preuređuju membransku strukturu koja olakšava oksidacijsko djelovanje Fe (487). U moždanom tkivu Al soli induciraju peroksidaciju lipida (LPO) povećavajući ukupne reaktivne tvari tiobarbiturne kiseline u mozgu (TBARS) (488).

5.4.4. Učinak subkronične primjene AlCl_3 + D-gal i Qu na enzimatsku aktivnost katalaze (CAT) i superoksid dismutaze (SOD) u tkivu mozga

Iz dosadašnjih istraživanja (252) je poznato da Al stabilizira ione željeza (Fe^{2+}) smanjujući brzinu oksidacije. Fe^{2+} katalizira Fentonovu reakciju (489), što dovodi do stvaranje $\text{OH}\cdot$, OH^- i Fe^{3+} iz neenzimske reakcija Fe^{2+} s H_2O_2 . U isto vrijeme, Al je aktivator SOD-a i inhibitor CAT-a; stoga se superoksidni radikali lako pretvaraju u H_2O_2 , a zatim u H_2O i O_2 djelovanjem CAT, koja kada se usporava, dovodi do stvaranja hidroksilnih radikala ($\text{OH}\cdot$) koji zauzvrat oštećuju razne proteine, DNA i membrane lipida (490, 491). Iz rezultata mjerenja enzimске aktivnosti CAT (**Slika 38**) utvrđena je povišena antioksidacijska aktivnost katalaze kod skupine AD u odnosu na skupinu HC ($P = 0,007$) i Qu_{50} ($P = 0,008$). Iz rezultata enzimске aktivnosti SOD (**Slika 40**) uočava se statistički značajno povišena aktivnost kod skupina AD + Qu_{25} ($P = 0,03$) i Qu_{25} ($P = 0,016$) u odnosu na HC. Kako bi se postigao osnovni cilj enzimskog antioksidacijskog sustava, a to je sprječavanje oksidacijskih oštećenja, enzimska kaskada mora biti vrlo dobro usklađena i regulirana. Smanjenje aktivnosti SOD-a moglo bi usporiti uklanjanje slobodnih radikala unutar stanica i tako ukazati na visok stupanj proizvodnje slobodnih radikala i LPO, što je vidljivo kod AD skupine. SOD svojom aktivnošću uklanja superoksidni radikal i prevodi ga u vodikov peroksid koji se dalje uklanja djelovanjem CAT koja je povišena kod skupine AD uz nepromijenjenu aktivnost SOD usporedno s ostalim ispitnim skupinama. Osim toga, poremećaj u odnosima antioksidacijskih enzima može upućivati na oštećenu antioksidacijsku sposobnost uzrokovanu AlCl_3 . Slične rezultate su prikazali Rui i Yongjian (486) u *in vivo* istraživanju primjenom doze AlCl_3 10, 50 ili 300 mg/kg/dnevno na modelu miša. U prikazanom istraživanju porast LPO-a u stanicama izazvan AlCl_3 praćen je smanjenjem aktivnosti SOD (44,48% u hipokampusu i 47,24% u korteksu).

5.4.5. Učinak subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na ukupni glutation u tkivu mozga

Zahvaljujući cisteinu koji sadrži tiolnu skupinu, glutation je važan unutarstanični neenzimski oksidans koji sudjeluje u prijenosu aminokiselina kroz plazmatsku membranu, izravno čisti singletni kisik i hidroksilni radikal te time detoksificira vodikov peroksid i lipidne perokside katalitičkim djelovanjem glutation peroksidaze (GPx). Glutation je obilatno prisutan u citosolu, jezgrama i mitohondrijima te je glavni topljivi antioksidans u staničnim odjeljcima. Unutarstanični sadržaj glutationa ovisi o čimbenicima okoliša i funkcionira kao ravnoteža između njegova korištenja i brzine sinteze GSH (492). Rezultati ovoga istraživanja bilježe statistički značajno manju koncentraciju ukupnog glutationa (**Slika 42**) kod skupine AD u odnosu na skupinu HC/AD + Qu₅₀ ($P = 0,03$) i AD + Qu₂₅ ($P = 0,0001$) te kod skupine Qu₂₅ i Qu₅₀ u odnosu na skupinu AD + Qu₂₅ ($P = 0,03$). Iz rezultata je vidljiv protuoksidacijski učinak Qu kod skupine AD + Qu₂₅ i AD + Qu₅₀ usporedno sa skupinom AD. Mozak je posebno osjetljiv na slobodne radikale zbog nižeg sadržaja glutationa, visokog udjela PUFA u membranama i njegov metabolizam koji troši oko 20% ukupnog kisika u tijelu (493). U tim uvjetima, visoka izloženost Al inducira stvaranje ROS-a u mozgu što pospješilo stvaranje $A\beta$ -peptida, taloženje i s vremenom AD-amiloidozu sličnu AD (494). U sličnim *in vivo* istraživanjima izloženost $AlCl_3$ pratila je porast LPO i smanjenje ukupnog glutationa, reduciranog glutationa, GPx i CAT enzima u mozgu štakora (495) i miševa (496), kao i smanjenje ekspresije gena antioksidacijskih enzima (488). Qu značajno štiti neuronske stanice od oksidacijske stres-inducirane neurodegeneracije kod AD (497), inhibira LPO, poboljšava aktivnost CAT i SOD (498), a također sprječava iscrpljivanje glutationa (499). Kim i sur. 2004. (500) dokazali su da ekstrakt *Ginkgo bilobe*, bogat Qu, pokazuje neuroprotektivni učinak protiv oksidacijskih oštećenja. Štoviše, Qu ublažava smrt neurona u hipokampusu, što rezultira poboljšanim učenjem i pamćenjem u testu labirinta (248).

Prema rezultatima biljega oksidacijskog stresa i antioksidacijske zaštite Qu posjeduje snažnu antioksidacijsku sposobnost uklanjanjem slobodnih radikala vezanjem iona prijelaznih metala, inhibirajući LPO i PC te potičući antioksidacijsku zaštitu kroz aktivaciju CAT, SOD i GSH u svim ispitnim skupinama koje su obrađene kvercetinom. Rezultati našeg istraživanja u skladu su s rezultatima istraživanja na animalnom modelu koji su predstavili Al-Otaibi i sur. (483) u radu objavljenom 2018. Izdvajamo skupine bitne za usporedbu istraživanja: kontrolna skupina, $AlCl_3$ (7 mg/kg/dnevno, *ip*), Qu (50 mg/kg/dnevno/14 dan, *ip*) i $AlCl_3$ (7 mg/kg/dnevno, *ip*) +

Qu (50 mg/kg/dnevno/14 dan, *ip*). U odnosu na kontrolnu skupinu AlCl₃ pokazuje statistički značajno ($P < 0,001$) povišenje PC od 119%, LPO od 242%, CAT od 106% te smanjenje SOD od 32% i GSH od 44%. U odnosu na kontrolnu skupinu Qu pokazuje statistički značajno povišenje ($P < 0,05$) PC od 14% i SOD od 11% ($P < 0,05$) te smanjenje CAT od 15% ($P < 0,05$) i GSH i LPO ($P > 0,05$). U odnosu na AlCl₃ skupinu Qu + AlCl₃ pokazuje statistički značajno smanjenje PC ($P < 0,001$) i povišenje GSH bez vraćanja u normalu ($P < 0,05$) te LPO, CAT i SOD vrijednosti vraćene u normalu ($P > 0,05$) (483).

5.5. Praćenje učinka subkronične primjene AlCl₃ + D-gal i Qu na nastanak neuropatologije

5.5.1. Neurohistopatološke promjene

Neurohistopatološke promjene vidljive su u kori velikoga mozga, hipokampalnoj formaciji i pojedinim regijama maloga mozga te u disregulaciji koncentracije BDNF-a i aktivnosti AChE.

5.5.1.1. Učinak subkronične primjene AlCl₃ + D-gal i Qu na neurohistopatološke promjene utvrđene bojanjem modificiranom metodom po Bielschowskom

Bielschowsky tehnika je metoda bojenja srebrom koja se koristi u histokemiji za vizualizaciju živčanih vlakana, uključujući multipolarne interneurone u cerebelumu (mali mozak). Ujedno je i jedna od široko korištenih tehnika koja se koristi za otkrivanje AD patologije detekcijom neurofibrilarnih snopića (TNF). Ovom metodom nije utvrđeno postojanje TNF-a niti u jednoj ispitnoj skupini. Iz prikazanih rezultat je vidljiv blagi neuroprotektivni utjecaj Qu (25 i 50 mg/kg) na neurotoksična oštećenja uzrokovana primjenom AlCl₃ (10 mg/kg) i D-gal (60 mg/kg). U molekularnom sloju kore kod skupine AD + Qu₂₅ ($P = 0,00007$) i AD + Qu₅₀ ($P = 0,009$) gubitak stanica je statistički manji u odnosu na skupinu AD (**Slika 41A**), ali i dalje značajan u odnosu na skupinu HC. U hipokampalnoj formaciji CA1 vidljiv je manji gubitak

stanica u skupine AD + Qu₂₅ i AD + Qu₅₀ u odnosu na skupinu AD, ali na granici statističke značajnosti ($P = 0,053$). Nadalje gubitak stanica zabilježen je kod skupine AD u odnosu na skupinu HC ($P = 0,0012$), Qu₂₅ ($P = 0,046$) i Qu₅₀ ($P = 0,000012$) te kod skupine AD + Qu₂₅/Qu₅₀ u odnosu na skupinu HC i Qu₅₀ ($P = 0,046$).

U *in vivo* istraživanju koje su Al-Otaibi i sur. prikazali u svome radu 2018. (483) mozak štakora izloženih AlCl₃ pokazao je brojne tamne stanice bez jezgri koje su najvjerojatnije apoptotske stanice. Međutim, mozgovi štakora izloženih AlCl₃ prethodno obrađenih s kvercetinom ili/i α -lipoičnom kiselinom su pokazali manji broj apoptotskih stanica u kori velikoga mozga (483). 8-HQ je najčešće korišteni organski ligand za fluorescentni spektrofotometrijski test (501) i dobiva se kao dobar fluorofor i kromofor za istodobnu detekciju Al³⁺ (502). Wang i sur. su 2018. (503) predstavili rezultate svoga istraživanja u kojem su 8-HQ bojanjem i imunocitokemijskom lokacijom, otkrili da je ko-lokaciju Al³⁺ znatno porasla u tkivu hipokampusa AlCl₃ izloženih štakora, kao i u staničnoj kulturi primarnih neuronskih stanica hipokampusa. Akumulacija Al³⁺ u neuronima uočena je oko jezgri te usporedno s kontrolnom skupinom bila je za 70,2% viša kod štakora izloženih Al (200 mg/kg/6 tjedana). Slični rezultati zabilježeni su i u kulturi neuronskih stanica hipokampusa gdje je razina Al u stanicama obrađenim AlCl₃ (10 μ g Al/mL stanične tekućine) bila 77,8% viša od razine kontrolnih stanica (503). U dosadašnjim istraživanjima D-gal je prijavljena kao sredstvo za starenje, a Al kao neurotoksični metal (84, 88, 478). Prikazi histoloških dijelova hipokampusa iz kontrolnih i AlCl₃ (100 mg/kg, 200 mg/kg i 300 mg/kg) + D-gal (60 mg/kg) skupina pokazali su izrazito izobličenje i degeneraciju piramidalnih stanica u CA1, CA2 i CA3 hipokampalne formacije kod skupine AlCl₃ (200 i 300 mg/kg) u usporedbi s kontrolnom skupinom. Kontrolna skupina je pokazala normalan raspored slojeva piramidalnih stanica koje su pravilne i zbijene (504).

Temeljem navedenog te usporedbom rezultata neurohistopatologije i razine Al u tkivu mozga određene ICP-MS-om nalazimo podudarnost u rezultatima našeg istraživanja. Budući da je u odnosu na HC skupinu razina Al povišena kod skupine AD za 342,85%, AD + Qu₂₅ za 200% i AD + Qu₅₀ za 271,42%, gubitak stanica u kori i hipokampalnoj formaciji CA1 je očekivan u manjoj ili jednakoj mjeri kod svih skupina koje su obrađene AlCl₃.

5.5.1.2. *Praćenje učinka subkronične primjene AlCl₃ + D-gal i Qu na izraženost biljega 4G8*

Unatoč potkrijepljenim dokazima, Al hipoteza o AD-u ostaje kontroverzna i tema je mnogih rasprava u posljednjih nekoliko desetljeća još od kada je u bolesnika s bubrežnom insuficijencijom *post mortum* dokazano nakupljanja Al u tkivu mozga i postojanje senilnih plakova i NFT-a (85). Razvoj tehnologije je omogućio napredne analize u ovome području, tako su Bouras i sur. upotrebom LAMMA (engl. *laser microprobe mass analysis*) na nefiksiranim uzorcima mozga izvijestio o nakupljanju Al u NFT-u kod oboljelih od AD (505). Nedavno su Yumoto i sur. (506) analizirali Al pomoću energetske-disperzijske rendgenske spektroskopije u kombinaciji s prijenosnom elektronskom mikroskopijom (TEM EDX, engl. *energy-dispersive X-ray spectroscopy combined with transmission electron microscopy*), metodom koja daje visoku rezoluciju i nisku granicu detekcije. Njihova detaljna analiza pokazala je da je Al prisutan u jezgrama senilnih plakova u koncentraciji od 35 do 50 ppm (506). Nadalje, imunohistokemijska istraživanja na Al-animalnim modelima utvrdila su postojanje amiloidnih plakova (507, 508) i TNF- α (509).

U ovome istraživanju, imunohistokemijskim označavanjem AT8, PHF1 i MC1 primarnog protutijela nije dobiven dovoljno jak signal kako bi se utvrdilo postojanje NFT-a. Međutim, upotrebom 4G8 amiloidnog protutijela koje prepoznaje pogrešno obrađene izoforme i prekursorske oblike $A\beta$ peptida vidljivo je nakupljanje difuznih plakova (**Slika 43 i 44**) u području maloga mozga (Cl, lat. *cerebellum*), kore velikog mozga (Ctx, lat. *cortex*) i hipokampalne formacije (Hpp, lat. *hippocampus*). Prosječna izraženost biljega je veća u području kore velikoga mozga u odnosu na hipokampus te je prisutna kod sve tri skupine obrađene AlCl₃ i D-gal (AD, AD + Qu₂₅ i AD + Qu₅₀). U kontrolnim uzorcima (HC) i uzorcima obrađenim samo kvercetinom (Qu₂₅ i Qu₅₀) izraženost biljega nije zabilježena.

U području malog mozga zabilježen je statistički značajno veći broj plakova kod skupine AD u odnosu na skupine AD + Qu₂₅ i AD + Qu₅₀ ($P = 0,01$), veća površina plakova kod skupine AD u odnosu na skupine AD + Qu₂₅ ($P = 0,0044$) i AD + Qu₅₀ ($P = 0,047$) te intenzitet obojenja AD + Qu₂₅ ($P = 0,0002$) i AD + Qu₅₀ ($P = 0,0036$).

U području kore velikoga mozga zabilježen je statistički značajno veći broj plakova za skupinu AD u odnosu na skupinu AD + Qu₂₅ ($P = 0,00046$) bez statistički značajnih promjena u površini plakova (**Slika 45B**) unutar obrađenih skupina. Statistički značajne promjene zabilježene su i u

intenzitetu obojenja (**Slika 45C**) koje je veće kod skupine AD u odnosu na skupine AD + Qu₂₅ ($P = 0,0021$) i AD + Qu₅₀ ($P = 0,000147$).

U području hipokampalne formacije nisu zabilježene statistički značajne promjene u broju (**Slika 45A**) i površini (**Slika 45B**) prisutnih plakova usporedbom obrađenih skupina. Statistički značajne promjene zabilježene su u intenzitetu oboljenja (**Slika 45C**), koje je veće kod skupine AD u odnosu na skupinu AD + Qu₂₅ ($P = 0,0094$).

$A\beta$ je glavna komponenta amiloidnih plakova; izvanstanične naslage nađene u mozgu bolesnika s Alzheimerovom bolešću (510). Slični se plakovi pojavljuju u nekim varijantama demencije s Lewyjevim tijelima, dok $A\beta$ također može tvoriti agregate koji prekrivaju moždane krvne žile kod cerebralne amiloidne angiopatije (511-513). Mali mozak je relativno zanemareno područje mozga u proučavanju patologije AD, vjerojatno zato što se ranije mislilo da je pošteđen. Međutim, otkrivene su brojne patološke promjene vezane uz AD, uglavnom imunocitokemijskim istraživanjima, raširene naslage difuznog amiloida. Difuzni plakovi, koji se nazivaju i benigni plakovi, javljaju se mnogo ranije nego neuritični plakovi, podržavajući tako ideju o terapijskoj intervenciji u ranom stadiju bolesti (514). Nadalje, usporedbom odabranih područja (Ctx, Hpp i Cl) uočavamo da je površina plakova najveća u području maloga mozga, a brojnost u kori velikoga mozga.

5.5.1.3. Praćenje učinka subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na izraženost biljega Iba1

Imunohistokemijskim bojanjem analizirana je izraženost biljega Iba1. Protein Iba1 ključan je u procesima fagocitoze i nabiranja membrane (515). Taj biljeg označava mikroglija stanice u mirovanju i u početnoj fazi aktivacije, a njegovom upotrebom dobro je vidljiva morfologija stanice, posebice dugi razgranati nastavci (516).

Izraženost biljega Iba1 je različita u području kore velikoga mozga, hipokampalne formacije i maloga mozga prikazana je na **Slikama 46-48** i u **Tablici 14** ovisno o obradi. Navedeni nalaz ukazuje na osjetljivost pojedinih područja mozga za nastanak patoloških promjena karakterističnih za AD. Prema rezultatima izraženosti biljega Iba1 ukazuje na povećanu imunoreaktivnost kod AD skupine u području kore velikoga mozga u odnosu na ostale obrađene skupine ($P = 0,0083$) te izostanak imunoreaktivnosti kod HC skupine. Među uzorcima

hipokampalne formacije (Hpp) zabilježena je povećana imunoreaktivnost u području: GD kod skupine AD i AD + Qu₂₅ u odnosu na skupine HC i Qu₅₀ ($P = 0,00013$; $P = 0,0083$); CA1 kod skupina HC, AD i AD + Qu₂₅ u odnosu na skupine AD + Qu₅₀, Qu₂₅ i Qu₅₀ ($P = 0,0012$); SUB kod skupina HC i AD u odnosu na skupine Qu₂₅ i Qu₅₀ ($P = 0,00013$). Područje malog mozga ima najmanju izraženost biljega Iba1. Biljeg je pojačano izražen kod skupine HC i AD u molekularnom sloju u odnosu na skupinu Qu₂₅ i Qu₅₀ ($P = 0,00013$) te u granularnom sloju u odnosu na skupinu AD + Qu₂₅, AD + Qu₅₀, Qu₂₅ i Qu₅₀ ($P = 0,046$).

Mikroglia stanice i astrociti su uključeni u upalni odgovor u središnjem živčanom sustavu (CNS). Mikroglije ostaju u mirovanju i pokazuju razgranatu morfologiju, jednom kada se aktiviraju prisustvom $A\beta$, veličina tijela stanice se povećava i broj procesa opada, dobivajući ameboidni oblik bez odsutnosti ili prisutnosti kraćih grana (517). Njihova sposobnost da zahvate peptide $A\beta$ smanjuje se, dok proizvodnja proupalnih medijatora povećava (517, 518). Nadalje, kvercetin reducira agregaciju $A\beta$ i imunoreaktivnost mikroglia u starih 3xTgAD miševa (homozigoti za APP (Swe), tau (P301L) i PS1 (M146V)) usporedno s Non-3xTgAD miševima (519).

Dobiveni rezultati pokazuju pojačanu izraženost biljega Iba1 kod skupine AD te visoku osjetljivost hipokampalne formacije zbog prisutne imunoreaktivnosti i kod HC skupine. Dobiveni rezultati su u skladu sa sličnim istraživanjima provedenim na animalnom modelu AlCl₃, gdje je imunoreaktivnost mikroglia stanica povećana u korteksu i hipokampalnoj formaciji kod skupina obrađenih AlCl₃ usporedno s kontrolnim skupinama. Nadalje aktiviranje mikroglia uzrokovano AlCl₃ značajno je inhibirano u skupini AD + Qu₂₅ i AD + Qu₅₀. Potpuno mirovanje uočeno je kod skupine Qu₂₅ i Qu₅₀ što je vidljivo iz prisustva malih ovalnih staničnih tijela.

Biljeg Iba1 važan je za formiranje snopova aktinskih niti, a time igra važnu ulogu u pokretljivosti mikroglia stanica. Da bi mikroglia stanice adekvatno vršile funkciju nadzora u CNS-u važna je dobra pokretljivost njihovih dugih ogranaka te pokretljivost samih stanica kada se javi potreba za interveniranjem. Prisustvo biljega Iba1 te odsustvo biljega CD68 i HLA-DR upućuju na ranu fazu bolesti. CD68 ima važnu ulogu u procesu fagocitoze, a HLA-DR u predočavanju antigena. Njihov povećani izražaj može dovesti do pretjerane aktivacije mikroglia stanica, a time i do štetnog utjecaja na neurone, što potvrđuju dosadašnja istraživanja AD (520-522).

5.5.2. Učinak subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na koncentraciju moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF-a) u tkivu mozga

BDNF igra važnu ulogu u regulaciji preživljavanja i diferencijaciji selektivne populacije neurona tijekom razvoja. Sintetiziraju ga pretežno neuroni CNS-a i visoko je eksprimiran u hipokampusu i korteksu, dvije moždane regije za koje se zna da su važne za učenje i pamćenje (523). BDNF ima trofične učinke na serotonergičke (5-HT) neurone u CNS-u. Zabilježeno je da smanjena ekspresija BDNF-a, koja održava normalne neuronske krugove u mozgu, ima važnu ulogu u razvoju nekoliko neurodegenerativnih bolesti (234). U prethodnim istraživanjima je zabilježeno smanjenje BDNF-a nakon Al-intoksikacije (524-526). Pored toga, Al oštećuje različite enzime koji su uključeni u biosintezu neuroprijenosnika i jedan od njegovih potencijalno toksičnih mehanizama djelovanja može biti poremećaj u serotonergičkim neuroprijenosima u hipokampusu mozga (85, 527). Stoga je razumno pretpostaviti da Al inhibira koncentraciju serotonina u mozgu bilo izravno, smanjujući njegovu biosintezu, bilo posredno, smanjivanjem razine BDNF, što ima trofične učinke na serotonergičke neurone (234).

Iz rezultata koncentracije BDNF-a (**Slika 50**) zabilježena je statistički značajno niža koncentracija kod skupine AD u odnosu na skupinu HC ($P = 0,006$) i skupinu Qu_{50} ($P = 0,00003$). Iz rezultat primjećujemo inhibitorni učinak svi ispitnih komponenti na koncentraciju BDNF-a u odnosu na HC skupinu sa statistički značajno nižom koncentracijom samo kod skupine AD. Kod skupine AD + Qu_{25} i AD + Qu_{50} vrijednosti su više u odnosu na skupinu AD te na istoj razini kao kod skupine Qu_{25} i Qu_{50} što upućuje da je Qu u mogućnosti poništiti nepoželjne učinke $AlCl_3$, ali istovremeno sam drži razinu BDNF-a suprimiranom za 26-24% usporedno s HC skupinom. U dosadašnjoj literaturi nisu navedeni slični rezultati, supresija BDNF nakon primjene Qu u odnosu na kontrolnu skupinu, da bi se usporedili s ovim istraživanjem te da dosada prikazani rezultati ne upućuju na mogući uzrok. Iz dosadašnjih istraživanja je utvrđeno da primjena kvercetin-3-O-glukuronida, koji je glavni metabolit kvercetina (528), povećava hipokampalnu neurogenezu kod odraslih miševa (529). Nadalje, davanje 14-16 mg kvercetina štakorima dnevno tijekom jednog mjeseca može pospješiti proliferaciju i diferencijaciju NSC-a (engl. *neural stem cells*) povećavajući ekspresiju BDNF-a (530). Kvercetin sprječava smanjenje ekspresije BDNF-a u hipokampusu štakora izloženih hipobaričnoj hipoksiji (531), i povećava broj stanica koje eksprimiraju dvostruki kortin (protein

odgovoran za migraciju neurona, DXN) u girusu hipokampusa odraslog štakora, izazivajući BDNF i mRNA ekspresiju (530).

5.5.3. Učinak subkronične primjene AlCl₃ + D-gal i Qu na aktivnost acetilkolinesteraze (AChE) u tkivu mozga

AChE hidrolizira acetilkolin u kolinergičkim sinapsama mozga i na neuromuskularnim spojnica u kolin i acetat. AChE je značajna biološka komponenta membrane koja pridonosi njezinoj cjelovitosti (234). Indukcija AChE aktivnosti uzrokuje bržu razgradnju acetilkolina i posljedično smanjenu stimulaciju acetilkolinskih receptora, što rezultira smanjenjem različitih kolinergičnih (učenje i pamćenje), kao i ne-kolinergičkih (stanična proliferacija i neuritski rast) funkcija (532, 533).

U rezultatima ovoga istraživanja zabilježena je povišena aktivnost AChE (**Slika 51**) kod skupine AD u odnosu na HC ($P = 0,0026$) te bez statističke značajnosti u odnosu na skupine AD + Qu₂₅, AD + Qu₅₀, Qu₂₅ i Qu₅₀ ($P \geq 0,05$). Nedavno istraživanje je pokazalo da povećana razina AChE predstavlja uvod u oksidacijski stres (240). U ovom istraživanju primijećeno je značajno povećanje AChE u skupini AD, što ukazuje na oslabljenu kolinergičku funkciju, što je u skladu s literaturnim prikazom (241). Iz dosadašnjih istraživanja, subkronično uzimanje Al značajno je induciralo AChE aktivnost u mozgu (532, 534). Al pokazuje svoje kolutoksične učinke blokirajući dostupnost acetyl-CoA ili ometajući aktivnost kolin acetiltransferaze (ChAT) (535). Također, Al može komunicirati s membranskim lipidima plazme i utjecati na aktivnost enzima povezanih s membranom, uključujući AChE. Povećanje moždane AChE aktivnosti nakon izloženosti Al štakora je pripisano alosternoj međureakciji između Al i perifernog anionskog mjesta molekule enzima (536). Dosadašnja *in vitro* (537) i *in vivo* (538) istraživanja pokazala su da inhibitorni učinak Qu na aktivnost AChE ovisi o primijenjenoj dozi Qu. U *in vivo* istraživanju se pokazalo da samo kvercetin u visokim dozama (300 mg/kg) značajno smanjuje AChE aktivnost što rezultira povećanjem raspoloživog acetilkolina (538-540). Međutim, rezultati ovog istraživanja također su pokazali povoljan učinak na memoriju u donje dvije doze kvercetina (100 i 200 mg/kg), ali bez značajne supresije AChE (538). Stoga aktivnost AChE možemo koristiti kao neizravnog pokazatelja za procjenu kolinergičkog sustava.

5.6. Praćenje učinka subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu u nastanku neuroupale

5.6.1. Učinka subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na relativni indeksa mozga

Relativni indeks mozga je omjer mase mozga i tjelesne mase štakora te u ovome istraživanju služi kao pokazatelj edema nastalog uslijed negativnog djelovanja $AlCl_3$ na propusnost BBB i razvoj upale djelovanjem ROS-a i RNS-a.

U ovome istraživanju (**Slika 52**) zapažen je viši relativni indeks mozga kod ispitnih skupina AD, AD + Qu₂₅ i Qu₅₀, ali bez statistički značajnog odstupanja ($P \geq 0,05$) u odnosu na skupinu HC. Statistički značajno odstupanje ($P \geq 0,05$) u odnosu na skupinu HC nije zapaženo niti u skupini AD + Qu₅₀ i Qu₂₅. Temeljem navedenog možemo zaključiti da niti jedna ispitna komponenta nije ozbiljno utjecala na razvoj edema uslijed narušavanja propusnosti BBB ili razvoja upale.

Edem mozga nakon poremećaja krvno-moždane barijere (BBB) ili vazogeni edem prisutan je u većini slučajeva edema mozga. Prema Starlingovom zakonu, voda, ioni i proteini plazme prelaze BBB prema intersticiju ako su pokretačke snage za transmuralni protok velikih količina (mehaničko podrijetlo) i/ili ako je povećana propusnost BBB-a (kemijsko podrijetlo). Oba mehanizma postoje u većini slučajeva. Propusnost BBB može se poboljšati trenutnim (kemijskim posrednicima) ili odgođenim (staničnom infiltracijom) upalnim odgovorom, ili promjenom cjelovitosti membrane. To kasnije može biti prolazno (hiperosmolarni poremećaj BBB) ili trajno aktiviranjem matrične metaloproteinaze ili neovaskularizacijom s BBB raspadom (541).

5.6.2. Učinak subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na koncentraciju nitrita (NO_2^-) u tkivu mozga

Dušikov oksid (NO) je slobodni radikal, koji kao signalna molekula ima ključnu ulogu u mnogim fiziološkim i patološkim stanjima (542, 95). U biološkom tkivu njegovo poluvrijeme života iznosi oko 5 sekunda, a koncentracija u krvi posljedica je ravnoteže između stvaranja NO-a s pomoću NO sintaza i vezanja NO-a na hemoglobin i tione u procesu nitrozacije te pretvorbe u nitrite, NO_2^- i nitrate, NO_3^- (543). Djelovanje NO očituje se u stanici u kojoj nastaje, kao i u susjednim stanicama jer je izrazito lipofilan te brzo difundira kroz staničnu membranu (544). Brojne stanice sisavaca sintetiziraju NO oksidacijom L-arginina ($L\text{-arginin} + 3/2 NADPH + H^+ + 2O_2 \leftrightarrow \text{citrulin} + NO + 3/2 NADP^+$) pomoću enzima dušik oksid sintaze, NOS (206). U organizmu postoje tri izoforme ovog enzima: neuronska NOS (nNOS ili NOS1), inducibilna NOS (iNOS ili NOS2) i endotelna NOS (eNOS ili NOS3), i svaka od njih može biti izražena u različitim tkivima i tipovima stanica (545). Dvije izoforme su tzv. konstitutivne NOS ili cNOS: a) eNOS, primarno je smještena na membrani endotelnih stanica krvnih žila te u trombocitima i nekim živčanim stanicama mozga i b) nNOS, primarno je smještena u citosolu živčanih stanica središnjeg i perifernoga živčanog sustava te u citosolu epitelnih stanica bronha i traheje, kao i u skeletnom mišiću (543). Navedene sintaze normalno su prisutne u stanicama i proizvode NO kontinuirano u malim količinama (nmol), njihova aktivnost ovisi samo o promjeni koncentracije Ca^{2+} (543). Tako stvoreni NO je važan medijator homeostatskih procesa. Aktivnost iNOS je neovisna o promjenama unutarstanične koncentracije Ca^{2+} , sintetiziraju je makrofagi i leukociti aktivirani vanjskim čimbenicima, kao što su endotoksini bakterija, medijatori upale i različiti citokini (543).

U ovome istraživanju zabilježena je statistički značajno povišena koncentracija nitrita (**Slika 53**) kod skupine AD u odnosu na skupine HC, AD + Qu₂₅ i AD + Qu₅₀ ($P = 0,04$).

Povišena koncentracija nitrita u AD skupini ukazuje na modulacijske učinke $AlCl_3$ sukladna rezultatima istraživanja gdje se proizvodnja metabolita dušičnog oksida (NO), nitrita (NO_2^-) i nitrata (NO_3^-), u cerebrospinalnoj tekućini bolesnika s AD povećava u ranoj fazi bolesti, a zatim smanjuje kako napreduje gubitak neuronskih stanica, što dijelom može doprinijeti degeneraciji neurona (546). U dosadašnjem prikazu rezultata ovoga istraživanja nalazimo poveznicu i s prisutnom disregulacijom Ca^{2+} u tkivu mozga, gdje je razina Ca^{2+} kod AD skupine 16 puta viša od razine Ca^{2+} u HC skupini. Što upućuje na progresivni gubitak fluidnosti membrane, smanjen

membranski potencijal i povećanu propusnost za ione poput Ca^{2+} uzrokovano lipidnom peroksidacijom što je dokazno u nekoliko istraživanja koja su pratila učinke ROS-a na mozak i neurodegenerativne promjene (448, 449, 540-542, 225). Oksidacijski stres može se pojaviti uslijed povećane proizvodnje slobodnih radikala ili uklanjanja slobodnih radikala te smanjenog ili povećanog popravka modificiranih makromolekula. Ova neravnoteža rezultira nakupljanjem oksidacijski modificiranih molekula koje mogu uzrokovati staničnu disfunkciju i smrt neurona. Nadalje, iz prikazanih rezultata je vidljiv i supresijski učinak Qu na modulacijske učinke AlCl_3 , gdje jer razina NO_2^- nakon primjene Qu vraćena u normalu. Iz navedenog možemo zaključiti da je Qu sposoban poništiti toksične učinke AlCl_3 u visoko osjetljivom tkivu mozga što je potvrđuju prethodna istraživanja gdje je Qu pokazao sposobnost inhibicije ksantin oksidaze i peroksidacije lipida *in vitro* (547-551). Nadalje, kvercetin pouzdano djeluje na neuroprotektivne učinke protiv toksičnosti izazvane teškim metalima (483, 542, 552) i povećava otpornost neurona na oksidacijski stres i ekscitotoksičnost modulacijom mehanizama stanične smrti (553, 554). Ostala ispitivanja kvercetina pokazala su da on ima protuupalni učinak (555) inhibiranjem iNOS-a (556) i reguliranjem ekspresije COX-2 (557, 558), kao i anti-proliferativni učinak na neke vrste raka (559, 560), putem mehanizama koji aktiviraju stanično starenje, apoptozu (561) i autofagiju (562). Nadalje, utvrđena je njegova sposobnost prodiranja kroz krvno-moždanu barijeru (551, 563) te njegov zaštitni učinak protiv ishemije (564), ateroskleroze (565) i AD (453).

5.6.3. Učinak subkronične primjene AlCl_3 + D-gal i Qu na aktivnosti arginaze (Arg) u tkivu mozga

Arginaza je središnji enzim urea ciklusa, sadrži mangan koji katalizira pretvorbu arginina u ureu i ornitin. Kod većine sisavaca prisutne su dvije izoforme Arg, a razlikuju se po raspodjeli u tkivima i subcelularnoj lokalizaciji. Arginaza I je citoplazmatski protein koji se pretežno izražava u jetri gdje katalizira peti i posljednji korak urea ciklusa. Arginaza II je protein mitohondrija sa širokom raspodjelom tkiva čija funkcija može uključivati metabolizam NO i poliamina (566). Prisutnost Arg I i II u mozgu, posebno u hipokampalnim neuronima, potvrđena je imunohistokemijskom analizom mozga štakora (567) i miša (568). Nedavna istraživanja identificirala su funkciju arginaze u mozgu i povezala ovaj enzim s razvojem neurodegenerativnih bolesti. Pokazalo se da poremećena regulacija arginaze doprinosi

endotelnoj disfunkciji, ishemijsko-reperfuziji, aterosklerozi, dijabetesu i neurodegeneraciji (569-573).

U ovome istraživanju zabilježena je statistički povišena koncentracija Arg (**Slika 54**) u homogenatu tkiva mozga kod skupine AD u odnosu na skupine HC i AD + Qu₅₀ ($P = 0,003$) te kod skupine AD + Qu₂₅ u odnosu na skupinu HC ($P = 0,04$).

Iako se pokazalo da je arginaza neuroprotektivni čimbenik i podržava neuroregeneraciju *in vitro* (574, 575), nedavna istraživanja pokazuju da arginaza ima ulogu u patogenezi AD i drugih metaboličkih bolesti (576). Prvo, primijećena je značajno smanjena razina L-arginina u kori velikog mozga bolesnika s AD (577). Uz to, aktivnost i ekspresija NOS-a i arginaze značajno se mijenjaju u mozgu AD-a na način specifičan za regiju. Naime, aktivnost arginaze značajno je veća, a aktivnost NOS-a niža u hipokampusu bolesnika s AD (578). U našem istraživanju vrijednosti NO₂- i Arg prate jedna drugu i ovisne su o provedenoj obradi, najviše vrijednosti su zabilježene kod AD skupine, što upućuje na poremećenu ravnotežu u NOS i Arg signalnom putu uslijed primjene AlCl₃. Naime, dosadašnja istraživanja su potvrdila da je Arg sposobna smanjiti proizvodnju NO smanjenjem dostupnosti L-arginina za NOS (579). Nadalje, primjenom Qu u dozi 50 mg/kg kod skupine AD + Qu₅₀ zabilježeno je vraćanje vrijednosti Arg u normalu. Kod skupine AD + Qu₂₅ vrijednosti su niže usporedno s AD skupinom, ali još uvijek značajno više u odnosu na HC skupinu. Stoga možemo zaključiti da je aktivnost Arg, promijenjenu primjenom AlCl₃, moguće uspješno ili manje uspješno modulirati primjenom određene doze Qu. Mehanizam kojim Qu inhibira aktivnost Arg do sada je opisan samo na *in vitro* modelu rekombinantne arginaze iz parazita *Leishmania amazonensis* (580, 581). Pokazalo se da je Qu miješani inhibitor koji djeluje u međureakciji sa supstratom L-arginin i kofaktorom Mn²⁺ pri čemu uklanjaju katekolna grupu s Asp129, koji sudjeluje u stvaranju metalnog mosta Mn²⁺-Mn²⁺ na aktivnom mjestu arginaze (580, 581). Ne postoji literatura s kojom bi mogli usporediti rezultate ovoga istraživanja, tj. istraživanja u kojima je istražen utjecaj Qu na Arg u tkivu mozga. Međutim, potvrđeno je da Qu može inhibirati aktivnost Arg u jetri nakon *ip* primjene AlCl₃ (582). Pokazalo se da inhibicija arginaze preokreće disfunkciju neurona i mikrogliozu uzrokovanu amiloidima i sprječava razvoj drugih simptoma AD u modelima AD kod glodavaca (566).

5.6.4. Učinak subkronične primjene $AlCl_3$ + D-gal i Qu na proupalne i protuupalne citokine u tkivu mozga

Upala mozga je neuropatološki događaj koji se odnosi na AD. Pogrešno sabijeni i agregirani proteini vežu se na receptore za prepoznavanje obrazaca mikroglia i astroglia te pokreću imunosni odgovor, oslobađajući brojne upalne citokine i kemokine (78, 583). Za razliku od oksidacijskog stresa, koji je kratkotrajan, kronična upala je dugotrajna, što rezultira stalnim oslobađanjem upalnih medijatora. Već je dokazano da Qu inhibira neuroupalu smanjujući proizvodnju dušikovog oksida, ekspresiju gena iNOS u mikroglia stanicama, proizvodnju upalnih citokina poput TNF- α , IFN- γ , interleukina-1 (IL-1), IL-6, IL-12 i COX-2 u aktiviranim makrofagima, kao i smanjenje ekspresije citokina (453). Kvercetin također smanjuje JNK/Jun fosforilaciju i inhibira stvaranje TNF- α u miševima, štiteći neurone od upale izazvane LPS-om (259).

Sam $A\beta$ može inducirati ekspresiju nekoliko proupalnih citokina, poput interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, TNF- α i IFN- γ u glialnim stanicama, što dovodi do začaranog ciklusa (584-589). U ovom istraživanju (**Tablica 15**) zabilježene su povišene vrijednosti proupalnih citokina (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-12, IFN- γ , TNF- α i GM-CSF) i protuupalnih citokina (IL-4, IL-10, IL-13) kod skupine AD u odnosu na skupinu HC ($P < 0,05$). Nekoliko kemokina poput CCL2, CXCL8 (IL-8), CXCL10 (IL-10) i CCL5 (RANTES, odgovoran za reguliranje i aktivaciju T stanica) također se proizvode kao odgovor na taloženje $A\beta$ peptida koji je odgovoran za novačenje perifernih imunosnih stanica (589). Nadalje, tijekom upalnog stanja, nerezidentne stanice središnjeg živčanog sustava kao periferne imunosne stanice s kemokinskim receptorima mogu prijeći BBB i pridonijeti upalnom odgovoru u AD mozga (590, 591). Uspostavljeni upalni događaji dovode i do sinaptičkih i neuronskih oštećenja te tako doprinose neurodegeneraciji. Prisustvo visoke razine proupalnih i protuupalnih citokina u AD skupini uz prisustvo visoke razine NO₂- i Arg dugoročno bi mogla voditi k razvoju kronične upale i ubrzanju neurodegenerativnih promjena.

Protektivni učinci Qu u ovome istraživanju vidljivi su iz rezultata skupine AD + Qu₂₅ gdje je razina upalnih citokina i kemokina vraćena u normalu, tj. nema statistički značajnog odstupanja usporedno s HC skupinom. Slični rezultati su zabilježeni i kod skupine AD + Qu₅₀ gdje je značajno povišena vrijednost IL-4 ($P = 0,03$) i RANTES ($P = 0,01$) u odnosu na skupinu HC. Vargas-Restrepo i sur (519) potvrdili su protuupalni učinak kvercetina kroz smanjenje imunoreaktivnosti mikroglia stanica, GFAP-a (engl. *glial fibrillary acidic protein*), iNOS-a,

COX-2, IL-1 β i intenzitet fluorescencije $A\beta$ agregata u hipokampalnoj formaciji CA1 kod 3xTg-AD. Nadalje, Qu (30 mg/kg/7 dana *ip*) je sposoban poništiti proupalne učinke LPS-a (lipopolisahard G(-) bakterija odgovoran za upalne procese) kroz značajno smanjenje upalnih biljega Iba1, GFAP, TLR4 i IL-1 β (454). Dokazi *in vivo* i *in vitro* potvrdili su da se na LPS veže TLR-4, izazivajući aktiviranu gliozu, što posljedično posreduje NF-kB kaskadno aktiviranje, koje igra ozbiljnu ulogu u aktiviranju upale i procesa neurodegeneracije (592, 593). Xu i sur. izvijestili su da rutin (kvercetin-3-rutinozid) smanjuje agregaciju $A\beta$, proizvodnju NO i proupalnih citokina, citotoksičnost i oksidacijski stres *in vitro* (594). Dodatno su istražili i njegove *in vivo* neuroprotektivne učinke na AD-transgeničnim miševima gdje su pokazali prigušenje memorijskog deficita, povećanje antioksidacijskih parametara kao smanjeni glutation i super-oksid-dismutazu, smanjenje nivoa peroksidacije lipida (MDA), kao i smanjena razina IL-1 β i IL-6 u mozgu (595). Iz navedenih rezultata možemo zaključiti da je AlCl₃ čimbenik koji može potaknuti proupalni odgovor u tkivu mozga te da obje ispitne doze Qu imaju protektivni učinak u smanjenju upale izazvane AlCl₃.

5.7. Praćenje učinka subkronične primjene AlCl₃ + D-gal i Qu na motoričku i senzornu percepciju

Dan prije početka obrade i 24 sata po završetku istoge učinjena je procjena neurološkim pregledom (engl. *neurological screening*, NS). NS je sačinjen od niza neuroloških refleksnih testova: uspravljanje nakon što se postavi na dorzalnu stranu; treptaj očiju (odgovor na lagani dodir vanjskog kuta oka tankim kistom), trzanje ušiju i povlačenje udova kao odgovor na taktilne podražaje (lagani dodir s prstom lateks rukavice); usmjeravajući odgovor njuha (izloženost ekstratu naranče) i vizualni podražaj (svjetiljka); i zaprepašteni odgovor nakon auditornog podražaja (metalni kliker). Konačna procjena neurološkog deficita je temeljena na odsustvu ili prisustvu odgovora na podražaj. Analizom rezultat neurološkog pregleda (n = 10) nisu zabilježena odstupanja prilikom procjene motoričke i senzorno percepcije (**Tablica 16**). Na temelju rezultata možemo zaključiti kako primjena AlCl₃ + D-gal nije uzrokovala promjene koje bi se mogle utvrditi neurološkim pregledom ili koje bi utjecale na svakodnevne aktivnosti animalnog modela korištenog u ovome istraživanju.

Rezultati našega rada potvrđuju povezanost i postojanje brojnih mehanizama koji utječu na homeostatske procese u organizmu domaćina i osjetljivost moždanog tkiva u ovisnosti o osi crijevna mikrobiota - crijeva - mozak. Subkronična primjena $AlCl_3$ i D-gal uzrokovala je narušavanje crijevne homeostaze i disfunkciju crijevne mikrobiote što je posljedično prouzrokovalo daljnju neravnotežu u cijelome organizmu; pojačani oksidacijski stres, upalu, promjene homeostaze esencijalni i toksičnih elemenata, gubitak tjelesne mase i narušene homeostatske procese u CNS-u kod ispitnih skupina koje su obrađene aluminijskim kloridom i D – galaktozom. Narušeni homeostatski procesi u CNS-u doveli su do razvoja neurodegenerativnih promjena koje bi mogle odgovarati ranoj fazi AD. Nadalje, kvercetin se pokazao kao flavonoid s obećavajućim terapijskim potencijalom u očuvanju crijevne homeostaze i cjelovitosti crijevnoga endotela. Zahvaljujući protuoksidacijskim i protuupalnim svojstvima inhibiran je gubitak neurona u kori i hipokampalnoj formaciji mozga, uočen je inhibitorni učinak na agregaciju $A\beta$ – plakova i mikroglija stanice te proupalne citokine u CNS-u.

Dobiveni rezultati pokazuju mogućnost novog farmakoterapijskog pristupa u terapijskoj prevenciji neurodegenerativnih promjena u kojem laka dostupnost, ekonomska isplativost i nedostatak toksičnosti mogu biti prednost u primjeni flavonoida. Nadalje ovo istraživanje pridonosi boljem razumijevanju odnosa između prehrane i zdravlja s posebnim osvrtom na GBA te razvoja koncepta funkcionalne hrane s temeljnim ciljem postizanja boljeg zdravstvenog statusa, spriječavanja i liječenja bolesti.

6. ZAKLJUČAK

Temeljem dobivenih rezultata možemo izvesti zaključke kako slijedi:

1. Subkronična primjena 10 mg/kg tm AlCl_3 i 60 mg/kg tm D-gal tijekom 28 dan *ip* na štakorskom animalnom modelu dovela je do narušavanja homeostatskih procesa na korelaciji GBA što je vidljivo na temelju:
 - gubitka tjelesne mase;
 - neformirane stolice praćene porastom udjela porodice *Peptostreptococcaceae*;
 - snižene pH vrijednosti crijevnoga sadržaja;
 - snižene glikolitičke aktivnosti β -glukuronidaze, β -glukozidaze i β -galaktozidaze;
 - smanjenog rasta probiotičkih kolonija roda *Lactobacillus* i *Bifidobacter* na selektivnim podlogama;
 - promijenjenog sastava ekologije crijevne mikrobiote na razini koljena i porodice u crijevnome sadržaju kolona;
 - smanjenog udjela probiotičkih rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacter* u crijevnome sadržaju kolona;
 - povišenih vrijednosti zonulina (ZON), biljega propusnosti IEB i BBB, u crijevnome sadržaju, serumu i tkivu mozga;
 - povišenih vrijednosti Al u serumu i tkivu mozga zbog neučinkovitog uklanjanja iz organizma;
 - povišenih vrijednosti Ca u tkivu mozga što za posljedicu ima poremećen metabolizam i signalizaciju Ca^{2+} te ekscitotoksični učinak;
 - povišenih parametara oksidacijskog stresa u tkivu mozga: razina karboniliranih proteina (PC) i malondialdehida (MDA);
 - smanjenog kapacitete antioksidacijske zaštite u tkivu mozga: snižena koncentracija ukupnog GSH;
 - poremećenih odnosa antioksidacijskih enzima u tkivu mozga: smanjen aktivnost SOD i povišena aktivnost CAT;
 - prisutnih neurohistopatoloških promjena: gubitak stanica u kori velikoga mozga i CA1 području hipokampalne formacije te prisustvo difuznih $A\beta$ plakova u kori velikoga mozga, hipokampusu i malome mozgu;
 - prisustva neuropatofizioloških promjena: snižena koncentracija BDNF-a pokazatelj je narušene regulacije preživljavanja i diferencijacije selektivne populacije neurona

i povišena aktivnost AChE koja je pokazatelj uvoda u oksidacijski stres i oslabljenu kolinergičku funkciju;

- prisutnosti neuroupale : povišena vrijednost nitrita i arginaze (Arg) dovela je do aktivacije mikroglija stanica u području kore velikoga mozga, hipokampusa i maloga mozga (pozitivan Iba1 biljeg) te povišenih vrijednosti proupalnih i protuupalnih citokina.

2. Subkronična primjena Qu u dozi 25 i 50 mg/kg tm u kombinaciji s 10 mg/kg tm AlCl₃ i 60 mg/kg tm D-gal tijekom 28 dan *ip* na štakorskom animalnom modelu ima i nepovoljno sinergijsko djelovanje:

- dodatni gubitak tjelesne mase;
- nemogućnost formiranja stolice praćeno gubitkom adhezivne sposobnosti probiotičkog roda *Lactobacillus*;
- gubitak u udjelu crijevnog mikrobioma kod porodice *Christensenellaceae* korelira s gubitkom tjelesne mase;
- povećan udio porodice *Desulfovibrionaceae* kod skupine AD + Qu₅₀ upućuje na nestabilnost IEB.

3. Pozitivni modulacijski učinci kvercetina u dozi 25 i 50 mg/kg tm na narušenu crijevnu homeostazu i disfunkciju crijevne mikrobiote uzrokovane primjenom AlCl₃ i D-gal temeljeni su na:

- stvaranju povoljnih uvjeta za komezalne bakterije u crijevima održavajući neutralni pH;
- modulacijskom učinku kvercetina 25 mg/kg tm na AlCl₃ inhibiranu glikolitičku aktivnost β -glukuronidaze, β -glukozidaze i β -galaktozidaze;
- gubitaku bakterija iz porodice *Lactobacillaceae* kompenziranom porastom udjela porodice: *Bifidobacteriaceae* čime je umanjena mogućnost konolizacije patogenim sojevima i *Ruminococcaceae* koja ima regulacijsko protuupalnu ulogu u crijevima;
- nepromijenjenom udjelu porodice *Bacteroidales* u crijevnome mikrobiomu koja je indikator stabilnosti crijevne mikrobiote i epitela;
- odsustvu porodice *Porphyromanadaceae* koja je pokazatelj povoljnog utjecaja na protuupalni odgovor u CNS-u;

- smanjenoj koncentraciji ZON u crijevnome sadržaju kod skupine AD + Qu₂₅ i AD + Qu₅₀ (bez statističke značajnosti) u odnosu na skupinu AD.
4. Pozitivni modulacijski učinci kvercetina u dozi 25 i 50 mg/kg tm na narušenu homeostazu i nastalu neuropatologiju uzrokovanu primjenom AlCl₃ i D-gal. Navedeno temeljimo na:
- potencijalnom učinku u održavanju stabilnosti BBB (niža koncentracija ZON i Al);
 - nižim vrijednostima Ca u tkivu mozga;
 - sniženim parametarima oksidacijskog stresa u tkivu mozga: razine PC i MDA
 - pojačanom kapacitetu antioksidacijske zaštite u tkivu mozga: povišena koncentracija ukupnog GSH i aktivnost SOD;
 - blažim neurohistopatološkim promjenama: manji gubitak stanica u CA1 području hipokampalne formacije te manji broj difuznih A β plakova u kori velikoga mozga, hipokampusu i malome mozgu;
 - blažim ili odsutnim neuropatofiziološkim promjenama: koncentracija BDNF-a je u porastu, a aktivnost AChE vraćena u normalne granice;
 - odsustvu neuroupale: inhibitorni učinak na koncentraciju nitrita i aktivnost Arg, izostanak imunoreaktivnosti mikroglia stanica (kora velikoga mozga, hipokampus i mali mozak), djelomična ili potpuna inhibicija proupalnih citokina.
5. Temeljem svega navedenog kvercetin i hrana bogata kvercetinom može biti korisna u poništavanju toksičnih učinaka AlCl₃ i D-gal na homeostazu i razvoj patologije u probavnom sustavu i CNS-u kao i u prevenciji istih.
6. Dobiveni rezultati ukazuju na mogućnost novog farmakoterapijskog pristupa u terapiji rane faze AD, kao i drugih neurodegenerativnih promjena nastalih djelovanjem ROS-a i upalnih čimbenika te moguće bioiskoristivosti flavonoida. Potvrda biološke učinkovitosti flavonoida u međureakcijama hrana-lijek, hrana-toksin, hrana-hrana te novi pristup i napredak u razumijevanju odnosa između prehrane i zdravlja na razini GBA vodi k razvoju koncepta funkcionalne hrane s temeljnim ciljem postizanja boljeg zdravstvenog statusa, sprječavanja i liječenja bolesti uključujući AD i upalne bolesti crijeva.

7. LITERATURA

1. Lyness SA, Zarow C, Chui HC (2003) Neuron loss in key cholinergic and aminergic nuclei in Alzheimer disease: A meta-analysis. *Neurobiol Aging* 24: 1-23.
2. Šimić G, Leko Babić M, Wray S, Harrington C, Delalle I, Jovanov-Milošević N, Bažadona D, Buée L, de Silva R, Di Giovanni G, Wischi C, Hof PR (2017) Monoaminergic Neuropathology in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 151: 101-138.
3. Hope T, Keene J, Gedling K, Cooper S, Fairburn C, Jacoby R (1997) Behaviour changes in dementia 1: Point of entry data of a prospective study. *Int J Geriatr Psychiatry* 12: 1062-1073.
4. Hill JM, Clement C, Pogue AI, Bhattacharjee S, Zhao Y, Lukiw WJ (2014) Pathogenic microbes, the microbiome, and Alzheimer's disease (AD). *Front Aging Neurosci* 6 (127).
5. Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H (2006) Alzheimer's disease. *Lancet* 368: 387-403.
6. Yiannopoulou KG, Papageorgiou SG (2013) Current and future treatments for Alzheimer's disease. *Ther Adv Neurol Disord* 6: 19-33.
7. Bhattacharjee S, Lukiw WJ (2013) Alzheimer's disease and the microbiome. *Front Cell Neurosci* 7 (153).
8. Saulnier DM, Ringel Y, Heyman MB, Foster JA, Bercik P, Shulman RJ, Versalovic J, Verdu EF, Dinan TG, Guarner F (2013) The intestinal microbiome, probiotics and prebiotics in neurogastroenterology. *Gut microbes* 4 (1): 17-27.
9. Jiang C, Li G, Huang P, Liu Z, Zhao B (2017) The gut microbiota and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 58: 1-15.
10. Wang Y, Kasper LH (2014) The role of microbiome in central nervous system disorders. *Brain Behav Immun* 38: 1-12.

11. Schneider I, Bucar F (2005) Lipoxygenase inhibitors from natural plant sources. Part 1: Medicinal plants with inhibitory activity on arachidonate 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase[sol]cyclooxygenase. *Phytother Res* 19 (2): 81-102.
12. Mulabagal V, Subbaraju GV, Rao CV, Sivaramakrishna C, Dewitt DL, Holmes D, Sung B, Aggarwal BB, Tsay HS, Nair MG (2009) Withanolide sulfoxide from *Aswagandha* roots inhibits nuclear transcription factor-kappa-B, cyclooxygenase and tumor cell proliferation. *Phytother Res* 23 (7): 987-992.
13. Van Hoorn DE, Nijveldt RJ, Van Leeuwen PA, Hofman Z, M'Rabet L, De Bont DB, Van Norren K (2002) Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids. *Eur J Pharmacol* 451 (2): 111-118.
14. Samhan-Arias AK, Martín-Romero FJ, Gutiérrez-Merino C (2004) Kaempferol blocks oxidative stress in cerebellar granule cells and reveals a key role for reactive oxygen species production at the plasma membrane in the commitment to apoptosis. *Free Radic Biol Med* 37 (1): 48-61.
15. Yazawa K, Kihara T, Shen H, Shimmyo Y, Niidome T, Sugimoto H (2006) Distinct mechanisms underlie distinct polyphenol-induced neuroprotection. *FEBS Lett* 580 (28-29): 6623-6628.
16. Boyle SP, Dobson VL, Duthie SJ, Hinselwood DC, Kyle JA, Collins AR (2002) Bioavailability and efficiency of rutin as an antioxidant: a human supplementation study. *Eur J Clin Nutr* 54 (10): 774-782.
17. Woo ER, Lee JY, Cho IJ, Kim SG, Kang KW (2005) Amentoflavone inhibits the induction of nitric oxide synthase by inhibiting NFkappaB activation in macrophages. *Pharmacol Res* 51 (6): 539-546.
18. Huber A, Stuchbury G, Bürkle A, Burnell J, Münch G (2006) Neuroprotective therapies for Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des* 12 (6): 705-717.

19. Mira L tereza Fernandez M, Santos M, Rocha R, Helena Florêncio M, Jennings KR (2002) Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free radical research* 36 (11): 1199-1208.
20. de Souza RFV, de Giovani WF (2004) Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. *Redox Report* 9 (2): 97-104.
21. Boots AW, Haenen GR, Bast A (2008) Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol* 13 (585): 325-337.
22. Lee JC, Kim J, Park JK, Chung GH, Jang YS (2003) The antioxidant, rather than prooxidant, activities of quercetin on normal cells: quercetin protects mouse thymocytes from glucose oxidase-mediated apoptosis. *Exp Cell Res* 291 (2): 386-397.
23. Snyder JM (2018) Nervous system. U: Treuting PM, Dintzis SM, Montine KS (eds.) *Comparative Anatomy and Histology*, 2nd edn. Elsevier, 404-444.
24. <http://www.hiim.unizg.hr/index.php/udzbenik-temelji-neuroznanosti>
25. Li H, Park JH, Yan B, Yoo KY, Lee C, Choi J, Hwang I, Woon MH (2011) Neuroprotection of alpinia katsumadai seed extract against neuronal damage in the ischemic gerbil hippocampus is linked to altered brain-derived neurotrophic factor. *Lab Anim Res* 27: 67-71.
26. <http://dementia.hiim.hr/neuro.htm>
27. Hippus H, Neundörfer G (2003) The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues Clin Neurosci* 5: 101-108.
28. Berrios GE (1990) Alzheimer's disease: A conceptual history. *Int J Geriatr Psychiatry* 5: 355-365.
29. Maurer K, Volk S, Gerbaldo H (1997) Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet* 349: 1546-549.

30. Malnar M, Košiček M, Hećimović S (2009) Alzheimerova bolest: od molekularnog mehanizma do rane dijagnoze. *Medicina* 2009 45 (3): 234-243.
31. <http://www.worldalzreport2015.org>
32. Alzheimer's Association (2014) Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* 10: 2. <https://www.alzheimers.org.uk/dementiauk>
33. Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, Dubois B, Feldman HH, Fox NC, Gamst A, Holtzman DM, Jagust WJ, Petersen RC, Snyder PJ, Carrillo MC, Thies B, Phelps CH (2011) The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on. *Alzheimers Dement* 7: 270-279.
34. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Kawas CH, Klunk WE, Koroshetz WJ, Manly JJ, Mayeux R, Mohs RC, Morris JC, Rossor MN, Scheltens P, Carrillo MC, Thies B, Weintraub S, Phelps CH (2011) The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7: 263-269.
35. Sardi F, Fassina L, Venturini L, Inguscio M, Guerriero F, Rolfo E, Ricevuti G (2011) Autoimmunity Reviews Alzheimer's disease, autoimmunity and inflammation. The good, the bad and the ugly. *Autoimmun Rev* 11: 149-153.
36. Jack CR, Albert MS, Knopman DS, McKhann GM, Sperling RA, Carrillo MC, Thies B, Phelps CH (2011) Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7: 257-262.
37. Hardy JA, Higgins GA, Hardy JA, Higgins GA (1992) Alzheimer's Disease : The Amyloid Cascade Hypothesis. *Science* 256: 184-185.

38. Braak H, Braak E (1991a) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82: 239-259.
39. Bierer LM, Patrick R, Schmeidler J, Perl DP, Carlin L (1995) Neocortical neurofibrillary tangles correlate with dementia severity in Alzheimer's Disease. *Arch Neurol* 52: 81-88.
40. Palmer AM (2002) Pharmacotherapy for Alzheimer's disease : progress and prospects. *Trends Pharmacol Sci* 23: 426-433.
41. Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 4245-4249.
42. Hardy J (2009) The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal. *J Neurochem* 110: 1129-1134.
43. Asionowski MAJ, Aass CHH, Ahrenholz FALKF (1999) Constitutive and regulated α -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 3922-3927.
44. Vassar R, Bennett BD, Babu-khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M (1999) β -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Sci* 286: 735-741.
45. Tokuda T, Fukushima T, Ikeda S, Sekijima Y, Shoji S, Yanagisawa N, Tamaoka A (1997) Plasma Levels of amyloid β proteins $A\beta_{1-40}$ and $A\beta_{1-42(43)}$ are elevated in Down's syndrome. *Ann Neurol* 41: 271-273.
46. Selkoe DJ (2001) Alzheimer's Disease : genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81 (2): 741-66.

47. Hardy J, Allsop D (1991) Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 12: 383-388.
48. Braak H, Braak E (1991) Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections. *Brain Pathol* 1: 213-216.
49. Braak E, Braak H, Mandelkow E (1994) A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta Neuropathol* 87: 554-567.
50. Bliss TVP, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361: 31-39.
51. Martin SJ, Morris RGM (2002) New Life in an Old Idea : the synaptic plasticity and memory hypothesis revisited. *Hippocampus* 12: 609-636.
52. Robbins TW, Murphy ER (2006) Behavioural pharmacology : 40 + years of progress, with a focus on glutamate receptors and cognition. *Trends Pharmacol Sci* 27: 141-148.
53. Davies P, Maloney AJ (1979) Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 308: 1403.
54. Schliebs R, Arendt T (2011) The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav Brain Res* 221: 555-563.
55. Palmer AM (1996) *Neurochemical Studies of Alzheimer's Disease* 5: 381-391.
56. Mega MS, Cummings JL, Fiorello T, Gornbein J (1996) The spectrum of behavioral changes in Alzheimer's. *Neurology* 46: 130-135.
57. Braak E, Griffing K, Arai K (1999) Neuropathology of Alzheimer's disease : What is new since Alzheimer?. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 249: 14-22.
58. Bird TD (2008) Genetic aspects of Alzheimer disease. *Genet Med* 10 (4): 231-239.

59. Murphy MP, LeVine III H (2010) Alzheimer's disease and the β -amyloid peptide. *J Alzheimers Dis* 19: 1-17.
60. Dong S, Duan Y, Hu Y, Zhao Z (2012) Advances in the pathogenesis of Alzheimer's disease: a re-evaluation of amyloid cascade hypothesis. *Transl Neurodegener* 1: 18.
61. Babusikova E, Evinova A, Jurecekova J, Jasenak M, Dobrota D (2011) Alzheimer Disease: Definition, Molecular and Genetic Factors. U: Raymond Chuen-Chung CR (eds.) *Advanced Understanding of Neurodegenerative Diseases*. London, InTech, 1-28
62. 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 (ed.). *Neurodegenerative disease*. London, InTech, 421- 455
63. Vandal M, Bourassa P, Calon F (2015) Can insulin signaling pathways be targeted to transport $A\beta$ out of the brain? *Front Aging Neurosci* 7: 114.
64. Serpell LC (2000) Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly. *Biochim Biophys Acta* 1502: 16-30.
65. <https://www.biologend.com/tau>
66. Iqbal K, Liu F, Gong C, Grundke-Iqbal I (2010) Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. *Curr Alzheimer Res* 7: 656-664.
67. Duan Y, Dong S, Gu F, Hu Y, Zhao Z (2012) Advances in the pathogenesis of Alzheimer's disease: focusing on tau-mediated neurodegeneration. *Transl Neurodegener* 1: 24.
68. Drachman DA, Leavitt J (1974) Human memory and the cholinergic system. *Arch Neurol* 30: 113-121.
69. Terry AV, Buccafusco JJ (2003) The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *J Pharmacol Exp Ther* 306 (3): 821-827.

70. Padurariu M, Ciobica A, Lefter R, Serban IL (2013) The oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Psychiatr Danub* 25: 401-409.
71. Swerdlow RH, Khan SM (2004) A „mitochondrial cascade hypothesis“ for sporadic Alzheimer's disease. *Med Hypotheses* 63: 8-20.
72. Rosa D, Procaccini C, Pucino V, Rosa V De, Marone G, Matarese G (2014) Neuro-endocrine networks controlling immune system in health and disease. *Front Immunol* 5: 143.
73. Cunningham E, Souza E De (1993) Interleukin 1 receptors in the brain and endocrine tissues. *Immunol Today* 14: 166-170.
74. Jiang Y, Deacon R, Anthony DC, Campbell SJ (2008) Inhibition of peripheral TNF can block the malaise associated with CNS inflammatory diseases. *Neurobiol Dis* 32: 125–132.
75. Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G, Low D, Huber T, Cuadros MA (2013) Origin and differentiation of microglia. *Front Cell Neurosci* 7: 1-14.
76. Barrientos RM, Kitt MM, Watkins LR, Maier SF (2016) Neuroinflammation in the normal aging hippocampus. *Neuroscience* 36: 1011-1014.
77. Latta CH, Brothers HM, Wilcock DM (2015) Neuroinflammation in Alzheimer's disease; a source of heterogeneity and target for personalized therapy. *Neuroscience* 302: 103-111.
78. Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, Jacobs AH, Wyss-Coray T, Vitorica J, Ransohoff RM, Herrup K, Frautschy SA, Finsen B, Brown GC, Verkhratsky A, Yamanaka K, Koistinaho J, Latz E, Halle A, Petzold GC, Town T, Morgan D, Shinohara ML, Perry VH, Holmes C, Bazan NG, Brooks DJ, Hunot S, Joseph B, Deigendesch N, Garaschuk O, Boddeke E, Dinarello CA, Breitner JC, Cole GM, Golenbock DT, Kummer MP (2015) Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 14: 388-405.

79. Zimmer ER, Leuzy A, Benedet AL, Breitner J, Gauthier S, Rosa-Neto P (2014) Tracking neuroinflammation in Alzheimer's disease: the role of positron emission tomography imaging. *J Neuroinflammation* 11: 120.
80. Nakagawa Y, Chiba K (2014) Role of microglial M1/M2 polarization in relapse and remission of psychiatric disorders and diseases. *Pharm* 7: 1028-1048.
81. Yamada K, Nabeshima T (2000) Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs. *Pharmacol Therapeut* 88: 93-113.
82. LaFerla FM, Green KN (2012) Animal models of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2: a006320.
83. Xiao F, Li X, Zhang X, Hou J, Lin J, Gao Q, Luo H (2011) Combined administration of D-galactose and aluminium induces Alzheimer-like lesions in brain. *Neurosci Bull* 27: 143-155.
84. Chen P, Miah MR, Aschner M (2016) Metals and neurodegeneration. *F1000 Research* 5: 366.
85. 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. *Int J Alzheimers Dis* 2011: 17.
86. Yuan C, Lee Y, Hsu GW (2012) Aluminium overload increases oxidative stress in four functional brain areas of neonatal rats. *J Biomed Sci* 19: 51.
87. 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 Sci* 80: 1897-1905.
88. Stevanović J, Borozan S, Jović S, Ignjatović I (2011) Fiziologija slobodnih radikala. *Vet glasnik* 65 (1-2): 95-107.

89. Aruoma OI (1994) Free radicals and antioxidant strategies in sports. *J Nutr Biochem* 5: 370-81.
90. Close GL, Ashton TA, McArdle A, MacLaren DP (2005) The emerging role of free radicals in delayed onset muscle soreness and contraction-induced muscle injury. *Comp Biochem Physiol A* 142: 257-66.
91. Cheeseman KH, Slater TF (1993) An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 49: 481-93.
92. Štefan L tepšić T, Zavidčić T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R (2007) Lipidna peroksidacija – uzroci i posljedice. *Med* 43: 84-93.
93. Halliwell B, Gutteridge JMC (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd edn. Oxford University Press, New York
94. Rodrigo R (2009) *Oxidative stress and antioxidants: Their role in human disease*. Nova Biomedical Books, New York
95. Halliwell B (2000) Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward?. *Cardiovasc Res* 47 (3): 410-418.
96. Maes M, Galecki P, Chang YS, 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. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35: 676-692.
97. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O (2012) Oxidative stress and antioxidant defense. *WAO J* 5: 9-19.
98. Islam MT (2017) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurol Res* 39: 73-82.

99. Foster JA, McVey Neufeld KA (2013) Gut–brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends Neurosci* 36 (5): 305-312.
100. Caracciolo B, Xu W, Collins S, Fratiglioni (2014) Cognitive decline, dietary factors and gut–brain interactions. *Mech Ageing Dev* 136: 59-69.
101. Sampson TR, Mazmanian SK (2015). Control of brain development, function, and behavior by the microbiome. *Cell Host Microbe* 17 (5): 565-576.
102. Borre YE, O'Keeffe GW, Clarke G, Stanton C, Dinan TG, Cryan JF (2014) Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders. *Trends Mol Med* 20 (9): 509-18.
103. Sturgeon C, Fasano A (2016) Zonulin, a regulator of epithelial and endothelial barrier functions, and its involvement in chronic inflammatory diseases. *Tissue Barriers* 4: 4.
104. Fasano A (2012) Zonulin, regulation of tight junctions, and autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1258 (1): 25-33.
105. Tietz S, Engelhardt B (2015) Brain barriers: crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions. *J Cell Biol* 209 (4): 493-506.
106. Obrenovich MEM (2018) Leaky Gut, Leaky Brain?. *Microorganisms* 6 (107).
107. Kawabata K, Yoshioka Y, Terao J (2019) Role of Intestinal Microbiota in the Bioavailability and Physiological Functions of Dietary Polyphenols. *Molecules* 24: 370-95.
108. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans, I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 81: 230-242.

109. Toiu A, Mocan A, Vlase L, Pârvu AE, Vodnar DC, Gheldiu AM, Moldovan C, Oniga I (2018) Phytochemical composition, antioxidant, antimicrobial and *in vivo* anti-inflammatory activity of traditionally used Romanian *Ajuga laxmannii* (Murray) Benth. ("Nobleman's Beard" - *Barba Împăratului*). *Front Pharmacol* 9: 7.
110. Pandey KB, Rizvi SI (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev* 2: 270-278.
111. Figueiredo-González M, Cancho-Grande B, Simal-Gándara J teixeira N, Mateus N, De Freitas V (2014) The phenolic chemistry and spectrochemistry of red sweet wine-making and oak aging. *Food Chem* 152: 522-530.
112. Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN (2009) Dietary phenolics: chemistry, bioavailability, and effects on health. *Nat Prod Rep* 26: 1001-43.
113. Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JPE, Tognolini M, Borges G, Crozier A (2013) Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal* 18: 1818-1892.
114. Bentsáth A, Ruzsnyák S, Szent-Györgyi A (1936) Vitamin nature of flavones. *Nature* 138: 798.
115. Hertog MGL, Feskens EJM, Kromhout D, Hollman PCH, Katan MB (1993) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease. The Zutphen Elderly Study. *Lancet* 342: 1007-1011.
116. Williamson G, Manach C (2005) Bioavailability and bioefficacy of poly-phenols in humans, II: Review Of intervention studies. *Am J Clin Nutr* 81: 2435-2555.
117. Cao G, Sofic E, Prior RL (1997) Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radid Biol Med* 22: 749-760.
118. Scalbert A, Williamson G (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 130: 2073-2085.

119. Di Meo F, Anouar E, Podloucka P, Fabre G, Trouillas P (2013) Understanding antioxidant properties of natural compounds at the atomic scale. *J Serbian Soc Comput Mech* 7 (1): 58-70.
120. Azam S, Hadi N, Khan NU, Hadi SM (2004) Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties. *Toxicol In Vitro* 18 (5): 555-61.
121. Bouayed J, Bohn T (2010) Exogenous antioxidants-Double-edged swords in cellular redox state. Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxid Med Cell Longev* 3: 228-237.
122. Dai J, Mumper RJ (2010) Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15: 7313-7352.
123. Cotelle N (2001) Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem* 1 (6): 569-590.
124. Rasmussen SE, Frederiksen H, Struntze Krogholm K, Poulsen L (2005) Dietary proanthocyanidins: occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. *Mol Nutr Food Res* 49: 159-174.
125. Halliwell B (2008) Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies?. *Arch Biochem Biophys* 476 (2):107-112.
126. Robards K, Prenzel PD, Tucker G, Swatsitang P, Glover W (1999) Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem* 66: 401-436.
127. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79: 727-747.
128. Kazazić SP (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arh Hig Rada Toksikol* 55: 279-290.

129. Wang W, Sun C, Mao L, Ma P, Liu F, Yang J, Gao Y (2018) The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. *Trends Food Sci Technol* 56: 21-38.
130. Hollman PCH, Arts ICW (2000) Flavonols, flavones and flavanols-nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric* 80: 1081-1093.
131. Huang WY, Cai YZ, Zhang Y (2010) Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutr Cancer* 62: 1-20.
132. Fresco P, Borges F, Diniz C, Marques MPM (2006) New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Med Res Rev* 26: 747-766.
133. Cai H, Boocock DJ, Steward WP, Gescher AJ (2007) Tissue distribution in mice and metabolism in murine and human liver of apigenin and tricetin, flavones with putative cancer chemopreventive properties. *Cancer Chemother Pharmacol* 60: 257-66.
134. Tsao R (2010) Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients* 2: 1231-46.
135. Li Y, Yao J, Han C, Yang J, Tabassum Chaudhry M, Wang S, Liu H, Yin Y (2016) Quercetin, Inflammation and Immunity. *Nutrients* 8: 167.
136. Sarabjeet S, Ramandeep S, Ajay SK, Gaurav G (2014) Neuroprotective role of antioxidant and pyranocarboxylic acid derivative against AlCl₃ induced Alzheimer's disease in rats. *Coast Life Med* 2 (7): 571-578.
137. Häkkinen SH, Kärenlampi SO, Heinonen IM, Mykkänen HM, Törrönen AR (1999) Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *J Agric Food Chem* 47: 2274-2279.

138. Wiczowski W, Romaszko J, Bucinski A, Szawara-Nowak D, Honke J, Zielinski H, Piskula MK (2008) Quercetin from shallots (*Allium cepa* L. var. *aggregatum*) is more bioavailable than its glucosides. *J Nutr* 38: 885-888.
139. Smith C, Lombard KA, Peffley EB, Liu W (2003) Genetic analysis of quercetin in onion (*Allium cepa* L.) Lady Raider. *Tex J Agric Natl Resour* 16: 24-28.
140. Mitchell AE, Hong YJ, Koh E, Barrett DM, Bryant DE, Denison RF, Kaffka S (2007) Ten-year comparison of the influence of organic and conventional crop management practices on the content of flavonoids in tomatoes. *J Agric Food Chem* 55: 6154-6159.
141. Petrus K, Schwartz H, Sontag G (2011) Analysis of flavonoids in honey by HPLC coupled with coulometric electrode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 400: 2555-2563.
142. Bhagwat S, Haytowits DB, Holden J (2011) USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods. Release 3. US Department of Agriculture, Beltsville, MD, USA
143. Chun OK, Chung SJ, Song WO (2007) Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of U.S. adults. *J Nutr* 137: 1244-1252.
144. Gonzales GB, Smagghe G, Grootaert C, Zotti M, Raes K, Van Camp J (2015) Flavonoid interactions during digestion, absorption, distribution and metabolism: a sequential structure - activity/property relationship-based approach in the study of bioavailability and bioactivity. *Drug Metab Rev* 47 (2): 175-90.
145. Murota K, Terao J (2003) Antioxidative flavonoid quercetin: Implication of its intestinal absorption and metabolism. *Arch Biochem Biophys* 417: 12-17.
146. Cassidy A, Minihane AM (2017) The role of metabolism (and the microbiome) in defining the clinical efficacy of dietary flavonoids. *Am J Clin Nutr* 105: 10-22.

147. Clifford MN, Van Der Hooft JJJ, Crozier A (2013) Human studies on the absorption, distribution, metabolism, and excretion of tea polyphenols 1-3. *Am J Clin Nutr*: 98: 1619S-1630S.
148. Piskula MK, Murota K, Terao J (2012) Bioavailability of flavonols and flavones. U: Spencer JP, Crozier A (eds.) *Flavonoids and Related Compounds: Bioavailability and Function*. CRC Press, Boca Raton, 93-108
149. Scholz S, Williamson G (2007) Interactions affecting the bioavailability of dietary polyphenols in vivo. *Int J Vitam Nutr Res* 77: 224-235.
150. Ader P, Wessmann A, Wolfram B (2000) Bioavailability and metabolism of the flavonol quercetin in the pig. *Free Radic Biol Med* 28: 1056-1067.
151. Guo Y, Mah E, Davis CG, Jalili T, Ferruzzi MG, Chun OK, Bruno TD (2013) Dietary fat increases quercetin bioavailability in overweight adults. *Mol Nutr Food Res* 57: 896-905.
152. Crespy V, Morand C, Manach C (1999) Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. *Am J Physiol* 277: G120-G126.
153. Manach C, Morand C, Texier O, Favier ML, Agullo G, Demigné C, Régéat F, Rémésy C (1995) Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *J Nutr* 125 (7): 1911-1922.
154. Kim DH, Kim SY, Park AY, Han MJ (1999) Metabolism of quercetin by human intestinal bacteria and its relation to some biological activities. *Biol Pharm Bull*. 22: 749-751.
155. Jaganath IB, Mullen W, Edwards CA, Crozier A (2006) The relative contribution of the small and large intestine to the absorption and metabolism of rutin in man. *Free Radic Res* 40: 1035-1046.
156. Jaganath IB, Mullen W, Lean MEJ, Edwards CA, Crozier A (2009) In vitro catabolism of rutin by human fecal bacteria and the antioxidant capacity of its catabolites. *Free Radic Biol Med* 47: 1180-1189.

157. Hollman P (2004) Absorption, bioavailability, and metabolism of flavonoids. *Arch Physiol Biochem* 42: 74-83.
158. Day AJ, Bao Y, Morgan MR, Williamson G (2000) Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity. *Free Radic Biol Med* 29: 1234-1243.
159. Manach C, Texier O, Morand, C, Crespy V, Régéat F, Demigné C, Rémésy C (1999) Comparison of the bioavailability of quercetin and catechin in rats. *Free Radic Biol Med* 27: 1259-1266.
160. Oliveira EJ, Watson DG (2000) *In vitro* glucuronidation of kaempferol and quercetin by human UGT-1A9 microsomes. *FEBS Lett* 471: 1-6.
161. Koli R, Erlund I, Jula A, Marniemi J, Mattila P, Alfthan (2010) Bioavailability of various polyphenols from a diet containing moderate amounts of berries. *J Agric Food Chem* 58: 3927-3932.
162. Aziz AA, Edwards CA, Lean ME, Crozier A (1998) Absorption and excretion of conjugated flavonols, including quercetin-4'-*O*-beta-glucoside and isorhamnetin-4'-*O*-beta-glucoside by human volunteers after the consumption of onions. *Free Radic Res* 29: 257-269.
163. Graefe EU, Derendorf H, Veit M (1999) Pharmacokinetics and bioavailability of the flavonol quercetin in humans. *Int J Clin Pharmacol Ther* 37: 219-233.
164. Manach C, Mazur A, Scalbert A (2005) Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Curr Opin Lipidol* 16: 77-84.
165. Konrad M, Nieman DC (2015) Evaluation of quercetin as a countermeasure to exercise-induced physiological stress. U: Lamprecht M (ed.) *Source Antioxidants in Sport Nutrition*. CRC Press, Boca Raton, Chapter 10
166. Moon YJ, Wang L, DiCenzo R, Morris ME (2008) Quercetin pharmacokinetics in humans. *Biopharm Drug Dispos* 29: 205-217.

167. Walle T, Walle UK, Halushka PV (2001) Carbon dioxide is the major metabolite of quercetin in humans. *J Nutr* 131: 2648-2652.
168. Harwood M, Danielewska-Nikiel B, Borzelleca JF, Flamm GW, Williams GM, Lines TC (2007) A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food Chem Toxicol* 45: 2179-2205.
169. Roopchand DE, Carmody RN, Kuhn P, Moskal K, Rojas-Silva P, Turnbaugh PJ, Raskin I (2015) Dietary polyphenols promote growth of the gut bacterium *Akkermansia muciniphila* and attenuate high-fat diet-induced metabolic syndrome. *Diabetes* 64: 2847-2858.
170. Masumoto S, Terao A, Yamamoto Y, Mukai T, Miura T, Shoji T (2016) Non-absorbable apple procyanidins prevent obesity associated with gut microbial and metabolomic changes. *Sci Rep* 6: 31208.
171. Anhe FF, Roy D, Pilon G, Dudonné S, Matamoros S, Varin TV, Garofalo C, Moine Q, Desjardins Y, Levy E, Marette A (2015) A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased *Akkermansia* spp. population in the gut microbiota of mice. *Gut* 64: 872-883.
172. Kawabata K, Mukai R, Ishisaka A (2015) Quercetin and related polyphenols: new insights and implications for their bioactivity and bioavailability. *Food Funct* 6: 1399-1417.
173. Duda-Chodak A, Tarko T, Satora P, Sroka (2015) Interaction of dietary compounds, especially polyphenols, with the intestinal microbiota: a review. *Eur J Nutr* 54 (3): 325-341.
174. Sun M, Wu W, Liu Z, Cong Y (2016). Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases. *J Gastroenterol* 52 (1): 1-8.
175. Braune, A, Blaut M (2016) Bacterial species involved in the conversion of dietary flavonoids in the human gut. *Gut Microbes* 7 (3): 216-234.

176. Sengottuvelan M, Nalini N (2006) Dietary supplementation of resveratrol suppresses colonic tumour incidence in 1,2-dimethylhydrazine-treated rats by modulating biotransforming enzymes and aberrant crypt foci development. *Br J Nutr* 96: 145-153.
177. Oršolić N, Jazvinščak Jembrek M terzić S (2017) Honey and Quercetin reduces ochratoxin A-induced DNA damage in the liver and the kidney through the modulation of intestinal microflora. *Food Agric Immunol* 28 (5): 812-833.
178. Oršolić N, Nemrava J, Jeleč Ž, Kukulj M, Odeh D terzić S, Fureš R, Bagatin T, Bagatin D (2018) The Beneficial Effect of Proanthocyanidins and Icariin on Biochemical Markers of Bone Turnover in Rats. *Int J Mol Sci* 19 (9).
179. Oršolić N, Odeh D (2019) Protective effect of grape seed proanthocyanidins on drug-induced oxidative stress in rat. *Int J Med Res Pharm Sci* 6 (1): 1-21.
180. Oršolić N, Bašić I (2008) Scientific evidence of the use of propolis in ethnomedicine. *Ethnopharmacology*. Transworld Research Network, Kerala, India
181. Haase S, Haghikia A, Wilck N, Muller DM, Linker RA (2018) Impacts of microbiome metabolites on immune regulation and autoimmunity. *Immunology* 154: 230-238.
182. Gugler R, Leschik M, Dengler HJ (1975) Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses. *Eur J clin Pharmacol* 9: 229-234.
183. Hollman PCH, Gaag MVD, Mengelers MJB, van Trijp JMP, deVries JHM, Katan MB (1996) Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Rad Biol Med* 21: 703-707.
184. Hollman PCH, van Trijp JMP, Mengelers MJB, deVries JHM, Katan MB (1997) Bioavailability of the dietary antioxidant flavonol quercetin in man. *Cancer Lett* 114: 139-140.

185. Galindo P, González-Manzano S, Zarzuelo MJ, Gómez-Guzmán M, Quintela AM, González-Paramás A, Santos-Buelga C, Pérez-Vizcaíno F, Duarte J, Jiménez R (2012) Different cardiovascular protective effects of quercetin administered orally or intraperitoneally in spontaneously hypertensive rats. *Food Funct* 3 (6): 643-50.
186. Ogundajo AT, Imoru J, Asaolu FM (2014) Quercetin potentiates hepatoprotective and antioxidant response to intraperitoneal, intravenous, subcutaneous and oral administration in wistar rats. *Asian J Biomed Pharm Sci* 4 (38): 57-61.
187. Juśkiewicz J, Wróblewska M, Jarosławska J, Baliński P, Matuszevičius P, Zduńczyk P, Biedrzycka E, Zduńczyk, Z (2009) Effects of inulin supplemented to cellulose-free or cellulose-rich diets on caecal environment and biochemical blood parameters in rats. *J Anim Feed Sci* 18 (18): 709-722.
188. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
189. Levine RL (2002) Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging and disease. *Free Radic Biol Med* 32: 790-796.
190. Jayakumar T, Thomas PA, Geraldine P (2007). Protective effect of an extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. On antioxidants of major organs of aged rats. *Exp Gerontol* 42: 183-191.
191. Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymology* 105: 121-6.
192. Tietze F (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 27: 502-522.
193. Flohé L, Ötting F (1971) Superoxide dismutase assays. *Meth Enzymol* 105: 70-76.

194. Yamamoto T, Hirano A (1986) A comparative study of modified Bielschowsky, Bodian and thioflavin S stains on Alzheimer's neurofibrillary tangles. *Neuropathol Appl Neurobiol* 12 (1): 3-9.
195. West MJ, Gundersen HJG (1990) Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *J Comp Neurol* 296: 1-22.
196. McAllister AK, Katz LC, Lo DC (1999) Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 22: 295-318.
197. Reichardt LF, Farinas I (1997) Neurotrophic factors and their receptors: roles in neuronal development and function. U: Cowan WM, Jessell TM, Zipursky SL (eds.) *Molecular and Cellular Approaches to Neural Development*. Oxford Univ Press, New York, 220-263
198. Bibel M, Barde YA (2000) Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev* 14: 2919-2937.
199. Sofroniew MV, Howe CL, Mobley WC (2001) Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci* 24: 1217-1281.
200. Binder DK, Scharfman HE (2004) Brain-derived neurotrophic factor. *Growth factors* 22: 123-131.
201. Knusel B, Winslow JW, Rosenthal A, Burton LE, Seid DP, Nikolics K, Hefti F (1991) Promotion of central cholinergic and dopaminergic neuron differentiation by brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin 3. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 961-965.
202. Ghosh A, Carnahan J, Greenberg ME (1994) Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science* 263 (5153): 1618-23.
203. Lindholm D, Carroll P, Tzimogiogis G, Thoenen H (1996) Autocrine-paracrine regulation of hippocampal neuron survival by IGF-1 and the neurotrophins BDNF, NT-3 and NT-4. *Eur J Neurosci* 8: 1452-1460.

204. Ellman GL, Courtney KD, Andres V(Jr), Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7: 88- 95.
205. Griess P (1879) Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt „Ueber einige Azoverbindungen“. *Ber Dtsch Chem Ges* 12: 426-8.
206. Ambriović Ristov A, Brozović A, Bruvo Mađarić B, Četković H, Herak Bosnar M, Hranilović D, Katusić Hećimović S, Meštrović Radan N, Mihaljević S, Slade N, Vujaklija D (2007) *Metode u molekularnoj biologiji*. Institut Ruđer Bošković, Zagreb
207. www.promega.com
208. Iyer RK, Yoo PK, Kern RM, Rozengurt N, Tsoa R, O'Brien WE, Yu H, Grody WW, Cederbaum SD (2002) Mouse model for human arginase deficiency. *Mol Cell Biol* 22 (13): 4491-4498.
209. Campbell L, Saville CR, Murray PJ, Cruickshank SM, Hardman MJ (2013) Local arginase 1 activity is required for cutaneous wound healing. *J Invest. Derm* 133: 246 1-2470.
210. Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modolell M (1994) Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J Immunol Meth* 174: 231-235.
211. Rodríguez PC, Ochoa AC (2008) Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunol Rev* 222: 180-191.
212. Cohen RM, Rezai-Zadeh K, Weitz TM, Rentsendorj A, Gate, Spivak I, Bholat J, Vasilevko V, Glabe CG, Breunig JJ, Rakic P, Davtyan H, Agadjanyan MG, Kepe V, Barrio JR, Bannykh S, Szekely CA, Pechnick RN, Town T (2013) A transgenic alzheimer rat with plaques, tau pathology, behavioral impairment, oligomeric $A\beta$, and frank neuronal loss. *J Neurosci* 33 (15): 6245-6256.

213. Kokjohn TA, Roher AE (2009) Amyloid precursor protein transgenic mouse models and Alzheimer's disease: understanding the paradigms, limitations, and contributions. *Alzheimers Dement* 5: 340-47.
214. Crapper DR, Krishnan SS, Dalton AJ (1973) Brain aluminum distribution in Alzheimer's disease and experimental neurofibrillary degeneration. *Science* 180 (4085): 511-3.
215. Walton JR (2006) Aluminum in hippocampal neurons from humans with Alzheimer's disease. *Neurotoxicology* 27: 385-94.
216. Turgut S, Bor-Kucukatay M, Emmungil G, Atsak P, Turgut G (2007) The effects of low dose aluminum on hemorheological and hematological parameters in rats. *Arch Toxicol* 81:11-17.
217. Singh S, Singh R, Kushwah AS, Gupta G (2014) Neuroprotective role of antioxidant and pyranocarboxylic acid derivative against $AlCl_3$ induced Alzheimer's disease in rats. *J Coast Life Med* 2: 547-554.
218. Ulusoy H, Sonmez FM, Kilic E, Caliskan K, Karaca Büşra, Kara M, Ercal O, Gunduz Y, Karabulut D, Bitiktas S, Tan B, Kavraal S, İnal A, Suer C (2015). Intraperitoneal administration of low dose aluminium in the rat: how good is it to produce a model for Alzheimer disease. *Arch Ital Biol* 153: 266-278.
219. Pezerović DŽ, Panijan R (1979) Teški metali i biološki sustavi s posebnim osvrtom na živu. *ASCRO* 13: 157.
220. Timbrell JA (2002) *Introduction to Toxicology*. 3rd ed. Taylor & Francis, London
221. Pauling L (1970) *General Chemistry*. WH Freeman and Co, San-Francisco
222. Nagajyoti PC, Lee KD, Sreekanth TVM (2010) Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ Chem Lett* 8: 199-216.
223. Lakherwal D (2014) adsorption of heavy metals: a review. *Int J Environ Res* 4: 41-48.

224. Sharma DR, Sunkaria A, Wani WJ, Sharma RK, Verma D a, Priyanka K, Bal A, Gill KD (2015) Quercetin protects against aluminium induced oxidative stress and promotes mitochondrial biogenesis via activation of the PGC-1a signaling pathway. *NeuroToxicology* 51: 116-137.
225. Showkat A, Showkat AB, Hassan T, Sabhiya M (2019) Heavy metal toxicity and their harmful effects on living organisms-a review. *IJMSTR* 1 (3): 106-122.
226. EFSA (2008) Safety of aluminium from dietary intake, scientific opinion of the panel on food additives, flavourings, processing aids and food contact materials (AFC). *EFSA J* 2008: 1-34.
227. Collins JM, Dedrick RL, Flessner MF, Guarino AM (1982) Concentration-dependent disappearance of fluoro-uracil from peritoneal fluid in the rat: experimental observations and distributed modeling. *J Pharm Sci* 71: 735-738.
228. Claassen V (1994) Neglected factors in pharmacology and neuroscience research. 1st edn. Elsevier, Amsterdam, Norveška
229. Golub MS, Germann SL (2001) Long-term consequences of developmental exposure to aluminum in a suboptimal diet for growth and behavior of Swiss Webster mice. *Neurotoxicol Teratol* 23: 365-372.
230. Azzaoui FZ, Ahami AOT, Khadmaoui A (2008) Impact of aluminum sub-chronic toxicity on body weight and recognition memory of wistar rat. *Pak J Biol* 11 (14): 1830-34.
231. Buraimoh AA, Ojo SA (2014) Effects of Aluminium chloride exposure on the body weight of Wistar rats. *Ann Biol Sci* 2 (2): 66-73.
232. Meiri H, Banin E, Roll M, Roussea A (1993) Toxic effects of aluminium on nerve cells and synaptic transmission. *Prog Neurobiol* 40: 9 -21.

233. Buraimoh AA, Ojo SA, Hambolu JO, Adebisi S (2011) Effects of oral administration of aluminium chloride on the histology of the hippocampus of Wistar rats. *Curr Res J Biol Sci* 3: 509-515.
234. Said M, Mokhta M (2017) Neuroprotective effects of eugenol against aluminium-induced toxicity in the rat brain. *Arh Hig Rada Toksikol* 68: 27-37.
235. Kwong WT, Friello P, Semba RD (2004) Interactions between iron deficiency and lead poisoning: Idemiology and pathogenesis. *Sci Total Environ* 330: 21-37.
236. Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S (1994) The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic Biol Med* 16: 845-850.
237. Nagata H, Takekoshi S, Takagi T, Honma T, Watanabe K (1999) Antioxidative action of flavonoids, quercetin and catechin, mediated by the activation of glutathione peroxidase. *Tokai J Exp Clin Med* 24: 1-11.
238. Singh A, Naidu PS, Kulkarni SK (2003) Reversal of aging and chronic ethanol-induced cognitive dysfunction by quercetin a bioflavonoid. *Free Radic Res* 37: 1245-1252.
239. Liu J, Yu H, Ning X (2006) Effect of quercetin on chronic enhancement of spatial learning and memory of mice. *Sci China C Life Sci* 49: 583-590.
240. Pu F, Mishima K, Irie K, Motohashi K, Tanaka Y, Orito K, Egawa T, Kitamura Y, Egashira N, Iwasaki K, Fujiwara M (2007) Neuroprotective effects of quercetin and rutin on spatial memory impairment in an 8-arm radial maze task and neuronal death induced by repeated cerebral ischemia in rats. *J Pharmacol Sci* 104: 329-334.
241. Kumar A, Sehgal N, Kumar P, Padi SS, Naidu PS (2008) Protective effect of quercetin against ICV colchicine-induced cognitive dysfunctions and oxidative damage in rats. *Phytother Res* 22: 1563-1569.

242. Davis JM, Murphy EA, Carmichael MD, Davis B (2009) Quercetin increases brain and muscle mitochondrial biogenesis and exercise tolerance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296: R1071-R1077.
243. Tota S, Awasthi H, Kamat PH, Nath C, Hanif K (2010) Protective effect of quercetin against intracerebral streptozotocin induced reduction in cerebral blood flow and impairment of memory in mice. *Behav Brain Res* 209: 73-79.
244. Yao Y, Han DD, Zhang TT, Yang Z (2010) Quercetin improves cognitive deficits in rats with chronic cerebral ischemia and inhibits voltage-dependent sodium channels in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Phytother Res* 24: 136–140.
245. Ali HA, Afifi M, Abdelazim AM Mosleh YY (2014) Quercetin and omega 3 ameliorate oxidative stress induced by aluminium chloride in the brain. *J Mol Neurosci* 53 (4): 654-660.
246. Davis JM, Murphy EA, Carmichael MD (2009) Effects of the dietary flavonoid quercetin upon performance and health. *Curr Sports Med Rep* 8: 206-13.
247. Kressler J, Millard-Stafford M, Warren GL (2011) Quercetin and endurance exercise capacity: A systematic review and meta-analysis. *Med Sci Sports Exerc* 43: 2396-404.
248. Aguirre L, Arias N, Macarulla MT, Gracia A, Portillo MP (2011) Beneficial effects of quercetin on obesity and diabetes. *Open Nutraceuticals J* 4: 189-98.
249. Rivera L, Morón R, Sánchez M, Zarzuelo A, Galisteo M (2008) Quercetin ameliorates metabolic syndrome and improves the inflammatory status in obese Zucker rats. *Obesity (Silver Spring)* 16: 2081-7.
250. Jung CH, Cho I, Ahn J, Jeon TI, Ha TY (2013) Quercetin reduces high-fat diet-induced fat accumulation in the liver by regulating lipid metabolism genes. *Phytother Res* 27: 139-43.
251. Azuma K, Ippoushi K terao J (2010) Evaluation of tolerable levels of dietary quercetin for exerting its antioxidative effect in high cholesterol-fed rats. *Food Chem Toxicol* 48: 1117-22.

252. Qureshi AA, Tan X, Reis JC, Badr MZ, Papasian CJ, Morrison DC, Qureshi N (2011) Inhibition of nitric oxide in LPS-stimulated macrophages of young and senescent mice by δ -tocotrienol and quercetin. *Lipids Health Dis* 10: 239.
253. Casuso RA, Martínez-López EJ, Hita-Contreras F, Camiletti-Moirón D, Martínez-Amat A (2014) Quercetin effects on weight gain and caloric intake in exercised rats. *Biol Sport* 31: 63-7.
254. Guevara-Aguirre J, Balasubramanian P, Guevara-Aguirre M, Wei M, Madia F, Cheng CW, Hwang D, Martin-Montalvo A, Saavedra J, Ingles S, de Cabo R, Cohen P, Longo VD (2011) Growth hormone receptor deficiency is associated with a major reduction in pro-aging signaling, cancer, and diabetes in humans. *Sci Transl Med* 16 (3): 70.
255. Kim BS, Jeon YS, Chun J (2013) Current status and future promise of the human microbiome. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr* 16: 71-79.
256. Hill JM, Bhattacharjee S, Pogue AI, Lukiw WJ (2014) The gastrointestinal tract microbiome and potential link to Alzheimer's disease. *Front Neurol* 5: 43.
257. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nuskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng

ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigo R, CampbellMJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, DiemerK, MuruganujanA, GuoN, Sato S, BafnaV, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, DonnellyM, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, GorokhovM, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, NodellM, Pan S, Peck J, PetersonM, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, WangM, WenM, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-1351.

258. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Dore J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, Meta HITC, Bork P, Ehrlich SD, Wang J (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464: 59-65.

259. Human Microbiome Project C (2012) A framework for human microbiome research. *Nature* 486: 215-221.

260. Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, PetersonDA, Gordon JI (2005) Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307: 1915-1920.

261. Patterson E, Cryan JF, Fitzgerald GF, Ross RP, Dinan TG, Stanton C (2014) Gut microbiota, the pharmabiotics they produce and host health. *Proc Nutr Soc* 73: 477-489.
262. Mayer EA (2011) Gut feelings: the emerging biology of gut-brain communication. *Nat Rev Neurosci* 12: 453-466.
263. Cryan JF, O'Mahony SM (2011) The microbiome-gut brain axis: from bowel to behavior. *Neurogastroenterol Motil* 23: 187-192.
264. Collins SM, Surette M, Bercik P (2012) The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nat Rev Microbiol* 10: 735-742.
265. Cryan JF, Dinan TG (2012) Mind-altering microorganisms: The impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci* 13: 701-712.
266. Tillisch K (2014) The effects of gut microbiota on CNS function in humans. *Gut Microbes* 5: 404-410.
267. Sharon G, Sampson TR, Geschwind DH, Mazmanian SK (2016) The central nervous system and the gut microbiome. *Cell* 167: 915-932.
268. Dinan TG, Cryan JF (2017) Gut instincts: Microbiota as a key regulator of brain development, ageing and neurodegeneration. *J Physiol* 595: 489-503.
269. Orel R, Kamhi Trop T (2014) Intestinal microbiota, probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease. *World Gastroenterol* 20: 11505-11524.
270. Prosberg M, Bendtsen F, Vind I, Petersen AM, Gluud LL (2016) The association between the gut microbiota and the inflammatory bowel disease activity: A systematic review and meta-analysis. *Scand J Gastroenterol* 51: 1407-1415.
271. Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FW, Nielsen DS, Andreasen AS, Pedersen BK, Al-Soud WA, Sorensen SJ, Hansen LH, Jakobsen M (2010) Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One* 5: e9085.

272. Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, Liang S, Zhang W, Guan Y, Shen D, Peng Y, Zhang D, Jie Z, Wu W, Qin Y, Xue W, Li J, Han L, Lu D, Wu P, Dai Y, Sun X, Li Z, Tang A, Zhong S, Li X, Chen W, Xu R, Wang M, Feng Q, Gong M, Yu J, Zhang Y, Zhang M, Hansen T, Sanchez G, Raes J, Falony G, Okuda S, Almeida M, LeChatelier E, Renault P, Pons N, Batto JM, Zhang Z, Chen H, Yang R, Zheng W, Li S, Yang H, Wang J, Ehrlich SD, Nielsen R, Pedersen O, Kristiansen K, Wang J (2012) A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 490: 5-60.
273. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI (2006) Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444: 1022-1023.
274. Harakeh SM, Khan I, Kumosani T, Barbour E, Almasaudi SB, Bahijri SM, Alfadul SM, Ajabnoor GM, Azhar EI (2016) Gut microbiota: a contributing factor to obesity. *Front Cell Infect Microbiol* 6: 95.
275. Tang WH, Wang Z, Levison BS, Koeth RA, Britt EB, Fu X, Wu Y, Hazen SL (2013) Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 368: 1575-1584.
276. Zhu W, Gregory JC, Org E, Buffa JA, Gupta N, Wang Z, Li L, Fu X, Wu Y, Mehrabian M, Sartor RB, McIntyre TM, Silverstein RL, Tang WH, DiDonato JA, Brown JM, Luskis AJ, Hazen SL (2016) Gut microbial metabolite TMAO enhances platelet hyperreactivity and thrombosis risk. *Cell* 165: 111-124.
277. Finegold SM, Dowd SE, Gontcharova V, Liu C, Henley KE, Wolcott RD, Youn E, Summanen PH, Granpeesheh D, Dixon D, Liu M, Molitoris DR, Green JA (2010) Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe* 16: 444-453.
278. De Angelis M, Francavilla R, Piccolo M, De Giacomo A, Gobbetti M (2015) Autism spectrum disorders and intestinal microbiota. *Gut Microbes* 6: 207-213.

279. Naseribafrouei A, Hestad K, Avershina E, Sekelja M, Linlokken A, Wilson R, Rudi K (2014) Correlation between the human fecal microbiota and depression. *Neurogastroenterol Motil* 26: 1155-1162.
280. Evrensel A, Ceylan ME (2015) The gut-brain axis: The missing link in depression. *Clin Psychopharmacol Neurosci* 13: 239-244.
281. Scheperjans F, Aho V, Pereira PA, Koskinen K, Paulin L, Pekkonen E, Haapaniemi E, Kaakkola S, Eerola-Rautio J, Pohja M, Kinnunen E, Murros K, Auvinen P (2015) Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Mov Disord* 30: 350-358.
282. Mulak A, Bonaz B (2015) Brain-gut-microbiota axis in Parkinson's disease. *World J Gastroenterol* 21: 10609-10620.
283. Sampson TR, Debelius JW, Thron T, Janssen S, Shastri GG, Ilhan ZE, Challis C, Schretter CE, Rocha S, Gradinaru V, Chesselet MF, Keshavarzian A, Shannon KM, Krajmalnik-Brown R, Wittung-Stafshede P, Knight R, Mazmanian SK (2016) Gut microbiota regulate motor deficits and neuroinflammation in a model of Parkinson's disease. *Cell* 167: 1469-1480.
284. Berer K, Mues M, Koutrolos M, Rasbi ZA, Boziki M, Johner C, Wekerle H, Krishnamoorthy G (2011) Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature* 479: 538-541.
285. Miyake S, Kim S, Suda W, Oshima K, Nakamura M, Matsuoka T, Chihara N, Tomita A, Sato W, Kim SW, Morita H, Hattori M, Yamamura T (2015) Dysbiosis in the gut microbiota of patients with multiple sclerosis, with a striking depletion of species belonging to Clostridia XIVa and IV clusters. *PLoS One* 10: e0137429.
286. Djouzi Z, Andlueux C (1996) Compared effects of three oligosaccharides on metabolism of intestinal microflora in rats inoculated with a human faecal flora. *British J Nutrition* 78: 313-324.

287. Duda-Chodak A, Tarko T, Satora P, Sroka P (2015) Interaction of dietary compounds, especially polyphenols, with the intestinal microbiota: a review. *Eur J Nutr* 54 (3): 325-41.
288. Bagli E, Goussia A, Moschos MM, Agnantis N, Kitsos G (2016) Natural compounds and neuroprotection: mechanisms of action and novel delivery systems. *InVivo* 30 (5): 535-47.
289. Braune A, Blaut M (2016) Bacterial species involved in the conversion of dietary flavonoids in the human gut. *Gut Microbes* 7 (3): 216-34.
290. Kararli TT (1995) Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharm Drug Dispos* 16: 351-380.
291. Nugent SG, Kumar D, Rampton DS, Evans DF (2001) Intestinal luminal pH in inflammatory bowel disease: possible determinants and implications for therapy with aminosalicylates and other drugs. *Gut* 48 (4): 571-7.
292. Ward FW, Coates ME (1987) Gastrointestinal pH measurement in rats: influence of the microbial flora, diet and fasting. *Lab Anim* 21: 216-222.
293. Salminen S, Bouley C, Boutron-Reault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR, Isolauri E, Moreau MC, Roberfroid M, Rowland I (1998) Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Brit J Nutr* 80: 147-171.
294. Ng KM, Ferreyra JA, Higginbottom SK, Lynch JB, Kashyap PC, Gopinath S, Naidu N, Choudhury B, Weimer BC, Monack DM, Sonnenburg JL (2013) Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens. *Nature* 502: 96-99.
295. Kovatcheva-Datchary P, Nilsson A, Akrami R, Lee YS, De Vadder F, Arora T, Hallen A, Martens E, Björck I, Bäckhed F (2015) Dietary fiber-induced improvement in glucose metabolism is associated with increased abundance of *Prevotella*. *Cell Metab* 22: 971-982.
296. Koropatkin NM, Cameron EA, Martens EC (2012) How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nat Rev Microbiol* 10: 323-335.

297. Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI (2009) The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med* 1: 6-14.
298. Xu X, Xu P, Ma C, Tang J, Zhang X (2013) Gut microbiota, host health, and polysaccharides. *Biotechnol Adv* 31: 318-337.
299. Flint HJ, Bayer EA, Rincon MT, Lamed R, White BA (2008) Polysaccharide utilization by gut bacteria: Potential for new insights from genomic analysis. *Nat Rev Microbiol* 6: 121-131.
300. O Sheridan P, Martin JC, Lawley TD, Browne HP, Harris HMB, Bernalier-Donadille A, Duncan SH, O'Toole PW, P Scott K, J Flint H (2016) Polysaccharide utilization loci and nutritional specialization in a dominant group of butyrate-producing human colonic *Firmicutes*. *Microb Genom* 2: e000043.
301. Terrapon N, Lombard V, Gilbert HJ, Henrissat B (2015) Automatic prediction of polysaccharide utilization loci in Bacteroidetes species. *Bioinformatics* 31: 647-655.
302. Grondin JM, Tamura K, Déjean G, Abbott DW, Brumer H (2017) Polysaccharide utilization loci: Fueling microbial communities. *J Bacteriol* 199: e00860-16.
303. Glenwright AJ, Pothula KR, Bhamidimarri SP, Chorev DS, Baslé A, Firbank SJ, Zheng H, Robinson CV, Winterhalter M, Kleinekathöfer U, Bolam DN, van den Berg B (2017) Structural basis for nutrient acquisition by dominant members of the human gut microbiota. *Nature* 541: 407-411.
304. Blanco C, Ritzenthaler P, Mata-Gilsinger M (1982) Cloning and endonuclease restriction analysis of uidA and uidR genes in *Escherichia coli* K-12: determination of transcription direction for the uidA gene. *J Bacteriol* 149: 587-594.

305. Liang WJ, Wilson KJ, Xie H, Knol J, Suzuki S, Rutherford NG, Henderson PJ, Jefferson RA (2005) The *gusBC* genes of *Escherichia coli* encode a glucuronide transport system. *J Bacteriol* 187 (7): 2377-2385.
306. Wilson KJ, Hughes SG, Jefferson RA (1992) The *Escherichia coli* *gus* operon: induction and expression of the *gus* operon in *E. coli* and the occurrence and use of GUS in other bacteria. *GUS Protocols*. U: Gallagher SR (ed.) Using the GUS Gene as Reporter of Gene Expression. Academic, San Diego, 7-22
307. Blanco C, Ritzenthaler P, Mata-Gilsinger M (1985) Nucleotide sequence of a regulatory region of the *uidA* gene in *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet* 199: 101-105.
308. Novel M, Novel G (1976) Regulation of beta-glucuronidase synthesis in *Escherichia coli* K-12: pleiotropic constitutive mutations affecting *uxu* and *uidA* expression. *J Bacteriol* 127: 418-432.
309. Novel G, Didier-Fichet ML, Stoeber F (1974) Inducibility of beta-glucuronidase in wildtype and hexuronate-negative mutants of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 120: 89-95.
310. Tephly TR, Burchell B (1990) UDP-glucuronosyltransferases: a family of detoxifying enzymes. *Trends Pharmacol Sci* 11: 276-279.
311. Rowland A, Miners JO, Mackenzie PI (2013) The UDP-glucuronosyltransferases: their role in drug metabolism and detoxification. *Int J Biochem Cell Biol* 45: 1121-1132.
312. Miners JO, Mackenzie PI (1991) Drug glucuronidation in humans. *Pharmacol Ther* 51: 347-369.
313. Gloux K, Berteau O, El Oumami H, Béguet F, Leclerc M, Doré J (2011) A metagenomic β -glucuronidase uncovers a core adaptive function of the human intestinal microbiome. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 4539-4546.
- 314.

315. Pollet RM, D'Agostino EH, Walton WG, Xu Y, Little MS, Biernat KA, Pellock SJ, Patterson LM, Creekmore BC, Isenberg HN, Bahethi RR, Bhatt AP, Liu J, Gharaibeh RZ, Redinbo MR (2017) An atlas of β -glucuronidases in the human intestinal microbiome. *Structure* 25 (7): 967-977.
316. Kreek MJ, Guggenheim FG, Ross JE, Tapley DF (1963) Glucuronide formation in the transport of testosterone and androstenedione by rat intestine. *Biochim Biophys Acta* 74: 418-427.
317. Pellock SJ, Redinbo MR (2017) Glucuronides in the gut: sugar-driven symbioses between microbe and host. *J Biol Chem* 292: 8569-8576.
318. Boelsterli UA, Redinbo MR, Saitta KS (2013) Multiple NSAID-induced hits injure the small intestine: underlying mechanisms and novel strategies. *Toxicol Sci* 131: 654-667.
319. Mani S, Boelsterli UA, Redinbo MR (2014) Understanding and modulating mammalian-microbial communication for improved human health. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 54: 559-580.
320. Flores R, Shi J, Fuhrman B, Xu X, Veenstra TD, Gail MH, Gajer P, Ravel J, Goedert JJ (2012) Fecal microbial determinants of fecal and systemic estrogens and estrogen metabolites: a cross-sectional study. *J Transl Med* 10: 253.
321. Hullar MAJ, Burnett-Hartman AN, Lampe JW (2014) Gut microbes, diet, and cancer. *Cancer Treat Res* 159: 377-399.
322. Plotnikoff GA (2014) Three measurable and modifiable enteric microbial biotransformations relevant to cancer prevention and treatment. *Glob Adv Health Med* 3: 33-43.
323. Koppel N, Maini Rekdal V, Balskus EP (2017) Chemical transformation of xenobiotics by the human gut microbiota. *Science* 356: 2770.

324. LoGuidice A, Wallace BD, Bendel L, Redinbo MR, Boelsterli UA (2012) Pharmacologic targeting of bacterial β -glucuronidase alleviates nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced enteropathy in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 341: 447-454.
325. Roberts AB, Wallace BD, Venkatesh MK, Mani S, Redinbo MR (2013) Molecular insights into microbial β -glucuronidase inhibition to abrogate CPT-11 toxicity. *Mol Pharmacol* 84: 208-217.
326. Wallace BD, Wang H, Lane KT, Scott JE, Orans J, Koo JS, Venkatesh M, Jobin C, Yeh LA, Mani S, Redinbo MR (2010) Alleviating cancer drug toxicity by inhibiting a bacterial enzyme. *Science* 330: 831-835.
327. Mroczyńska M, Libudzisz Z (2010) β -glucuronidase and β -glucosidase activity of *Lactobacillus* and *Enterococcus* isolated from human feces. *Pol J Microbiol* 259 (4): 265-269.
328. Beaud D, Tailliez J, Anba-Mondoloni J (2005) Genetic characterization of the β -glucuronidase enzyme from a human intestinal bacterium, *Ruminococcus gnavus*. *Microbiology* 151: 2323-2330.
329. de Moreno de LeBlanc A, Perdigón G (2005) Reduction of β -glucuronidase and nitroreductase activity by yoghurt in a murine colon cancer model. *Biocell* 29: 1524.
330. Kim DH, Jin YH (2001) Intestinal bacteria beta-glucuronidase activity of patients with colon cancer. *Arch Pharm Res* 24: 564-567.
331. Nakamura J, Kubota Y, Miyaoka M, Saitoh T, Mizuno F, Benno Y (2002) Comparison of four microbial enzymes in *Clostridia* and *Bacteroides* isolated from human feces. *Microbiol Immunol* 46: 487-490.
332. Rafter J (2002) Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective. *Br J Nutr* 88: 8994.

333. de Preter V, Raemen H, Cloetens L, Houben E, Rutgeerts P, Verbeke K (2008) Effect of dietary intervention with different pre- and probiotics on intestinal bacterial enzyme activities. *Eur J Clin Nutr* 62 (2): 225-31.
334. Juers DH, Jacobson RH, Wigley D, Zhang XJ, Huber RE, Tronrud DE, Matthews BW (2000) High resolution refinement of beta-galactosidase in a new crystal form reveals multiple metal-binding sites and provides a structural basis for alpha-complementation. *Protein Sci* 2000 (9): 1685-99.
335. Appel SH, Alpers DH, Tomkins GM (1965) Multiple molecular forms of β -galactosidase. *J Mol Biol* 11: 12-22.
336. Fowler A, Zabin I (1978) Amino acid sequence of b-galactosidase. *J Biol Chem* 253: 5521-5525.
337. Kalnins A, Otto K, Ruther U, Müller-Hill B (1983) Sequence of the *lacZ* gene of *Escherichia coli*. *EMBO J* 2: 593-597.
338. Lomer MC, Parkes GC, Sanderson JD (2008) Review article: lactose intolerance in clinical practice—myths and realities. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 27 (2): 93-103.
339. Heyman MB, Co N (2006) Lactose intolerance in infants, children, and adolescents. *Pediatrics* 118 (3): 1279-1286.
340. Macfarlane GT, Cummings JH (1991) The colonic flora, fermentation and large bowel digestive function. U: Phillips SF, Shorter RG (eds.) In *The Large Intestine: physiology, pathophysiology and disease*. Raven Press, NY, 51-92
341. Rowland IR (1988) Factors affecting metabolic activity of the intestinal microflora. *Drug Metabolism Reviews* 19: 243-261.
342. Mallet AK, Rowland IR (1988) Factors affecting the gut microflora. U: Rowland IR (ed.) *Role of the gut flora in toxicity and cancer*. BIBRA, Carshalton, UK, 347-382

343. Roland N, Nugon-Baudon L, Rabot S (1993) Interactions between the intestinal flora and xenobiotic metabolizing enzymes and their health consequences. *World Rev Nutr Diet* 74: 123-148.
344. Juśkiewicz J, Zdun'czyk Z (2002) Lactulose-induced diarrhoea in rats: effects on caecal development and activities of microbial enzymes. *Comp Biochem Physiol A* 133: 411-417.
345. Arboleya S, Solis G, Fernandez N, de los Reyes-Gavilan CG, Gueimonde M (2012) Facultative to strict anaerobes ratio in the preterm infant microbiota: a target for intervention?. *Gut Microbes* 3: 583-588.
346. Gaspar P, Carvalho AL, Vinga S, Santos H, Neves AR (2013) From physiology to systems metabolic engineering for the production of biochemicals by lactic acid bacteria. *Biotechnol Adv* 31 (6): 764-788.
347. Wells JM (2011) Immunomodulatory mechanisms of lactobacilli. *Microb Cell Factories* 10: S17.
348. Tojo R, Suarez A, Clemente MG, de los Reyes-Gavilan CG, Margolles A, Gueimonde M, RuasMadiedo P (2014) Intestinal microbiota in health and disease: role of bifidobacteria in gut homeostasis. *World J Gastroenterol* 20: 15163-15176.
349. Vlasova AN, Kandasamy S, Chattha KS, Rajashekara G, Saif LJ (2016) Comparison of probiotic lactobacilli and bifidobacteria effects, immune responses and rotavirus vaccines and infection in different host species. *Vet Immunol Immunopathol* 172: 72-84.
350. Gerritsen J, Smidt H, Rijkers GT, de Vos WM (2011) Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. *Genes Nutr* 6: 209-240.
351. Picard C, Fioramonti J, Francois A, Robinson T, Neant F, Matuchansky C (2005) Review article: bifidobacteria as probiotic agents - physiological effects and clinical benefits. *Aliment Pharmacol Ther* 22: 495-512.
352. Grimm V, Westermann C, Riedel CU (2014) Bifidobacteria host interactions an update on colonisation factors. *BioMed Res Int* 2014: 960826.

353. Mitsuoka T (1992) The human gastrointestinal tract. U: Wood BJB (ed.) The lactic acid bacteria in health and disease (1). Elsevier Applied Science, London, UK, 69-114
354. Tannock GW (1992) Lactic microbiota of pigs, mice and rats. U: Wood BJB (ed.) The lactic acid bacteria in health and disease (1). Elsevier Applied Science, London, UK, 21-48
355. Chon H, Choi B, Jeong G, Lee E, Lee S (2010) Suppression of proinflammatory cytokine production by specific metabolites of *Lactobacillus plantarum* 10hk2 via inhibiting NF-kappaB and p38 MAPK expressions. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 33: e41-e49.
356. Dicksved J, Schreiber O, Willing B, Petersson J, Rang S, Phillipson M (2012) *Lactobacillus reuteri* maintains a functional mucosal barrier during DSS treatment despite mucus layer dysfunction. *PLoS ONE* 7: e46399.
357. Majlesi M, Shekarforoush SS, Ghaisari HR, Nazifi S, Sajedianfard J, Eskandari, MH (2017) Effect of probiotic *Bacillus Coagulans* and *Lactobacillus Plantarum* on alleviation of mercury toxicity in rat. *Probiotics Antimicrob Proteins* 9: 300-309.
358. Jiang X, Gu S, Liu D, Zhao L, Xia S, He X, Chen H and Ge J (2018) *Lactobacillus brevis* 23017 relieves mercury toxicity in the colon by modulation of oxidative stress and inflammation through the interplay of MAPK and NF-κB signaling cascades. *Front Microbiol* 9: 2425.
359. Enan G, El Essawy AA, Uyttendaele M, Debevere J (1996) Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* UG1 isolated from dry sausage: characterization, production and bactericidal action of plantaricin UG1. *Int J Food Microbiol* 30: 189-215.
360. Molin G (2001) Probiotics in foods not containing milk or milk constituents, with special reference to *Lactobacillus plantarum* 299v. *Am J Clin. Nutr* 73: 380S-385S.
361. Kleerebezem M, Boekhorst J, van Kranenburg R, Molenaar D, Kuipers OP, Leer R, Tarchini R, Peters SA, Sandbrink HM, Fiers M, Stiekema W, Lankhorst RMK, Bron PA, Hoffer SM, Groot MNN, Kerkhoven R, de Vries M, Ursing B, de Vos WM, Siezen RJ (2003) Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 1990-1995.

362. Bringel F, Quenee P, Tailliez P (2001) Polyphasic investigation of the diversity within *Lactobacillus plantarum* related strains revealed two *L. plantarum* subgroups. *Syst Appl Microbiol* 24: 561-571.
363. Vesa T, Pochart P, Marteau P (2000) Pharmacokinetics of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826, *Lactobacillus fermentum* KLD, and *Lactococcus lactis* MG 1363 in the human gastrointestinal tract. *Aliment Pharmacol Ther* 14: 823-828.
364. Bron PA, Grangette C, Mercenier A, de Vos WM, Kleerebezem M (2004) Identification of *Lactobacillus plantarum* genes that are induced in the gastrointestinal tract of mice. *J Bacteriol* 186: 5721-5729.
365. Roissart H, Luquet FM (1994) Bactéries lactiques: aspects fondamentaux et technologiques. *Uriage Lorica France* 1: 605.
366. Åkerberg C, Hofvendahl K, Zacchi G, Hahn-Hägerdal B (1998) Modelling the influence of pH temperature, glucose and lactic acid concentrations on the kinetics of lactic acid production by *Lactococcus lactis ssp. Lactis* ATCC 19435 in whole-wheat flour. *Appl Microbiol Biotechnol* 49 (6): 682-690.
367. Nakamura S, Morimoto YV, Kudo S (2015) A lactose fermentation product produced by *Lactococcus lactis subsp. lactis*, acetate, inhibits the motility of flagellated pathogenic bacteria. *Microbiology* 161 (4): 701-707.
368. Kihara M, Macnab RM (1981) Cytoplasmic pH mediates pH taxis and weak-acid repellent taxis of bacteria. *J Bacteriol* 145 (3): 1209-1221.
369. Repaske DR, Adler J (1981) Change in intracellular pH of *Escherichia coli* mediates the chemotactic response to certain attractants and repellents. *J Bacteriol* 145 (3): 1196-1208.
370. Kim M, Chun J (2014) 16S rRNA Gene-based identification of *Bacteria* and *Archaea* using the EzTaxon server. *Methods Microbiol* 41 (4): 61-74.

371. Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, Takada T, Tanaka R (2004) Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for Real-Time PCR analysis of predominant bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol* 70 (12): 7220-7228.
372. Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR (2007) Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 13780-13785.
373. Zhu B, Wang X, Li L (2010) Human gut microbiome: the second genome of human body. *Protein Cell* 1 (8): 718-725.
374. Hayashi H, Takahashi R, Nishi T, Sakamoto M, Benno Y (2005) Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. *J Med Microbiol* 54 (11): 1093–1101.
375. Wang M, Ahrne S, Jeppsson B, Molin G (2005) Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol Ecol* 54 (2): 219-231.
376. Hakansson A, Molin G (2011) Gut microbiota and inflammation. *Nutrients* 3 (6): 637-682.
377. Jeffery IB, O'Toole PW (2013) Diet-microbiota interactions and their implications for healthy living. *Nutrients* 5 (1): 234-252.
378. Mariat D, Firmesse O, Levenez F, Guimaraes V, Sokol H, Doré J, Corthier G, Furet JP (2009) The *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol* 9: 123.
379. Dicksved J (2008) Exploring the human intestinal microbiome in health and disease. Dissertation, Thesis Swedish University of Agricultural Sciences, Acta Universitatis Agriculturae Sueciae 2008: 30.
380. Laparra JM, Sanz Y (2010) Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacol Res* 61 (3): 219-225.

381. Duda-Chodak A (2012) The inhibitory effect of polyphenols on human gut microbiota. *J Physiol Pharmacol* 63 (5): 497-503.
382. Peterson J, Dwyer J, Bhagwat S, Haytowit D, Holden J, Eldridge AL, Beecher G, Aladesanmi J (2005) Major flavonoids in dry tea. *J Food Compost Anal* 18: 487-501.
383. Ankolekar C, Johnson D, Pinto Mda S, Johnson K, Labbe R, Shetty K (2011) Inhibitory potential of tea polyphenolics and influence of extraction time against *Helicobacter pylori* and lack of inhibition of beneficial lactic acid bacteria. *J Med Food* 14 (11): 1321-1329.
384. Shin JS, Chung HS (2007) Antibacterial activities of phenolic components from *Camellia sinensis* L. on pathogenic microorganisms. *J Food Sci Nutr* 12: 135–140.
385. Nakayama M, Shigemune N, Tsugukuni T, Jun H, Matsushita T, Mekada Y, Kurahachi M, Miyamoto T (2012) Mechanism of the combined anti-bacterial effect of green tea extract and NaCl against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157: H7. *Food Control* 25 (1): 225-232.
386. Kohda C, Yanagawa Y, Shimamura T (2008) *Epigallocatechin gallate* inhibits intracellular survival of *Listeria monocytogenes* in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 365 (2): 310-315.
387. Si W, Gong J, Tsao R, Kalab M, Yang R, Yin Y (2006) Bioassay-guided purification and identification of antimicrobial components in Chinese green tea extract. *J Chromatogr A* 1125 (2): 204-210.
388. Bancirova M (2010) Comparison of the antioxidant capacity and the antimicrobial activity of black and green tea. *Food Res Int* 43: 1379-1382.
389. Chen YL, Tsai HL, Peng CW (2012) EGCG debilitates the persistence of EBV latency by reducing the DNA binding potency of nuclear antigen 1. *Biochem Biophys Res Commun* 417 (3): 1093-1099.
390. Nakayama M, Suzuki K, Toda M, Okubo S, Hara Y, Shimamura T (1993) Inhibition of the infectivity of influenza virus by tea polyphenols. *Antiviral Res* 21 (4): 289-299.

391. Liu S, Lu H, Zhao Q, He Y, Niu J, Debnath AK, Wu S, Jiang S (2005) Theaflavin derivatives in black tea and catechin derivatives in green tea inhibit HIV-1 entry by targeting gp41. *Biochim Biophys Acta* 1723 (1-3): 270-281.
392. Hamza A, Zhan CG (2006) How can (-)-epigallocatechin gallate from green tea prevent HIV-1 infection? Mechanistic insights from computational modeling and the implication for rational design of anti-HIV-1 entry inhibitors. *J Phys Chem B* 110 (6): 2910-2917.
393. Williamson MP, McCormick TG, Nance CL, Shearer WT (2006) Epigallocatechin gallate, the main polyphenol in green tea, binds to the T-cell receptor, CD4: potential for HIV-1 therapy. *J Allergy Clin Immunol* 118(6): 1369-1374.
394. Park BJ, Park JC, Taguchi H, Fukushima K, Hyon SH, Takatori K (2006) Antifungal susceptibility of epigallocatechin 3-*O*-gallate (EGCg) on clinical isolates of pathogenic yeasts. *Biochem Biophys Res Commun* 347 (2): 401-405.
395. Bokkenheuser VD, Shackleton CHL, Winter J (1987) Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal bacteroides from humans. *Biochem J* 248: 953-956.
396. Terao J (2010) Flavonols: Metabolism, Bioavailability, and Health Impacts. U: Fraga CG (ed.) *Plant phenolics and human health: biochemistry, nutrition, and pharmacology*. Wiley Inc, Hoboken, 185-196
397. Bustos I, García-Cayuela T, Hernández-Ledesma B, Peláez C, Requena T, Martínez-Cuesta MC (2012) Effect of flavan-3-ols on the adhesion of potential probiotic lactobacilli to intestinal cells. *J Agric Food Chem* 60 (36): 9082-9088.
398. Galati G, O'Brien PJ (2004) Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic Biol Med* 37 (3): 287-303.
399. Bailey DG, Arnold MO, Spence D (1998) Grapefruit juice-drug interactions. *Br J Clin Pharmacol* 46: 101-110.

400. Hermann-Bank ML, Skovgaard K, Stockmarr A, Larsen N, Molbak L (2013) The gut microbiotassay: a high-throughput qPCR approach combinable with next generation sequencing to study gut microbial diversity. *BMC Genomics* 14 (14): 788.
401. Vaughan EE, Heilig H, Ben-Amor K, de Vos MW (2005) Diversity, vitality and activities of intestinallactic acid bacteria and bifidobacteria assessed by molecular approaches. *FEMS Microbiol Rev* 29: 477-490.
402. Shealy DJ, Cai A, Staquet K, Baker A, Lacy ER, Johns L, Vafa O, Gunn G 3rd, Tam S, Sague S, Wang D, Brigham-Burke M, Dalmonte P, Emmell E, Pikounis B, Bugelski PJ, Zhou H, Scallon BJ, Giles-Komar J (210) Characterization of golimumab, a human monoclonal antibody specific for human TNF- α . *MAbs* 2 (4): 428-39.
403. Baumgart DC, Carding SR (2007) Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 369 (9573): 1627-40.
404. Goodrich JK, Davenport ER, Beaumont M, Jackson MA, Knight R, Ober C, Tim D, Spector TD, Bell JT, Clark AG, Ley RE (2016) Genetic determinants of the gut microbiome in UK Twins. *Cell Host Microbe* 19 (5): 731-743.
405. Kuever J (2014) The Family *Desulfovibrionaceae*. U: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F (eds.) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, 107-133
406. Ezaki T (2009) *Peptostreptococcaceae* fam. nov. U: DeVos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer K-H, Whitman WB (eds.) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd edn. Springer, New York, 1008
407. Attwood GT, Klieve AV, Ouwerkerk D, Patel BK (1998) Ammonia-hyper producing bacteria from New Zealand ruminants. *Appl Environ Microbiol* 64:1796-1804.
408. Schubert MA, Rogers MA, Ring C, Mogle J, Petrosino JP, Young VB, Aronoff DM, Schloss PD (2014) Microbiome data distinguish patients with *Clostridium difficile* infection and non-*C. difficile*-associated diarrhea from healthy controls. *mBio* 5 (3): e01021-14.

409. Bajaj J, Sanyal A, Gillevet PM (2012) Gut microflora as biomarkers for the prognosis of cirrhosis and brain dysfunction. United States Patent Application 20140179726.
410. Daneman R, Rescigno M (2009) The gut immune barrier and the blood-brain barrier: are they so different?. *Immunity* 31: 722-735.
411. Chiba H, Osanai M, Murata M, Kojima T, Sawada N. (2008) Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochim Biophys Acta* 1778 (3): 588-600.
412. Turner JR (2009) Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol* 9: 799-809.
413. Fasano A (2011) Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physiol Rev* 91: 151-175.
414. Stanley D, Mason LJ, Mackin KE (2016) Translocation and dissemination of commensal bacteria in post-stroke infection. *Nat Med* 22: 1277-1284.
415. Buscarinu MS, Romano S, Mechelli R (2018) Intestinal permeability in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurotherapeutics* 15: 68-74.
416. Medel-Matus JS, Shin D, Dorfman E (2018) Facilitation of kindling epileptogenesis by chronic stress may be mediated by intestinal microbiome. *Epilepsia Open* 3: 290-294.
417. Zlokovic BV (2008) The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 57: 178-201.
418. Tripathi A, Lammers KM, Goldblum S, Shea-Donohue T, Netzel-Arnett S, Buzza MS, Antalis TM, Vogel SN, Zhao A, Yang S, Arrietta MC, Meddings JB, Fasano A (2009) Identification of human zonulin, a physiological modulator of tight junctions, as preheptoglobin-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 106 (39): 16799-804.
419. Fasano A (2000) Regulation of intercellular tight junctions by zonula occludens toxin and its eukaryotic analogue zonulin. *Ann NY Acad Sci* 915: 214-222.

420. Cao Y, Goods BA, Raddassi K (2015) Functional inflammatory profiles distinguish myelinreactive T cells from patients with multiple sclerosis. *Sci Transl Med* 7: 287ra74.
421. Kaskow BJ, Baecher-Allan C (2018) Effector T Cells in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 8: a029025.
422. Mao LY, Ding J, Peng WF (2013) Interictal interleukin-17A levels are elevated and correlate with seizure severity of epilepsy patients, *Epilepsia* 54: e142-e145.
423. Gao F, Gao Y, Zhang SJ (2017) Alteration of plasma cytokines in patients with active epilepsy. *Acta Neurol Scand* 135: 663-669.
424. Seifert HA, Collier LA, Chapman CB (2014) Pro-inflammatory interferon gamma signaling is directly associated with stroke induced neurodegeneration. *J Neuroimmune Pharmacol* 9: 679-689.
425. Shichita S, Sugiyama Y, Ooboshi H (2009) Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing $\gamma\delta$ T cells in the delayed phase of ischemic brain injury. *Nat Med* 15: 946-951.
426. Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I (2007) Human Th17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med* 13: 1173-1175.
427. Sapone A, de Magistris L, Pietzak M, Clemente MG, Tripathi A, Cucca F, Lampis R, Kryszak D, Carteni M, Generoso M, Iafusco D, Prisco F, Laghi F, Riegler G, Carratu R, Counts D, Fasano A (2006) Zonulin upregulation is associated with increased gut permeability in subjects with type 1 diabetes and their relatives. *Diabetes* 55: 1443-1449.
428. Klaus DA, Motal MC, Burger-Klepp U, Marschalek C, Schmidt EM, Lebherz-Eichinger D, Krenn CG, Roth G (2013) Increased plasma zonulin in patients with sepsis. *Biochem Med (Zagreb)* 23: 107-111.
429. Obrenovich ME, Shola D, Schroedel K, Agahari A, Lonsdale D (2015) The role of trace elements, thiamine and transketolase in autism and autistic spectrum disorder. *Front Biosci* 7: 263-277.

430. Perez-Muñoz ME, Arrieta MC, Ramer-Tait AE, Walter J (2017) A critical assessment of the “sterile womb” and “in utero colonization” hypotheses: Implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome* 5: 48.
431. Bravo JA, Forsythe P, Chew MV, Escaravage E, Savignac HM, Dinan TG, Bienenstock J, Cryan JF (2011) Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 16050-16055.
432. Shalev H, Serlin Y, Friedman A (2009) Breaching the blood-brain barrier as a gate to psychiatric disorder. *Cardiovasc Psychiatry Neurol* 2009: 1-7.
433. Waubant E (2006) Biomarkers indicative of blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Dis Markers* 22: 235-244.
434. Ortiz GG, Pacheco-Moisés FP, Macías-Islas MA, Flores-Alvarado LJ, Mireles-Ramírez MA, González-Renovato ED, Hernández-Navarro VE, Sánchez-López AL, Alatorre-Jiménez, MA (2014) Role of the blood-brain barrier in multiple sclerosis. *Arch Med Res* 45: 687-697.
435. Schneider SW, Ludwig T, Tatenhorst L, Braune S, Oberleithner H, Senner V, Paulus W (2004) Glioblastoma cells release factors that disrupt blood-brain barrier features. *Acta Neuropathol* 107: 272-276.
436. Kolappan S, Coureuil M, Yu X, Nassif X, Egelman EH, Craig L (2016) Structure of the *Neisseria meningitidis* type IV pilus. *Nat Commun* 7: 13015.
437. Daneman R, Prat A (2015) The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7: a020412.
438. Banack S, Caller T, Stommel E (2010) The cyanobacteria derived toxin beta-N-methylamino-L-alanine and amyotrophic lateral sclerosis. *Toxins* 2: 2837-2850.
439. Zipser BD, Johanson CE, Gonzalez L, Berzin TM, Tavares R, Hulette CM, Vitek PM, Hovanesian V, Stopa EG (2007) Microvascular injury and blood-brain barrier leakage in Alzheimer’s disease. *Neurobiol Aging* 28: 977-986.

440. Erickson MA, Banks WA (2013) Blood-brain barrier dysfunction as a cause and consequence of Alzheimer's disease. *J Cereb Blood Flow Metab* 33: 1500-1513.
441. Baysal A, Ozbek N, Akman S (2013) Determination of trace metal sin waste water and their removal process, U: Einschlag FS, Carlos L (eds.) *Waste Water-Treatment Technologies and Recent Analytical Developments*. IntechOpen, London, Chapter 7,146-171
442. Lončarić Z, Kadar I, Jurković Z, Kovačević V, Popović B, Karalić K (2012) Teški metali od polja do stola. Collection papers of 47th Croatian and 7th International Symposium on Agriculture: 14-23.
443. Klotz K, Weistenhöfer W, Neff F, Hartwig A, van Thriel C, Drexler H (2017) The health effects of aluminum exposure. *Dtsch Arztebl Int* 114 (39): 653-659.
444. Willhite CC, Karyakina NA, Yokel RA, Yenugadhati N, Wisniewski TM, Arnold IM, Momoli F, Krewski D (2014) Systematic review of potential health risks posed by pharmaceutical, occupational and consumer exposures to metallic and nanoscale aluminum, aluminum oxides, aluminum hydroxide and its soluble salts. *Crit Rev Toxicol* 44 (4): 1-80.
445. Lukiw WJ, Percy ME, Kruck TP (2005) Nanomolar aluminum induces pro-inflammatory and pro-apoptotic gene expression in human brain cells in primary culture. *J Inorg Biochem* 99: 1895-8.
446. Lukiw WJ, Pogue AI (2007) Induction of specific micro RNA (miRNA) species by ROS-generating metal sulfates in primary human brain cells. *J Inorg Biochem* 101: 1265-9.
447. Manal S, Azza H, Eman T (2010) The protective effect of vitamin e against the neurotoxic effect of aluminum chlorid in male albino rat. *J Am Sci* 6 (10): 978-991.
448. Munoz DG, Feldman H (2000) Causes of Alzheimer's disease. *Can Med Assoc J* 162: 65-72.

449. Nayak P, Sharma SB, Chowdary NV (2010) Augmentation of aluminum-induced oxidative stress in rat cerebrum by presence of pro-oxidant (graded doses of ethanol) exposure. *Neurochem Res* 35: 1681-90.
450. Nedzvetsky V, Tuzcu M, Yasar A, Tikhomirov A, Baydas G (2007) Effect of vitamin E against aluminium neurotoxicity in rats. *Biochemistry* 71 (3): 239-44.
451. Nehru B, Anand P (2005) Oxidative damage following chronic aluminium exposure in adult and pup rat brains. *J Trace Elem Med Biol* 19: 203-208.
452. Ouafa R, Djebli E (2008) Chronic exposure to aluminum chloride in mice: exploratory behaviors and spatial learning. *J Biol Res* 2 (1-2): 26-33.
453. Khan A, Ali T, Rehman SU, Khan MS, Alam SI, Ikram M, Muhammad T, Saeed K, Badshah H, Kim MO (2018) Neuroprotective effect of quercetin against the detrimental effects of LPS in the adult mouse brain. *Front Pharmacol* 9: 1383.
454. Sabogal-Guáqueta AM, Muñoz-Manco JI, Ramírez-Pineda JR, Lamprea-Rodriguez M, Osorio E, Cardona-Gómez GP (2015) The flavonoid quercetin ameliorates Alzheimer's disease pathology and protects cognitive and emotional function in aged triple transgenic Alzheimer's disease model mice. *Neuropharmacology* 93: 134-145.
455. Khan H, Ullah H, Aschner M, Cheang WS, Akkol EK (2019) Neuroprotective effects of quercetin in Alzheimer's disease. *Biomolecules* 10 (1): 59.
456. Ott DB, Hartwig A, Stillman MJ (2019) Competition between Al^{3+} and Fe^{3+} binding to human transferrin and toxicological implications: structural investigations using ultra-high resolution ESI MS and CD spectroscopy. *Metallomics* 11(5): 968-981.
457. Walton JR (2012) Aluminum disruption of calcium homeostasis and signal transduction resembles change that occurs in aging and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 29: 255-273.
458. Núñez MT, Hidalgo C (2019) Noxious iron-calcium connections in neurodegeneration. *Front Neurosci* 13: 48.

459. Sakanashi Y, Oyama K, Matsui H, Oyama TB, Oyama TM, Nishimura Y, Sakai H, Oyama Y (2008) Possible use of quercetin, an antioxidant, for protection of cells suffering from overload of intracellular Ca^{2+} : a model experiment. *Life Sci* 83: 164-169.
460. Nicoteral P, Orrenius S (1998) The role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium* 23: 173-180.
461. Hollman PCH, Katan MB (1997) Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed Pharmacother* 51: 305-310.
462. Kumar V, Bal A, Gill KD (2009a) Susceptibility of mitochondrial superoxide dismutase to aluminium induced oxidative damage. *Toxicology* 255: 117-123
463. Castilho T, Matias T, Keller N, Jaqueline N (2018) Study of interaction between metal ions and quercetin. *Food Sci Hum Well* 7: 215-219.
464. Cornard JP, Merlin JC (2002) Spectroscopic and structural study of complexes of quercetin with Al(III). *J Inorg Biochem* 92: 19-27.
465. Kumar V, Bal A, Gill KD (2009b) Aluminium-induced oxidative DNA damage recognition and cell-cycle disruption in different regions of rat brain. *Toxicology* 264: 137-144.
466. Moumen R, Ait-Oukhatar N, Bureau F, Fleury C, Bouble D, Arhan P, Neuville D, Viader F (2001) Aluminium increases xanthine oxidase activity and disturbs antioxidant status in the rat. *J Trace Elem Med Biol* 15: 89-93.
467. Sethi P, Jyoti A, Singh R, Hussain E, Sharma D (2008) Aluminium-induced electrophysiological, biochemical and cognitive modifications in the hippocampus of aging rats. *Neurotoxicology* 29: 1069-1079.
468. Exley C (2004) The pro-oxidant activity of aluminium. *Free Radic Biol Med* 36: 380-387.
469. Bondy SC, Guo-Ross SX, Truong AT (1998) Promotion of transition metal-induced reactive oxygen species formation by beta-amyloid. *Brain Res* 799: 91-96.

470. Becaria A, Campbell A, Bondy SC (2003) Aluminum and copper interact in the promotion of oxidative but not inflammatory events: implications for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 5: 31-38.
471. Berthon G (2002) Aluminum speciation in relation to aluminum bioavailability, metabolism and toxicity. *Coord Chem Rev* 228: 319-341.
472. Niu PY, Niu Q, Zhang QL, Wang LP, He SE, Wu TC, Conti P, Di GM, Boscolo P, (2005) Aluminum impairs rat neural cell mitochondria in vitro. *Int J Immunopathol Pharmacol* 18: 683-689.
473. Kumar V, Bal A, Gill KD (2008) Impairment of mitochondrial energy metabolism in different regions of rat brain following chronic exposure to aluminium. *Brain Res* 1232: 94-103.
474. Li H, Zheng L, Chen C, Liu X, Zhang W (2019) Brain senescence caused by elevated levels of reactive metabolite methylglyoxal on D-galactose-induced aging mice. *Frontiers in Neuroscience* 13: 1004.
475. Satyendra SB, Nikhil S, Rajendra SB, Preeti A, Sarlesh R (2012) A review of quercetin: antioxidant and anticancer properties. *World J Pharm Pharmaceut Sci* 1(1):146-160.
476. McGinty D, Szymusiak R (2017) Neural Control of Sleep in Mammals. U: Kryger M, Dement WC, Roth T (eds.) *Principles and practice of sleep medicine*. 6th edition. Elsevier, 62-77
477. Lafuente JE (2004) Involvement and consequences of blood brain barrier permeability after minimal injury in rat cerebral cortex in blood-spinal cord and brain barriers in health and disease. U: Sharma HS, Westman J (eds.) *Blood-spinal cord and brain barriers in health and disease*. Elsevier, 577-605
478. Agranoff BW (2001) Protein Synthesis and Memory. U: Smelser NJ, Baltes PB (eds.) *International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences*. Elsevier, 12247-12252

479. Malorni W, Rainaldi G, Rivabene R (1994) Cytoskeletal oxidative changes lead to alterations of specific cell surface receptors. *Eur J Histochem* 38: 91-100.
480. Gonos ES, Kapetanou M, Sereikaite J, Bartosz G, Naparło K, Grzesik M, Sadowska-Bartosz I (2018) Origin and pathophysiology of protein carbonylation, nitration and chlorination in age-related brain diseases and aging. *Aging* 10 (5): 868-901.
481. Nyström T (2007) A bacterial kind of aging. *PLOS Genetics* 3: e224.
482. Selvakumar K, Bavithra S, Krishnamoorthy G, Venkataraman P, Arunakaran J (2012). Polychlorinated biphenyls-induced oxidative stress on rat hippocampus: a neuroprotective role of quercetin. *Sci World J* 2012: 980314.
483. Ansaria MA, Abdula HM, Joshia G, Opii WO, Butterfield DA (2009) Protective effect of quercetin in primary neurons against $A\beta$ (1-42): relevance to Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem* 20 (4): 269- 275.
484. Al-Otaibi SS, Arafah MM, Sharma B, Alhomida AS, Siddiqi NJ (2018) Synergistic effect of quercetin and α -lipoic acid on aluminium chloride induced neurotoxicity in rats. *J Toxicol* 2018: 8.
485. Denny KM, Muralidhara J (2013) Enhanced neuroprotective effect of fish oil in combination with quercetin against 3-nitropropionic acid induced oxidative stress in rat brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 40: 83- 92.
486. Pragya S, Zahoor AS, Amit K, Fakhrul I, Mishra KP (2007) Role of combined administration of Tiron and glutathione against aluminum-induced oxidative stress in rat brain. *J Trace Elem Med Biol* 21: 63-70.
487. Rui D, Yongjian Y (2010) Aluminum chloride induced oxidative damage on cells derived from hippocampus and cortex of ICR mice. *Brainresearch* 1324: 96-102.
488. Gutteridge JM (1995) Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 41: 1819-1828.

489. Julka D, Gill KD (1996) Altered calcium homeostasis: a possible mechanism of aluminium-induced neurotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 1315: 47-54.
490. Ellen YY, Guo-Ross SS, Bondy SC (1999) The stabilization of ferrous iron by a toxic b-amyloid fragment and by an aluminum salt. *Brain Res* 839: 221-226.
491. Bondy SC, Kirstein S (1996) The promotion of iron-induced generation of ROS in nerve tissue by aluminium. *Mol Chem Neuropathol* 27: 185-194.
492. Ferretti G, Marchionni C, Bacchetti T, Galeazzi T, Dousset N (2003) Effect of aluminum on lipid peroxidation of human high density lipoproteins. *Free Radic Res* 37: 515-521.
493. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160 (1): 1-40.
494. Veer BG, Anithaa S, Hegdea ML, Zecca L, Garruto RM, Ravid R, Shankar SK, Stein R, Shanmugavelu P, Jagannatha KS (2005) Aluminium in Alzheimer's disease: are we still at a crossroad?. *Cell Mol Life Sci* 62:143-158.
495. Pratico D, Sung S (2004) Lipid peroxidation and oxidative imbalance: early functional events in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 6:171-175.
496. Sharma P, Ahmad SZ, Kumar A, Islam F, Mishra KP (2007) Role of combined administration of Tiron and glutathione against aluminum-induced oxidative stress in rat brain. *J Trace Elem Med Biol* 21: 63-70.
497. Shati AA, Elsaid FG, Hafez EE (2011) Biochemical and molecular aspects of aluminium chloride-induced neurotoxicity in mice and the protective role of *Crocus sativus L.* extraction and honey syrup. *Neuroscience* 175: 66-74.
498. Heo HJ, Lee CY (2004) Protective effects of quercetin and vitamin C against oxidative stress-induced neurodegeneration. *J Agric Food Chem* 52: 7514-7.

499. Mahesh T, Menon VP (2004) Quercetin alleviates oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytother Res* 18 (2): 123-127.
500. Fiorani M, De Sanctis S, Menghinello P, Cucchiarini L, Cellini B, Dacha M (2001) Quercetin prevents glutathione depletion induced by dehydroascorbic acid in rabbit red blood cells. *Free Radic Res* 34(6): 639-648.
501. Kim MS, Lee JI, Lee WY, Kim SE (2004) Neuroprotective effect of *Ginkgo biloba L.* extract in a rat model of Parkinson's disease. *Phytother Res* 18 (8): 663–666.
502. Tria J, Butler ECV, Haddad PR, Bowie AR (2007) Determination of aluminium in natural water samples. *Anal Chim Acta* 588: 153-165.
503. Lashgari N, Badieli A, Mohammadi ZG (2016) A fluorescent sensor for Al (III) and colorimetric sensor for Fe (III) and Fe (II) based on a novel 8-hydroxyquinoline derivative. *J Fluoresc* 26: 1885-1894.
504. Wang X, Cheng D, Jiang J, Ma Y (2018) Mechanisms underlying aluminum neurotoxicity related to 14-3-3 ζ protein. *Toxicol Sci* 163 (1): 45-56.
505. Chiroma SM, Moklasa MAM, Taiba CNM, Baharuldina MTH, Amonc Z (2018) D-galactose and aluminium chloride induced rat model with cognitive impairments. *Biomed Pharmacoth* 103: 1602-1608.
506. Bouras C, Giannakopoulos P, Good PF, Hsu A, Hof PR, Perl DP (1997) A laser microprobe mass analysis of brain aluminum and iron in dementia pugilistica: comparison with Alzheimer's disease. *Eur Neurol* 38 (1): 53-58.
507. Yumoto S, Kakimi S, Ohsaki A, Ishikawa A (2009) Demonstration of aluminum in amyloid fibers in the cores of senile plaques in the brains of patients with Alzheimer's disease. *J Inorg Biochem* 103 (1): 1579-1584.
508. Pratico D, Uryu K, Sung S, Tang S, Trojanowski JQ, Lee VM (2002) Aluminum modulates brain amyloidosis through oxidative stress in APP transgenic mice. *FASEB J* 16 (9): 1138-1140.

509. Rodella LF, Ricci RF, Borsani E (2008) Aluminium exposure induces Alzheimer's disease-like histopathological alterations in mouse brain. *Histol Histopathol* 23 (4-6): 433-439.
510. Savory J, Huang Y, Herman MM, Reyes MR, Wills MR (1995) Tau immunoreactivity associated with aluminum maltolate-induced neurofibrillary degeneration in rabbits. *Brain Res* 669 (2): 325-329.
511. Sadigh-Eteghad S, Sabermarouf B, Majdi A, Talebi M, Farhoudi M, Mahmoudi J (2014) Amyloid-beta: a crucial factor in Alzheimer's disease. *Med Princ Pract* 24 (1): 1-10.
512. Parker MH, Reitz AB (2000) Assembly of β -Amyloid Aggregates at the Molecular Level. *Chemtracts Org Chem* 13 (1): 51-56.
513. Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I (2008). Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nature Med* 14 (8): 837-42.
514. Prelli F, Castaño E, Glenner GG, Frangione B (1988) Differences between vascular and plaque core amyloid in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 51 (2): 648-51.
515. Panza F, Frisardi V, Solfrizzi V, Imbimbo BP, Logroscino G, Santamato A, Greco A, Seripa D, Pilotto A (2012) Immunotherapy for Alzheimer's disease: from anti-beta-amyloid to tau-based immunization strategies. *Immunotherapy* 4: 213-38.
516. Ohsawa K, Imai Y, Sasaki Y, Kohsaka S (2004) Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *J Neurochem* 88: 844-856.
517. Taipa R, Brochado P, Robinson A, Reis I, Costa P, Mann DM (2017) Patterns of Microglial Cell Activation in Alzheimer Disease and Frontotemporal Lobar Degeneration. *Neurodegener Dis* 17: 145-154.
518. Baron R, Babcock AA, Nemirovsky A, Finsen B, Monsonego A (2014) Accelerated microglial pathology is associated with $A\beta$ plaques in mouse models of Alzheimer's disease. *Aging Cell* 13: 584-95.

519. Hickman SE, Allison EK, El Khoury J (2008) Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *J Neurosci* 28: 8354-60.
520. Vargas-Restrepo F, Sabogal-Guáqueta AM, Cardona-Gómez GP (2018) Quercetin ameliorates inflammation in CA1 hippocampal region in aged triple transgenic Alzheimer's disease mice model. *Biomedica* 38: 62-9.
521. Hopperton KE, Mohammad D, Trépanier MO, Giuliano V, Bazinet RP (2017) Markers of microglia in postmortem brain samples from patients with Alzheimer's disease: a systematic review. *Mol Psychiatry* 23 (2): 177-198.
522. Minett T, Classey J, Matthews FE, Fahrenhold M, Taga M, Brayne C (2016) Microglial immunophenotype in dementia with Alzheimer's pathology. *J Neuroinflammation* 13: 1-10.
523. Tischer J, Krueger M, Mueller W, Staszewski O, Prinz M, Streit WJ (2016) Inhomogeneous distribution of Iba-1 characterizes microglial pathology in Alzheimer's disease. *Glia* 64: 1562-1572.
524. Tao X, Finkbeiner S, Arnold DB, Shaywitz AJ, Greenberg ME (1998) Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* 20: 709-26.
525. Lin WT, Chen RC, Lu WW, Liu SH, Yang FY (2015) Protective effects of low-intensity pulsed ultrasound on aluminum-induced cerebral damage in Alzheimer's disease rat model. *Sci Rep* 5: 9671.
526. Ghoneim FM, Khalaf HA, Elsamanoudy AZ, Abo El-khair SM, Helaly AMN, Mahmoud EM, Elshafey SH (2015) Protective effect of chronic caffeine intake on gene expression of brain derived neurotrophic factor signaling and the immunoreactivity of glial fibrillary acidic protein and Ki-67 in Alzheimer's disease. *Int J Clin Exp Pathol* 8: 7710-28.
527. Ahmed HH, Estefan SF, Mohamd EM, Farrag AH, Salah RS (2013) Does melatonin ameliorate neurological changes associated with Alzheimer's disease in ovariectomized rat model? *Ind J Clin Biochem* 28: 381-9.

528. Abu-Taweel GM, Ajarem JS, Ahmad M (2012) Neurobehavioral toxic effects of perinatal oral exposure to aluminum on the developmental motor reflexes, learning, memory and brain neurotransmitters of mice offspring. *Pharmacol Biochem Behav* 101: 49-56.
529. Terao J, Murota K, Kawai Y (2011) Conjugated quercetin glucuronides as bioactive metabolites and precursors of aglycone in vivo. *Food Funct* 2: 11-17.
530. Baral S, Pariyar R, Kim J, Lee HS, Seo J (2017) Quercetin-3-*O*-glucuronide promotes the proliferation and migration of neural stem cells. *Neurobiol. Aging* 52: 39-52.
531. Karimipour M, Rahbarghazi R, Tayefi H, Shimia M, Ghanadian M, Mahmoudi J, Bagheri HS (2019) Quercetin promotes learning and memory performance concomitantly with neural stem/progenitor cell proliferation and neurogenesis in the adult rat dentate gyrus. *Int J Dev Neurosci* 74: 18-26.
532. Liu P, Zou D, Yi L, Chen M, Gao Y, Zhou R, Zhang Q, Zhou Y, Zhu J, Chen K (2015) Quercetin ameliorates hypobaric hypoxia-induced memory impairment through mitochondrial and neuron function adaptation via the PGC-1 alpha pathway. *Restor Neurol Neurosci* 33: 143-157.
533. Singh V, Panwar R (2014) *In vivo* antioxidative and neuroprotective effect of 4-allyl-2-methoxyphenol against chlorpyrifos-induced neurotoxicity in rat brain. *Mol Cell Biochem* 388: 61-74.
534. Prasad SN, Muralidhara (2013). Neuroprotective efficacy of eugenol and isoeugenol in acrylamide-induced neuropathy in rats: behavioral and biochemical evidence. *Neurochem Res* 38: 330-45.
535. Bilkei-Gorzo A (1993) Neurotoxic effect of enteral aluminium. *Food Chem Toxicol* 31: 357-61.
536. Alleva E, Rankin J, Santucci D (1998) Neurobehavioural alteration in rodents following developmental exposure to aluminum. *Toxicol Ind Health* 14: 209-21.

537. Kaizer RR, Corrêa MC, Gris LR, da Rosa CS, Bohrer D, Morsch VM, Schetinger C (2008) Effect of long-term exposure to aluminum on the acetylcholinesterase activity in the central nervous system and erythrocytes. *Neurochem Res* 33: 2294-301.
538. Ademosun AO, Oboh G, Bello F, Ayeni PO (2016) Antioxidative properties and effect of quercetin and its glycosylated form (rutin) on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities. *J Evid Based Complementary Altern Med* 21 (4): 11-7.
539. Napatr S, Jintanaporn W, Supaporn M, Tiamkao S, Kamoltip B, Kowit C (2012) Cognitive-enhancing effect of quercetin in a rat model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*.
540. Santosa D, Milatovic D, Andradea V, Batoreua C, Aschner M, Marreilha dos Santosa AP (2012) The inhibitory effect of manganese on acetylcholinesterase activity enhances oxidative stress and neuroinflammation in the rat brain. *Toxicology* 292: 90-98.
541. Zatta P, Ibn-Lkhatay-Idrissi M, Zambenedetti P, Kilyen M, Kiss T (2002) *In vivo* and *in vitro* effects of aluminum on the activity of mouse brain acetylcholinesterase. *Brain Res Bull* 59 (1): 41-45.
542. Payen JF, Fauvage B, Falcon D, Lavagne P (2003) Brain oedema following blood-brain barrier disruption: mechanisms and diagnosis. *Ann Fr Anesth Reanim* 22 (3): 220-5.
543. Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy SS (2007) Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacol* 15 (6): 252-259.
544. Hudiček Martinčić G, Kušan Jukić M, Salihagić Kadić A (2004) Dušikov oksid – važna signalna molekula u normalnoj i patološkoj trudnoći. *Liječ Vjesn* 126: 80-85.
545. Cannon RO (1998) Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin Chem* 44: 1809-1819.
546. Kanwar JR, Kanwar RK, Burrow H, Baratchi S (2009) Recent advances on the roles of NO in cancer and chronic inflammatory disorders. *Curr Med Chem* 16 (19): 2373-2394.

547. Tohgi H, Abe T, Yamazaki K, Murata T, Isobe C, Ishizaki E (1998) The cerebrospinal fluid oxidized NO metabolites, nitrite and nitrate, in Alzheimer's disease and vascular dementia of Binswanger type and multiple small infarct type. *J Neural Transm (Vienna)* 105 (10-12): 1283-91.
548. Kovachich GB, Mishra OP (1980) Lipid peroxidation in rat brain cortical slices as measured by the thiobarbituric acid test. *J Neurochem* 35: 1449-1452.
549. Schulz JB, Matthews RT, Klockgether T, Dichgans J, Beal MF (1997) The role of mitochondrial dysfunction and neuronal nitric oxide in animal models of neurodegenerative diseases. *Mol Cell Biochem* 174:193-197.
550. DiCiero Miranda M, de Bruin VM, Vale MR, Viana GS (2000) Lipid Peroxidation and nitrite plus nitrate levels in brain tissue from patients with Alzheimer's disease. *Gerontology* 46:179-184.
551. Simonian NA, Coyle JT (1996) Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36: 83-106.
552. Fiorani M, Guidarelli A, Blasa M, Azzolini C, Candiracci M, Piatti E, Cantoni O (2010) Mitochondria accumulate large amounts of quercetin: prevention of mitochondrial damage and release upon oxidation of the extramitochondrial fraction of the flavonoid. *J Nutr Biochem* 21: 397-404.
553. Kanter M, Unsal C, Aktas C, Erboğa M (2013) Neuroprotective effect of quercetin against oxidative damage and neuronal apoptosis caused by cadmium in hippocampus. *Toxicol Ind Health* 32 (3): 541-50.
554. Choi SM, Kim BC, Cho YH, Choi KH, Chang J, Park MS, Kim MK, Cho KH, Kim JK (2014) Effects of flavonoid compounds on beta-amyloid-peptide-induced neuronal death in cultured mouse cortical neurons. *Chonnam Med J* 50: 45-51.
555. Liu R, Zhang TT, Zhou D, Bai XY, Zhou WL, Huang C, Song JK, Meng FR, Wu CX, Li L, Du GH (2013) Quercetin protects against the $A\beta(25-35)$ -induced amnesic injury: involvement of inactivation of rage-mediated pathway and conservation of the NVU. *Neuropharmacology* 67: 419-431.

556. Garcia-Mediavilla V, Crespo I, Collado PS, Esteller A, Sanchez-Campos S, Tunon MJ, Gonzalez-Gallego J (2007) The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and downregulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *Eur J Pharmacol* 557: 221-229.
557. Martinez-Florez S, Gutierrez-Fernandez B, Sanchez-Campos S, Gonzalez-Gallego J, Tunon MJ (2005) Quercetin attenuates nuclear factor-kappaB activation and nitric oxide production in interleukin-1beta-activated rat hepatocytes. *J Nutr* 135:1359-1365.
558. Banerjee T, Van der Vliet A, Ziboh VA (2002) Downregulation of COX-2 and iNOS by amentoflavone and quercetin in A549 human lung adenocarcinoma cell line. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acid* 66: 485-492.
559. de Pascual-Teresa S, Johnston KL, DuPont MS, O'Leary KA, Needs PW, Morgan LM, Clifford MN, Bao Y, Williamson G (2004) Quercetin metabolites downregulate cyclooxygenase-2 transcription in human lymphocytes *ex vivo* but not *in vivo*. *J Nutr* 34: 552-557.
560. Park CH, Chang JY, Hahm ER, Park S, Kim HK, Yang CH. Quercetin, a potent inhibitor against beta-catenin/Tcf signaling in SW480 colon cancer cells (2005) *Biochem Biophys Res Commun* 328: 227-234.
561. Russo GL, Russo M, Spagnuolo C, Tedesco I, Bilotto S, Iannitti R, Palumbo R (2014) Quercetin: a pleiotropic kinase inhibitor against cancer. *Cancer Treat Res* 159: 185-205.
562. Russo M, Spagnuolo C, Tedesco I, Bilotto S, Russo GL (2012) The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: facts and fancies. *Biochem Pharmacol* 83: 6-15.
563. Psahoulia FH, Moutzi S, Roberts ML, Sasazuki T, Shirasawa S, Pintzas A (2007) Quercetin mediates preferential degradation of oncogenic Ras and causes autophagy in Ha-RAS-transformed human colon cells. *Carcinogenesis* 28:1021-1031.
564. Youdim KA, Shukitt-Hale B, Joseph JA (2004) Flavonoids and the brain: interactions at the blood-brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. *Free Radic Biol Med* 37: 1683-1693.

565. Yao RQ, Qi DS, Yu HL, Liu J, Yang LH, Wu XX (2012) Quercetin attenuates cell apoptosis in focal cerebral ischemia rat brain via activation of BDNF-TrkB-PI3K/Akt signaling pathway. *Neurochem Res* 37: 2777-2786.
566. Lara-Guzman OJ, Tabares-Guevara JH, Leon-Varela YM, Alvarez RM, Roldan M, Sierra JA, Londono-Londono JA, Ramirez-Pineda JR (2012) Proatherogenic macrophage activities are targeted by the flavonoid quercetin. *J Pharmacol Exp Ther* 343: 296-306.
567. Polis B, Samson AO (2018) Arginase as a potential target in the treatment of Alzheimer's Disease. *Adv Alzheimers Dis* 7: 119-140.
568. Peters D, Berger J, Langnaese K, Derst C, Madai VI, Krauss M, Fischer KD, Veh RW, Laube G (2013) Arginase and arginine decarboxylase where do the putative gate keepers of polyamine synthesis reside in rat brain?. *PLoS ONE* 8: e66735.
569. Polis B, Kolluru DS, Elliott E, Gil-Henn H, Samson AO (2018) L-norvaline reverses cognitive decline and synaptic loss in a murine model of Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* 15 (4): 1036-1054.
570. Cai H, Cong W, Ji S, Rothman S, Maudsley S, Martin B (2012) Metabolic dysfunction in Alzheimer's disease and related neurodegenerative disorders. *Curr Alzheimer Res* 9: 5-17.
571. Luchsinger JA (2008) Adiposity, hyperinsulinemia, diabetes and Alzheimer's disease. An Epidemiological Perspective. *Eur J Pharmacol* 585: 119-129.
572. Alford S, Patel D, Perakakis N, Mantzoros CS (2018) Obesity as a risk factor for Alzheimer's disease: weighing the evidence. *Obes Rev* 19: 269-280.
573. Lathe R, Saponova A, Kotelevtsev Y (2014) Atherosclerosis and Alzheimer's diseases with a common cause? Inflammation, oxysterols, vasculature. *BMC Geriatrics* 14: 36.
574. Gupta A, Iadecola C (2015) Impaired $A\beta$ Clearance: a Potential link between atherosclerosis and Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* 7: 115.

575. Esch F, Lin KI, Hills A, Zaman K, Baraban JM, Chatterjee S, Rubin L, Ash DE, Ratan RR (1998) Purification of a multipotent antideath activity from bovine liver and its identification as arginase: nitric oxide-independent inhibition of neuronal apoptosis. *J Neurosci* 18: 4083-4095.
576. Deng K, He H, Qiu J, Lorber B, Bryson JB, Filbin MT (2009) Increased synthesis of spermidine as a result of upregulation of arginase i promotes axonal regeneration in culture and *in vivo*. *J Neurosci* 29: 9545-9552.
577. Pernow J, Jung C (2013) Arginase as a potential target in the treatment of cardiovascular disease: reversal of arginine steal? *Cardiovasc Res* 98 (3): 334-43.
578. Gueli MC, Taibi G (2013) Alzheimer's disease: amino acid levels and brain metabolic status. *Neurol Sci* 34: 1575-1579.
579. Liu P, Fleete MS, Jing Y, Collie ND, Curtis MA, Waldvogel HJ, Faull RL, Abraham WC, Zhang H (2014) Altered arginine metabolism in Alzheimer's disease brains. *Neurobiol Aging* 35: 1992-2003.
580. Chang CI, Liao JC, Kuo L (1998) Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. *Am J Physiol* 274 (1): H342-8.
581. da Silva ER, Maquiaveli Cdo C, Magalhães PP (2012) The leishmanicidal flavonols quercetin and quercitrin target *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase. *Exp Parasitol* 130: 183-188.
582. Manjolin LC, dos Reis MB, Maquiaveli Cdo C, Santos-Filho OA, da Silva ER (2013) Dietary flavonoids fisetin, luteolin and their derived compounds inhibit arginase, a central enzyme in *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Food Chem* 141 (3): 2253-62.
583. Kanimozhi S, Subramanian P, Shanmugapriya S, Sathishkumar S (2017) Role of Bioflavonoid Quercetin on Expression of Urea Cycle Enzymes, Astrocytic and Inflammatory Markers in Hyperammonemic Rats. *Indian J Clin Biochem* 32(1): 68-73.
584. de Strooper B, Karran E (2016) The cellular phase of Alzheimer's disease. *Cell* 164: 603-615.

585. Meraz-Ríos MA, Toral-Rios D, Franco-Bocanegra D, Villeda-Hernández J, Campos-Peña V (2013) Inflammatory process in Alzheimer's disease. *Front Integr Neurosci* 7 (59): 1-15.
586. Calsolaro V, Edison P (2016) Neuroinflammation in Alzheimer's disease: current evidence and future directions. *Alzheimers Dement* 12 (6): 719-32.
587. Combs CK, Karlo JC, Kao SC, Landreth GE (2001) Beta-amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNF- α - dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *J Neurosci* 21(4):1179-1188.
588. Lindberg C, Hjorth E, Post C, Winblad B, Schultzberg M (2005) Cytokine production by a human microglial cell line: effects of beta-amyloid and alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Neurotox Res* 8: 267-276.
589. Yamamoto M, Kiyota T, Horiba M, Buescher JL, Walsh SM, Gendelman HE, Ikezu T (2007) Interferon- γ and tumor necrosis factor- α regulate amyloid- β plaque deposition and β secretase expression in Swedish mutant APP transgenic mice. *Am J Pathol* 170 (2): 680-692.
590. Fiala M, Zhang L, Gan X, Sherry B, Taub D, Graves MC, Hama S, Way D, Weinand M, Witte M, Lorton D, Kuo YM, Roher AE (1998) Amyloid-beta induces chemokine secretion and monocyte migration across a human blood-brain barrier model. *Mol Med* 4: 480-489.
591. Britschgi M, Wyss-Coray T (2007) Systemic and acquired immune responses in Alzheimer's disease. *Int Rev Neurobiol* 82: 205-233.
592. Bonotis K, Krikki E, Holeva V, Aggouridaki C, Costa V, Baloyannis S (2008) Systemic immune aberrations in Alzheimer's disease patients. *J Neuroimmunol* 193(1-2):183-187.
593. Chen Z, Jalabi W, Shpargel KB, Farabaugh KT, Dutta R, Yin X, Kidd GJ, Bergmann CC, Stohlman SA, Trapp BD (2012). Lipopolysaccharide-induced microglial activation and neuroprotection against experimental brain injury is independent of hematogenous TLR4. *J Neurosci* 32: 11706-11715.

594. Catorce MN, Gevorkian G (2016). LPS-induced murine neuroinflammation model: main features and suitability for pre-clinical assessment of nutraceuticals. *J Curr Neuropharmacol* 14: 155–1.
595. Yu XL, Li YN, Zhang H, Su YJ, Zhou WW, Zhang ZP, Wang SW, Xu PX, Wang YJ, Liu RT (2015) Rutin inhibits amylin-induced neurocytotoxicity and oxidative stress. *Food Funct* 6(10): 3296-306.
596. Xu PX, Wang SW, Yu XL, Su YJ, Wang T, Zhou WW, Zhang H, Wang YJ, Liu RT (2014) Rutin improves spatial memory in Alzheimer's disease transgenic mice by reducing $A\beta$ oligomer level and attenuating oxidative stress and neuroinflammation. *Behav Brain Res* 264: 173-180.

8. POPIS OZNAKA I KRATICA

16S rRNA	16S ribosomska RNA (engl. <i>16S ribosomal RNA</i>)
3xTgAD	miš homozigot za APP (Swe), tau (P301L) i PS1 (M146V)
4G8	anti amiloid beta protutijelo
5-HT	8-hidroksitriptamin, serotonin (engl. <i>5-hydroxytryptamine</i>)
Aβ	amiloidni peptid beta (amiloid - β)
ABC	ATP prijenosni (engl. <i>ATP binding cassette</i>)
ACE	angiotenzin pretvarajući protein (engl. <i>angiotensin converting enzyme</i>)
ACh	acetilkolin (engl. <i>acetylcholine</i>)
AChE	acetilkolinesteraza (engl. <i>acetylcholinesterase</i>)
AD	Alzheimerova bolest (engl. <i>Alzheimer's disease</i>)
AICD	međustanična domena amiloidnog prekursorskog proteina (engl. <i>amyloid precursor protein intracellular domain</i>)
AlCl₃	aluminijev klorid (engl. <i>aluminum chloride</i>)
ALS	amiotrofna lateralna skleroza (engl. <i>amyotrophic lateral sclerosis</i>)
APH-1	engl. <i>anterior pharynx-defective 1</i> (genski proizvod u Notch signalnom putu)
API	indeks analitičkih profila (engl. <i>analytical profile index</i>)
APOE	apolipoprotein E (engl. <i>apolipoprotein E</i>)
APP	amiloidni prekursorski protein (engl. <i>amyloid precursor protein</i>)
Arg	arginaza (engl. <i>arginase</i>)
ASD	poremećaji iz spektra autizma (engl. <i>autism spectrum disorder</i>)
AT8	anti-fosforilirani-PHF-tau pSer202/Thr205 protutijelo
ATPR	ATP (adenozin trifosfat) receptor (engl. <i>ATP receptors</i>)
BACE1 i 2	beta sekretauza 1 i 2 (engl. <i>β-site APP-cleaving enzyme</i>)
BBB	krvo-moždan barijera (engl. <i>blood brain barrier</i>)
BDNF	moždanoi neurotrofnoi čimbenik (engl. <i>brain-derived neurotrophic factor</i>)

BSA	albumin goveđeg seruma (engl. <i>bovine serum albumin</i>)
c.c.	sadržaj crijeva (engl. <i>contents of colon</i>)
CA1	CA1 hipokampalna formacija (lat. <i>cornu Ammonis</i>)
CAT	katalaza (engl. <i>catalase</i>)
CBG	citosolna β -glukozidaza (engl. <i>cytosolic β-glucosidase</i>)
CCL	kemokinski ligand s C-C motivom (engl. <i>chemokine (C-C motif) ligand</i>)
CCR	C-C kemokinski receptor (engl. <i>C-C chemokine receptors</i>)
CD68	klaster diferencijacije 68 (engl. <i>cluster of differentiation 68</i>)
CFS	likvor (engl. <i>cerebrospinal fluid</i>)
cGMP	ciklički gvanozin monofosfat (engl. <i>cyclic guanosine monophosphate</i>)
Ch	kolin (engl. <i>choline</i>)
ChAT	kolin acetiltransferaza (engl. <i>choline acetyltransferase</i>)
Cl	mali mozak (lat. <i>cerebellum</i>)
CLSI	Instituta za standarde u kliničkom laboratoriju (engl. <i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>)
CNS	središnji živčani sustav (engl. <i>central nervous system</i>)
COX-2	ciklooksigenaza 2 (engl. <i>ciclooxigenase</i>)
CT	kompjutorizirana tomografija (engl. <i>computed tomography</i>)
CTF	C-terminalni fragment (engl. <i>C-terminal fragment</i>)
Ctx	kora velikoga mozga (lat. <i>cortex</i>)
CXCL	kemokinski ligand s C-X-C motivom (engl. <i>chemokine (C-X-C motif) ligand</i>)
DAB	3,3' - diaminobenzidin (engl. <i>3,3'-diaminobenzidine</i>)
DAMPS	molekularni uzorci povezani s oštećenjem (engl. <i>damage-associated molecular pattern</i>)

D-gal	D-galaktoza (engl. <i>D-galactose</i>)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNP	2,4-dinitrofenilhidrazin (engl. <i>2,4-dinitrophenylhydrazine</i>)
DTNB	5,5-ditiobis-2-nitrobenzoična kiselina (engl. <i>(5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)</i>)
DXN	gen za protein dvostruki kortin (engl. <i>doublecortin</i>)
ECE2	endotelin-pretvarajući protein-2 (engl. <i>endothelin-converting enzyme-2</i>)
EC-SOD	izvanstanična superoksid dismutaza (engl. <i>extracellular superoxide dismutase</i>)
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina (engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EEA	ekscitatorne aminokiseline (engl. <i>excitatory amino acid</i>)
ELISA	enzimski vezani imunosorbentni test (engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
eNOS	endotelna dušik oksid sintaza (engl. <i>endothelial nitric oxide synthase</i>)
ENS	enterički živčani sustav (engl. <i>enteric nervous system</i>)
EOAD	rani oblik Alzheimerova bolest (engl. <i>early-onset Alzheimer's disease</i>)
ER	endoplazmatski retikulum (engl. <i>endoplasmic reticulum</i>)
FAD	obiteljska Alzheimerova bolest (engl. <i>familial Alzheimer's disease</i>)
FDA	Američka uprava za hranu i lijekove (engl. <i>Food and Drug Administration</i>)
GBA	os crijeva-mozak (engl. <i>gut-brain axis</i>)
GD	nazubljena vijuga (lat. <i>gyrus dentatus</i>)
GFAP	kiseli protein glijalnog vlakna (engl. <i>glial fibrillary acidic protein</i>)
GL	granularni sloj (engl. <i>granular layer</i>)
GM-CSF	čimbenik stimulacije granulocitno-makrofagnih kolonija (engl. <i>macrophage colony-stimulating factor</i>)

GOS	galaktooligosaharidi (engl. <i>galactooligosaccharides</i>)
GPX	glutation peroksidaza (engl. <i>glutathione peroxidase</i>)
GR	glutation reduktaza (engl. <i>glutathione reductase</i>)
GSH	glutation (engl. <i>glutathione</i>)
GSK-3 β	glikogen sintaza kinaza 3 beta (engl. <i>glycogen synthase kinase 3 beta</i>)
GSSH	oksidirani glutation (engl. <i>oxidized glutathione</i>)
GS-TNB	glutation - 5-tio-2-nitrobenzojeva kiseline (engl. <i>glutathione adduct of 5-thio-2-nitrobenzoic acid</i>)
HE	hemalaun-eozin bojanje (engl. <i>hemalaun and eosin staining</i>)
HLA-DR	ljudski leukocitni antigen MHC klase II (engl. <i>human leukocyte antigen-DR</i>)
Hpp	hipokampus (engl. <i>hippocampus</i>)
HRP	hrenova peroksidaza (engl. <i>horseradish peroxidase</i>)
Iba1	ionizirana molekula adaptera za vezanje kalcija 1 (engl. <i>ionized calcium binding adaptor molecule 1</i>)
ICP-MS	induktivno spregnuta plazma s masenom spektrometrijom (engl. <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>)
icv	intracerebroventrikularno
IDE	inzulin razarajući enzim (engl. <i>insulin degrading enzyme</i>)
IEB	crijevno epitelna barijera (engl. <i>intestinal epithelial barrier</i>)
IFN-γ	interferon gama (engl. <i>interferon gamma</i>)
IgG	imunoglobulin G (engl. <i>immunoglobulin G</i>)
IL	interleukin (engl. <i>interleukine</i>)
iNOS	inducibilna dušik oksid sintaza (engl. <i>inducible nitric oxide synthase</i>)
INSR	inzulinski receptor (engl. <i>insulin receptor</i>)
ip	intraperitonealno

IRS/PI3/akt	supstrat receptora inzulina/fosfoinozid-3-kinazaAkt
ISF	međustanična tekućina (engl. <i>interstitial fluid</i>)
ISO	Međunarodna organizacija za standardizaciju (engl. <i>International Organization for Standardization</i>)
JAMs	molekule spojne adhezije (engl. <i>junctional adhesion molecules</i>)
LAMMA	analiza mase laserskom mikrosondom (engl. <i>laser microprobe mass analysis</i>)
LOAD	kasni oblik Alzheimerove bolesti (engl. <i>late-onset Alzheimer's disease</i>)
LPH	laktaza-florizin hidrolaza (engl. <i>lactase-phlorizin hydrolase</i>)
LPO	lipidna peroksidacija (engl. <i>lipid peroxidation</i>)
LPS	lipopolisaharid (engl. <i>lipopolysaccharide</i>)
LRP	protein povezan sa lipoproteinima niske gustoće (engl. <i>low-density lipoprotein receptor-related protein</i>)
LTP	dugotrajna potencijacija (engl. <i>long-term potentiation</i>)
M1AChR	m1 tip muskarinskih receptora za ACh (engl. <i>m1-type muscarinic ACh receptor</i>)
M2AChR	m2 tip muskarinski receptor za ACh (engl. <i>m2-type muscarinic ACh receptor</i>)
MAP kinaze	proteinske kinaze aktivirane mitogenom (engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MAPs	proteini pridruženi mikrotubulima (engl. <i>microtubule-associated proteins</i>)
MAPs	proteini vezani za mikrotubule (engl. <i>microtubule-associated proteins</i>)
MC1	protutijelo anti-Tau-001
MDA	malondialdehid (engl. <i>malondialdehyde</i>)

MIP-1α	upalni proteini makrofaga 1 alfa (engl. <i>macrophage inflammatory proteins 1 alpha</i>)
ML	molekularni sloj (engl. <i>molecular layer</i>)
MMNS	mala ljestvica mentalnih sposobnosti (engl. <i>mini mental status examination</i>)
MRI	magnetska rezonancija (engl. <i>magnetic resonance imaging</i>)
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>)
MS	multiple skleroza (engl. <i>multiple sclerosis</i>)
mtDNA	mitohondrijska DNA (engl. <i>mitochondrial DNA</i>)
nAChR	nikotinski receptor za acetilkolin (engl. <i>nicotinic acetylcholine receptor</i>)
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NED	N-(1-naftil)etilenediamin dihidroklorid (engl. <i>N-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride</i>)
NEP	neprilizin (engl. <i>neprilysin</i>)
NF-κB	nuklearni čimbenik - κ B (engl. <i>nuclear factor-κB</i>)
NFTs	neurofibrilarne snopići (engl. <i>neurofibrillary tangles</i>)
NGF	čimbenik rasta živca (engl. <i>nerve growth factor</i>)
NGS	kozji serum (engl. <i>normal goat serum</i>)
NIA	engl. <i>National Institute on Aging</i>
NINCDS-ADRDA	engl. <i>National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and Alzheimer's Disease and Related Disorders Association</i>
NK	prirodnoubilačke stanice (engl. <i>natural killer cell</i>)
NLRP3	<i>Nod-like</i> receptor proteina 3 (engl. <i>Nod-like receptor protein 3</i>)
NMDAR	N-metil-D-aspartat receptor (engl. <i>N-methyl-D-aspartate receptor</i>)
nNOS	neuralna dušik oksid sintaza (engl. <i>neural nitric oxide synthase</i>)
NS	neurološki pregled (engl. <i>neurological screening</i>)

NSC	neuralne matične stanice (engl. <i>neural stem cells</i>)
OS	oksidacijski stres (engl. <i>oxidative stress</i>)
PAMPS	molekularni uzorci povezani s patogenom (engl. <i>pathogen-associated molecular pattern</i>)
PBS	fosfatni pufer (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PC	karbonilirani proteini (engl. <i>protein carbonylation</i>)
PCR	polimerazna lančana reakcija (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PD	Parkinsonova bolest (engl. <i>Parkinson's disease</i>)
PEN-2	pojačavač presenilina 2 (engl. <i>presenilin enhancer 2</i>)
PET	pozitronsko emisija tomografija (engl. <i>positron emission tomography</i>)
PGE2	prostaglandin 2 (engl. <i>prostaglandin E2</i>)
PHF	upareni spiralna vlakna (engl. <i>paired helical filament</i>)
PHF1	protutijelo anti-tau pSer396/404
PI3K/Akt	fosfoinozitol-3-kinaze-protein kinaza B/Akt
PS1 i 2	proteini presenilin 1 i 2 (engl. <i>presenilin proteins 1 and 2</i>)
PSEN1 i 2	gena za presenilin 1 i 2 (engl. <i>presenilin gene 1 and 2</i>)
PTGER1-4	prostaglandin E1-4 receptori (engl. <i>prostaglandin E1-4 receptors</i>)
Qu	kvercetin (engl. <i>quercetin</i>)
RAGE	receptor za napredne proizvode glikacije (engl. <i>receptor for advanced glycation end products</i>)
RANTES	CCL5; peti kemokinski ligand s C-C motivom
RNA	ribonukleinska kiselina (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
RNS	reaktivni spojevi dušika (engl. <i>reactive nitrogen species</i>)
ROS	reaktivne spojevi kisika (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
RT	sobna temperatura (engl. <i>room temperature</i>)

sAPP	topljivi amiloidni prekursorski protein (engl. <i>soluble amyloid precursor protein</i>)
SCFA	kratkolančane masne kiseline (engl. <i>short chain fatty acids</i>)
SGLT-1	natrij ovisan glukozni prijenosnik (engl. <i>sodium-glucose linked transporter</i>)
SOD	superoksid dismutaza (engl. <i>superoxide dismutase</i>)
SP	senilni plak (engl. <i>senile plaque</i>)
SUB	subikulum (lat. <i>subiculum</i>)
TBA	2-tiobarbituratna kiselina (engl. <i>2-thiobarbituric acid</i>)
TEM EDX	energetsko-disperzijske rendgenske spektroskopije u kombinaciji s prijenosnom elektronskom mikroskopijom (engl. <i>energy-dispersive X-ray spectroscopy combined with transmission electron microscopy</i>)
TfR-ME	transferinski receptor (engl. <i>transferrin receptor mediated endocytosis</i>)
TGF-β1	transformirajući čimbenik rasta- β 1 (engl. <i>transforming growth factor-beta1</i>)
Th stanice	T (CD4+) pomagačke stanice (engl. <i>T helper cells</i>)
TJs	čvrsti spojevi (engl. <i>tight junctions</i>)
TLR	<i>Toll-like</i> receptori (engl. <i>Toll-like receptors</i>)
tm	tjelesna masa
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidin
TNF-α	čimbenik nekroze tumora α (engl. <i>tumor necrosis factor alpha</i>)
TREM2	pokretački receptor izražen na mijeloidnim stanicama 2 (engl. <i>triggering receptor expressed on myeloid cells 2</i>)
TrKA^{NGFR}	tropomiozinski receptor kinaze A s afinitetom za receptor čimbenika rasta živaca (engl. <i>tropomyosin receptor kinase A - nerve growth factor receptor</i>)
TUNEL	TUNEL -test (engl. <i>terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling- positive cell</i>)

VAcHT	vezikularni prijenosnik acetilkolina (engl. <i>vesicular acetylcholine transporter</i>)
VaD	vaskularna demencija (engl. <i>vascular dementia</i>)
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organization</i>)
XO	ksantin oksidaza (engl. <i>xanthine oxidase</i>)
ZO	zonula okludin (lat. <i>zonula occludens</i>)
ZON	zonulin (engl. <i>zonulin</i>)
Zot	zonula okludin toksin (engl. <i>zonula occludin toxin</i>)

9. ŽIVOTOPIS

Marina Kukolj rođena je 26. listopada 1983. u Banja Luci, BiH. Srednju školu za medicinske-sestre-tehničare Mlinarska završila je u Zagrebu 2002. Iste godine se zapošljava u struci na Klinici za bolesti uha, nosa i grla i kirurgiju glave i vrata (ORL) KBC-a Zagreb gdje ostaje raditi do listopada 2019. godine. Na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu (PMF) Sveučilišta u Zagrebu 2015. pod vodstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić stječe naziv magistra eksperimentalne biologije (FIM) te iste godine upisuje poslijediplomski studij Biologije. Tijekom poslijediplomskog studija, 2015.-2020., sudjeluje u izvođenju praktikumske nastave na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od listopada 2019. zaposlena u zvanju stručnog suradnika u Laboratoriju za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju Zavoda za molekularnu biologiju na Institutu Ruđer Bošković.

Marina Kukolj aktivno radi na stručnom i znanstvenom usavršavanju kroz sudjelovanje na stručnim/znanstvenim okupljanjima i radionicama te suradnju na projektima: u 2019./2020. na HRZZ IP-2018-01-6547, *Utjecaj majčinog metaboličkog stanja na serotoniniski sustav posteljice i neonatusa: od metilacije DNA do funkcije proteina* (PlaNS) (prof. dr. sc. Jasminka Štefulj) i KBC-u Zagreb, *Liječenje poslijeoperacijske boli nakon zahvata u području glave i vrata* (Blaženka Ferenčak, dipl. med. techn.); u 2017. na HRZZ IP 2014 09 9730, *Hiperfosforilacija agregacija i transsinaptički prijenos tau proteina u Alzheimerovoj bolesti: analiza likvora i ispitivanje potencijalnih neuroprotektivnih spojeva* (prof. dr. sc. Goran Šimić) i PMF-u Zagreb, 2017/br. 20282313 - *Analiza crijevnog mikrobioma u štakorskom modelu Alzheimerove bolesti* (prof. dr. sc. Nada Oršolić); i u 2016. na PMF-u Zagreb, 2016/br. 20281220 - *Molekularni mehanizmi kafeinske kiseline na angiogenezu i supresiju rasta Ehrlichovog ascitesnog tumora* (prof. dr. sc. Nada Oršolić).

Publikacije: izvorni znanstveni radovi u CC časopisima (4), sažeci na skupovima (32: 4 usmena i 27 posterskih priopćenja).

IZVORNI ZNANSTVENI RADOVI RADOVI U CC ČASOPISIMA

1. Butorac K, Banić M, Novak J, Leboš Pavunc A, Uroić K, Durgo K, Oršolić N, **Kukolj M**, Radović S, Scalabrin S, Žučko J, Starčević A, Šušković J, Kos B (2020) The functional capacity of plantaricin-producing *Lactobacillus plantarum* SF9C and S-layer-carrying *Lactobacillus brevis* SF9B to withstand gastrointestinal transit. *Microb Cell Factories* 19:106.
2. Oršolić N, Nemrava J, Jeleč Ž, **Kukolj M**, Odeh D terzić S, Fureš R, Bagatin T, Bagatin D (2018) The beneficial effect of proanthocyanidins and icariin on biochemical markers of bone turnover in rats. *Int J Mol Sci* 19 (2746): 1-19.
3. Oršolić N, Karač I, Sirovina D, **Kukolj M**, Kunštić M, Gajski G, Garaj-Vrhovac V, Štajcar D (2016) Chemotherapeutic potential of quercetin on human bladder cancer cells. *J Environ Sci Health A* 51 (9): 776-781.
4. Oršolić N, Kunštić M, **Kukolj M**, Gračan R, Nemrava J (2016) Oxidative stress, polarization of macrophages and tumour angiogenesis: Cefficacy of caffeic acid. *Chem Biol Interact* 256: 111-124.

SAŽECI U ZBORNICIMA I ČASOPISIMA

1. **Kukolj M**, Oršolić N, Odeh D, Nikolić B, Langer Horvat L, Šimić G, Gračan R, Zrinščak I, Orct T, Šoštarić B (2019) modulacija crijevnoga mikrobioma kvercetinom u štakorskomu modelu Alzheimerove bolesti. Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a, Zagreb (Hrvatska), Knjiga sažetaka: 15.
2. **Kukolj M**, Tot M, Čičak K, Kopic A, Ferencak B (2019) Postoperative monitoring of cognitive functions after laryngectomy. 7th Croatian Neuroscience Congress, Zadar (Croatia), Book of abstract: 77.
3. **Kukolj M**, Langer Horvat L, Šimić G, Šoštarić B, Branović Čakanić K, Vlahović D, Gračan R, Zrinščak I, Nikolić B, Odeh D, Oršolić N (2019) Cerebellum in Alzheimer's disease: quercetin as a potential therapeutic. 7th Croatian Neuroscience Congress, Zadar (Croatia), Book of abstract: 91.

4. Ferenčak B, **Kukolj M**, Boroša G (2018) Važnost multidisciplinarnog pristupa u bolničkom sustavu: utjecaj mikroklimе i uvjeta rada na osjetljivost mikrobnog ekosustava u bolesnika nakon opsežnih operativnih zahvata na glavi i vratu. 13th Croatian biological congress with international participatio, Poreč (Croatia), Book of abstracts: 173-174.
5. **Kukolj M**, Boroša G, Ferenčak B (2018) Impact assessment of respiratory and postural diaphragm mobility in prevention of pneumonia. 13th Croatian biological congress with international participatio, Poreč (Croatia), Book of abstracts: 288-289.
6. **Kukolj M**, Oršolić N, Odeh D, Orct T, Šimić G, Horvat Langer L, Šoštarić B, Branović Čakanić K, Grabarević D terzić S (2018) Effects of aluminum chloride on lipid peroxidation and distribution of toxic and essential/trace elements in rats liver and spleen tissues. 13th Croatian biological congress with international participatio, Poreč (Croatia), Book of abstracts: 330-331.
7. Oršolić N, Nemrava J, Odeh D, **Kukolj M**, Lesar N, Lovrić I, Jeleč Ž (2018) The effectiveness of icariin on biomarkers for osteoporosis. 13th Croatian biological congress with international participatio, Poreč (Croatia), Book of abstracts: 290-291.
8. Kunštić M, Oršolić N, **Kukolj M**, Odeh D (2018) *In vivo* growth inhibitory and anti-angiogenic effects of gallic acid on advanced Ehrlich ascites tumor in mouse. 13th Croatian biological congress with international participatio, Poreč (Croatia), Book of abstracts: 291-292.
9. **Kukolj M**, Odeh D, Oršolić N, Karač I (2018) Antioxidative activity of caffeic acid: applicability in diabetes. 13th Croatian biological congress with international participatio, Poreč (Croatia), Book of abstracts: 293-293.
10. Oršolić N, **Kukolj M**, Odeh D, Lesar N, Ančić D (2018) Antitumor efficacy of curcumin, bleomycin and hyperthermia on Ehrlich ascites tumor cells. 13th Croatian biological congress with international participatio, Poreč (Croatia), Book of abstracts: 294-295.
11. Odeh D, Đirlić N, Gaćina L, Lesar N, **Kukolj M**, Oršolić N (2018) The effect of sevoflurane on oxidative stress and inflammation induced by aluminium chloride in the rat brain. 12th Annual symposium of the Croatian physiological society with international participation, Rijeka (Croatia), Book of abstract: 33.

12. Odeh D, Gaćina L, Oršolić N, **Kukolj M** (2018) The efficiency of gallic acid on suppression of angiogenesis, oxidative stress and tumor growth. Immuno-Oncology 2018 World Congress Vienna (Austria), Book of abstract: 35.
13. Gaćina L, Odeh D, Oršolić N, **Kukolj M** (2018) Anti-tumor effects of Newcastle Disease virus in mouse mammary carcinoma and Ehrlich ascites tumor. Immuno-Oncology 2018 World Congress Vienna (Austria), Book of abstract: 57.
14. Ferenčak B, **Kukolj M**, Boroša G (2018) The importance of multidisciplinary approach in the hospital system: influence of microclimate and working conditions on the sensitivity of the microbial ecosystem in patients who had extensive surgery on the head and neck. 13th Croatian biological congress with international participatio, Poreč (Croatia), Book of abstracts: 173-174.
15. Zorić K, Banić M, Uroić K, Leboš Pavunc A, Novak J, Durgo K, Oršolić N, **Kukolj M**, Petković H, Jamnik, Polona et al. (2018) Combined probiotic effect of S-layer-carrying Lactobacillus brevis SF9B and bacteriocin- expressing Lactobacillus plantarum SF9C strains on faecal microbiota of rats. 9th International congress of food technologists, biotechnologists and nutritionists, Zagre (Croatia), Book of abstracts: 57.
16. Langer Horvat L, Svoboda J, Babić Leko M, Miškić T, **Kukolj M**, Oršolić N, Hof PR, Šimić G, Goran (2018) Protocol for stereotaxic delivery of tau monomers and oligomers into the rodent brain. 6th Croatian neuroscience congress Osijek (Croatia), Book of abstracts: 90-91.
17. Odeh D, Nikolić B, Mataković M, Lesar N, **Kukolj M**, Balta V, Karač I, Oršolić N (2017) Oxidative stress and inflammation caused by n- hexyl salicylate in mouse skin: the effectiveness of flavonoids. Annual meeting of the Croatian immunological society with EFSIS on tour, Zagreb (Croatia), Book of abstracts: 59.
18. Oršolić N, Nemrava J, **Kukolj M**, Odeh D, Lesar N, Kunštić M, Goluža E, Jeleč Ž, Vihnanek Lazarus M, Orct T (2017) Effect of grape seed proanthocyanidins on retinoic acid-induced bone loss in rats. Annual meeting of the Croatian immunological society with EFSIS on tour, Zagreb (Croatia), Book of abstracts: 56.

19. Ledinski M, Oršolić N, **Kukolj M**, Odeh D, Mojzeš A, Uroić K, Leboš Pavunc A, Pamučar B, Nikolić B, Mateševac J (2017) Analysis of intestine microbiome in the Alzheimer's disease rat model. Annual meeting of the Croatian immunological society with EFSIS on tour, Zagreb (Croatia), Book of abstracts: 40.
20. Sirovina D, Odeh D, Oršolić N, **Kukolj M**, Nikolić B, Lesar N (2017) Antioxidative and antidiabetic effects of naringin and curcumin in vitro and *in vivo*. Annual meeting of the Croatian immunological society with EFSIS on tour, Zagreb (Croatia), Book of abstracts: 62.
21. Kunštić M, Oršolić N, **Kukolj M**, Odeh D, Gračan R (2017) Anticancer and antiangiogenic effects of phenolic acids on Ehrlich ascites tumor. Annual meeting of the Croatian immunological society with EFSIS on tour, Zagreb (Croatia), Book of abstracts: 55.
22. Kunštić M, Oršolić N, **Kukolj M**, Gračan (2016) Molekularni mehanizmi djelovanja kafeinske kiseline na angiogenezu i supresiju rasta Ehrlichovog ascitesnog tumora u mišu. Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a, Zagreb (Hrvatska), Knjiga sažetaka: 54.
23. Nemrava J, Oršolić N, Majcen P, Kunštić M, **Kukolj M**, Jeleč Ž (2016) Antioksidativno i antiupalno djelovanje krizina na osteoporozi izazvanu retinoičnom kiselinom u štakora. // Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a, Zagreb (Hrvatska), Knjiga sažetaka: 55.
24. Oršolić N, Kunštić M, **Kukolj M**, Sirovina D, Šopf I (2015) Protective and reparative effect of pentadecapeptide BPC 157 on mice blood, liver and kidney cells. 12th Croatian biological congress with international participatio, Sv. Martin na Muri (Croatia), Book of abstracts: 268-269.
25. Oršolić N, Odeh D, Mataković M, Balta V, Kunštić M, **Kukolj M**, Sašilo K, Đikić D (2015) Quercetin attenuates n-hexyl salicylate or di- n-propyl disulfide-induced skin irritation: oxidative stress and inflammation. 12th Croatian biological congress with international participatio, Sv. Martin na Muri (Croatia), Book of abstracts: 269-270.

26. Kunštić M, **Kukolj M**, Oršolić N (2015) Gallic acid reduces tumor growth and angiogenesis in mice with Ehrlich ascites tumor. 12th Croatian biological congress with international participatio, Sv. Martin na Muri (Croatia), Book of abstracts: 263-264.
27. **Kukolj M**, Kunštić M, Gračan R, Rođak E, Oršolić N (2015) The efficiency of caffeic acid on oxidative stress and angiogenesis in Ehrlich ascites tumor. 12th Croatian biological congress with international participatio, Sv. Martin na Muri (Croatia), Book of abstracts: 262-263.
28. Balta V, Odeh D, Mataković M, Kunštić M, **Kukolj M**, Oršolić N (2015) Animal models of psoriasis: antiinflammatory and antioxidant epigallocatehin gallate efficiency. 12th Croatian biological congress with international participatio, Sv. Martin na Muri (Croatia), Book of abstracts: 258-259.
29. Oršolić N, Đikić D, Nemrava J, Majcen P, Kunštić M, **Kukolj M**, Rođak E, Goluža E (2015) The effectiveness of quercetin on biomarkers for osteoporosis. 12th Croatian biological congress with international participatio, Sv. Martin na Muri (Croatia), Book of abstracts: 265-266.
30. Oršolić N, Kunštić M, **Kukolj M**, Čolić I (2015) Inhibition of macrophage polarization by caffeic acid: interplay between ROS, antioxidants, and inflammatory cytokines. 12th Croatian biological congress with international participatio, Sv. Martin na Muri (Croatia), Book of abstracts: 266-267.
31. Oršolić N, Kunštić M, **Kukolj M**, Sirovina D (2015) Effect of flavonoids and hyperthermal intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) on tumour growth and micronucleus induction in mouse tumour model. 12th Croatian biological congress with international participatio, Sv. Martin na Muri (Croatia), Book of abstracts: 267-268.
32. Kunštić M, **Kukolj M**, Balta V, Đikić D, Oršolić N (2015) Gallic, caffeic and tannic acids inhibit tumor growth and angiogenesis in Ehrlich ascites tumor. 12th Croatian biological congress with international participatio, Sv. Martin na Muri (Croatia), Book of abstracts: 50.