Utjecaj inhibitora monoaminooksidaze A i B na fosforilaciju proteina tau - terapijski učinak u Alzheimerovoj bolesti

Langer, Lea

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:590637

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno - matematički fakultet
Biološki odsjek

Lea Langer

Utjecaj inhibitora monoaminooksidaze A i B na fosforilaciju proteina tau - terapijski učinak u Alzheimerovoj bolesti

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2015.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za razvojnu neuropatologiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga, pod vodstvom prof. dr. sc. Gorana Šimića, dr. med., predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Zahvaljujem se,

Prvo i najviše Bogu koji mi je davao snagu za studiranje, ljubav i smisao svemu.

Goranu Šimiću, koji mi je omogućio da svoj diplomski rad izradim u Laboratoriju za razvojnu neuropatologiju.

Mirjani Babić, koja je svojim strpljenjem, podrškom i pruženim znanjem uvelike olakšala izradu rada i ujedno bila ugodno društvo.

Dubravki Hranilović, na stručnom vodstvu, korisnim savjetima, te ljubaznosti i susretljivosti prilikom pisanja diplomskog rada.

Velika hvala i majci Željki, sestri Ireni i bratu Natanu koji su svojom ljubavi, potporom, ohrabrenjem i odricanjima omogućili studiranje. Posebna hvala mojoj prijateljici Maji koja je bila podrška tijekom studiranja, te mome zaručniku Luki na pruženom osloncu.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno–matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

« Utjecaj inhibitora monoaminooksidaze A i B na fosforilaciju proteina tau - terapijski učinak u Alzheimerovoj bolesti »

Lea Langer
Rooseveltov trg 6
10 000 Zagreb

Alzheimerova bolest (AB) je neurodegenerativna bolest karakterizirana sporoprogresivnim oštećenjem epizodičkog pamćenja. Prema tau hipotezi nastanka AB poremećajem funkcije tau proteina dolazi do njegovog odvajanja od mikrotubula, degeneracije aksona i smrti neurona. Tau protein je u AB abnormalno hiperfosforiliran na više od 40 mjesta, no još uvijek nije poznat uzročno-posljedični slijed događaja koji dovode do hiperfosforilacije. U ranoj patogenezi AB važnu ulogu možda ima i povećana aktivnost aktivirane monoaminoksidaze (MAO). Zbog kompleksnosti AB razvijaju se lijekovi koji imaju mogućnost simultanog djelovanja na različite ciljeve, kao novi spoj ASS234 koji istovremeno inhibira enzime MAO-A i MAO-B, te svojim djelovanjem na enzim acetilkolinesterazu (AChE) reducira agregaciju amiloid-β (Aβ). Budući da je ASS234 sačinjen od donepezila (inhibitor AChE) i PF901N (inhibitor MAO-B), do sada je pokazao neke očekivane pozitivne učinke za moguću uporabu u liječenju AB. Ovim sam istraživanjem željela ustanoviti utječu li i na koji način inhibitor MAO-B PF9601N te inhibitor MAO-A klorgilin na fosforilaciju tau proteina. Rezultati su pokazali da klorgilin smanjuje fosforilaciju tau proteina na epitopu Ser199 u kulturi neuroblastomskih stanica SH-SY5Y, dok takav utjecaj PF9601N nije uočen. Dobiveni rezultati pridonose razumijevanju potencijalnog terapijskog učinka inhibitora MAO-A i MAO-B u AB, no za potpuniju sliku potrebno je provesti daljnja istraživanja utjecaja klorgilina na fosforilaciju tau proteina i na drugim epitopima, posebice Ser202/Thr205 i Ser396/Ser404.

(52 stranice, 16 slika, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici
Ključne riječi: Alzheimerova bolest, hiperfosforilacija, PF9601N, klorgilin
Voditelj: dr. sc. Goran Šimić, dr. med., red. prof.
Suvoditelj: dr. sc. Dubravka Hranilović, izv. prof.
Ocjenitelji: dr. sc. Dubravka Hranilović, izv. prof.
doc. dr. sc. Martina Šeruga Musić
doc. dr. sc. Nenad Malenica
zamjena: doc. dr. sc. Ana Galov
Rad prihvaćen: 18.02.2015.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

« The effect of monoamine oxidase A and B inhibitors on the phosphorylation of tau protein. Testing the potencial therapeutic effect in Alzheimers disease»

Lea Langer
Rooseveltov trg 6
10 000 Zagreb, Croatia

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease characterized by slowly progressing impairment of episodic memory. According to the tau hypothesis of AD, the dysfunction of tau protein leads to its separation from the microtubule, degeneration of axons and neuronal death. Tau protein is abnormally phosphorylated in AD at more than 40 sites, but the exact nature of causal sequence of events leading to this is not known. It is believed that an increased activity of activated monoamine oxidase (MAO) may have an important role in the early pathogenesis of AD. Due to the complexity of AD new drugs are developed that have the ability to simultaneously act on different targets, such as the new compound ASS234. It inhibits activity of MAO-A and MAO-B enzymes, and by acting on acetylcholinesterase (AChE) enzyme, it simultaneously reduces aggregation of β-amyloid protein. As ASS234 compound is synthesized from donepezil (AChE inhibitor) and PF901N (MAO-B inhibitor), it has demonstrated some expected positive effects for potential therapeutic use. The aim of this work was to find out how do MAO-B inhibitor PF9601N and inhibitor of MAO-A clorgyline affect the phosphorylation of tau protein. The results showed that clorgyline reduces phosphorylation of tau protein at Ser199 epitope in neuroblastoma cell culture SH-SY5Y, while such effect was not observed for PF9601N. These results could contribute to better understanding of the potential therapeutic effect of the inhibitors of MAO-A and MAO-B in AD, but for a more complete picture it is necessary to carry out further research on the impact of clorgyline on phosphorylation of the other epitopes of tau protein, especially Ser202/Thr205 and Ser396/Ser404.

(52 pages, 16 figures, original language: Croatian)
Thesis deposited in the Central biological library
Key words: Alzheimer's disease, hiperphosphorylation, PF9601N, klorgilin
Supervisor: dr. Goran Šimić, prof.
Cosupervisor: dr. Dubravka Hranilović, Assoc. Prof.
Reviewers: dr. Dubravka Hranilović, Assoc. Prof.
dr. Martina Šeruga Musić, Asst. Prof.
dr. Nenad Malenica, Asst. Prof
dr. Ana Galov, Asst. Prof.
Thesis accepted: 18.02.2015.

Popis oznaka i kratica

AB	Alzheimerova bolest
Aβ	Beta-amiloid
AChE	Acetilkolinesteraza
APP	Prekursorni protein amiloida (od eng. *Amyloid Precursor Protein*)
ApoE	Apolipoprotein E
BACE1	Beta- sekretaza 1 (od eng. *Beta-Secretase)*
βsAPP	Beta-topljivi prekursorni protein amiloida (od eng. *B-soluble amyloid precursore protein)*
BuchE	Butirilkolinesteraza
CSF	Cerebrospinalna tekućina, likvor (od eng. *Cerebrospinal Fluid*)
CT	Kompjutorizirana tomografija (eng. *Computed Tomography*)
DMSO	Dimetil-sulfoksid
DN	Distrofični neuriti (od eng. *Dystrophic Neurites)*
DP	Difuzni plakovi (od eng. *Diffuse Plaques*)
DSM-IV	Dijagnostički i statistički priručnik mentalnih bolesti i poremećaja (od eng. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*)
ECE	Enzim koji konvertira endotelin(od eng. *Endothelin Converting Enzyme*)
ELISA	Enzimski imunotest na čvrstoj fazi (od eng. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)
EOAD	Nasljedni oblik AB s ranim početkom (od eng. *early-onset Alzheimer's disease* – EOAD)
FBS	Serum goveđeg fetusa (engl. *Fetal bovine serum*)
GSK-3β	Kinaza 3 glikogen sintaze
MAP	Proteini povezani s mikrotubulima (od eng. *Microtubule-Associated Protein*)
MCI	Blago kognitivno oštećenje (od eng. *Mild Cognitive Impairment*)
ICD-10	Međunarodna klasifikacija bolesti (od eng. *International Classification of Diseases*)
IDE	Enzim koji razgrađuje inzulin (od eng. *Insulin-Degrading Enzyme)*

LOAD	Sporadični oblik AB s kasnim početkom (od eng. *Late-OnsetAlzheimer's Disease* – LOAD)
MAO	Monoaminooksidaza
MAPK	Mitogenom aktivirana protein kinaza
MMSE	Kratko ispitivanje mentalnog statusa (od eng. *Mini Mental Status Examination*)
MRI	Slikovni prikaz magnetskom rezonancijom (od eng. *Magnetic Resonance Imaging*)
MT	Mikrotubuli
NEP	Neprilizin (od eng. *Neprilysin)*
NFS	Neurofibrilarni snopići
NINCDS-ADRDA	Nacionalni institut za neurološke i komunikacijske poremećaje te moždani udar-Asocijacija za Alzheimerovu bolest i srodne poremećaje (od eng. *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-the Alzheimer's disease and Related Disorders Association*)
NMDAR	N – metil – D – aspartat receptori (receptori za glutamat)
NP	Neuritički plakovi (od eng. *Neuritic Plaques*)
PBS	Fosfatni pufer (od eng. *Phosphate Buffer Saline)*
PET	Pozitronska emisijska tomografija (od eng. *Positron Emission Tomography*)
PG	Postotak rasta (od eng. *Percentage of Growth*)
PHF	Spareni uzvojiti filamenti (od eng. *Paired Helical Filaments*)
PKC	Protein kinaza C
PP	Protein fosfataza
PSEN	Presenilin
P – tau	Fosforilirani protein tau
pT231	Tau protein fosforiliran na treoninu 231
RAGE	Receptor za krajnje produkte uznapredovale glikozilacije (od eng. *Receptor for advanced glycation end- products)*
SP	Senilni plakovi (od eng. *Senile Plaques*)
T - tau	Ukupni tau protein (od eng. *Total tau protein*)

Sadržaj

1. UVOD 1

1.1 ALZHEIMEROVA BOLEST 1

1.2 DIJAGNOZA BOLESTI 2

1.3 SIMPTOMI BOLESTI 3

Pretklinička faza AB 3

Rana faza AB 4

Srednja faza AB 4

Kasna faza AB 4

1.4 GENETIČKA OSNOVA AB 5

1.4.1 Geni uključeni u nasljedni oblik AB 6

1.4.2 Geni uključeni u sporadični oblik AB 6

1.5 PATOGENEZA AB 7

1.6 TEORIJE NASTANKA AB 9

1.6.1 HIPOTEZA AMILOIDNE KASKADE 9

1.6.2 TAU HIPOTEZA 11

1.6.3 KOLINERGIČKA HIPOTEZA 13

1.6.4 UPALNA HIPOTEZA 13

1.6.5 OKSIDATIVNA HIPOTEZA 13

1.7 LIJEČENJE ALZHEIMEROVE BOLESTI 14

1.7.1 Inhibitori kolinesteraza 14

1.7.2 Aβ strategije liječenja 15

1.7.3 Lijekovi koji ciljaju protein tau 20

2. CILJ ISTRAŽIVANJA 22

3. MATERIJALI I METODE 23
3.1 Popis korištenih materijala i priprema otopina 23
3.2 Rad sa stanicama u kulturi 24
3.2.1 Stanična linija 24
3.2.2 Presađivanje stanica 25
3.2.3 Odmrzavanje stanica 25
3.2.4 Određivanje broja stanica 26
3.2.5 MTT test 26
3.2.6 Tretiranje stanica 27
3.2.7 Sakupljanje proteina 28
3.2.8 Određivanje koncentracije proteina po Bradfordu 28
3.2.9 ELISA metoda 29
3.3 Statistička analiza 30
4. REZULTATI 31
5. RASPRAVA 34
6. ZAKLJUČAK 37
7. LITERATURA 38
8. ŽIVOTOPIS 52

1. UVOD

1.1 ALZHEIMEROVA BOLEST

Alzheimerova bolest (AB) je najčešći primarni uzrok sindroma demencije (60-70%) (Blennow i sur., 2006). Prevalencija demencije je manja od 1% u dobnoj skupini od 60 do 64 godine života, no pokazuje gotovo eksponencijalan rast s godinama, te u dobi od 85 godina i više iznosi 24% do 33 % (Ferri i sur., 2005). U svijetu je 2010. godine više od 35 milijuna ljudi bolovalo od AB (Wimo i Prince, 2010). Zbog produženja životnog vijeka čovjeka, očekuje se udvostručenje broja oboljelih svakih 20 godina, te bi do 2040. godine broj mogao porasti do 81 milijun oboljelih (Ferri i sur., 2005). Smatra se da u Hrvatskoj od AB boluje više od 80 tisuća ljudi, što je temeljeno na podatcima da je 2006. godine bilo oko 800 tisuća osoba starijih od 65. godina s pravom na zdravstvenu zaštitu, a 10% populacije iznad 65. godine boluje od demencije (Pecotić i Perkov, 2007).

Osim starenja, kao glavnog rizičnog faktora za razvoj AB, postoji i niz drugih rizičnih čimbenika. Tako se navode smanjen „rezervni“ kapacitet mozga, uključujući manji volumen mozga, niska razina mentalnih sposobnosti u ranijoj životnoj dobi te smanjena psihofizička aktivnost tijekom kasnijih razdoblja života (Mortimer i sur., 2003). Drugi potencijalni rizični faktori za razvoj AB su vaskularne bolesti poput hiperkolesterolemije, hipertenzije, ateroskleroze, koronarne bolesti, pretilosti i dijabetesa (Mayeux, 2003; Luchsinger i Mayeux, 2004). Zbog toga se smatra da je AB vrlo kompleksni poremećaj koji nastaje kao posljedica interakcije genetskih čimbenika i čimbenika okoline.

Bolest je prvi opisao dr. Alois Alzheimer 1906. godine u 51-godišnje pacijentice Auguste D. proučavanjem histoloških preparata moždanog tkiva. Prvi simptomi u navedene bolesnice uključivali su promjene osobina ličnosti, gubitak pamćenja, probleme s govorom, poteškoće u pisanju, čitanju te nisu odgovarali niti jednom do tada poznatom psihijatrijskom poremećaju. Budući da je pacijentica umrla u 51.godini života, a demencija je do tada bila uočena u starijoj populaciji naziv *Alzheimerova bolest* je u početku korišten samo za oboljele s početkom bolesti u presenilnom razdoblju, odnosno prije dobi od 65 godina (sada i AB s ranim

početkom), dok se naziv senilna demencija koristio ako je bolest nastupila nakon 65.godine života (sada i AB kasnog početka) (Graeber i sur., 1997).
Temeljem histopatoloških istraživanja dokazano je da se senilni plakovi (SP) i neurofibrilarni snopići (NFS), koje je prvi uočio i opisao Alzheimer, nalaze u mozgovima osoba s AB i onih sa senilnom demencijom. Međutim, te patološke nakupine izraženije su u AB ranog početka, nego u senilnoj demenciji (Blennow i sur., 1991).

1.2 DIJAGNOZA BOLESTI

Klinička dijagnoza AB temelji se na međunarodnim kriterijima DSM-IV (od eng. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*) koji služe za postavljanje dijagnoze sindroma demencije (American Psychiatric Association, 2010), NINCDS-ADRDA (od eng. *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*) koji služi za postavljanje kliničke dijagnoze vjerojatne ili moguće AB. Dodatni kriteriji sistematizirani su i u ICD-10 (Međunarodna klasifikacija bolesti, od eng. *Internacional Classification of Disease*) (World Health Organization, 2004).

NINCDS-ADRDA kriteriji koji su publicirani prije više od 20 godina, češće se koriste u istraživačke svrhe. Postavljanje dijagnoze vjerojatne AB prema NINCDS-ADRDA kriterijima temelji se na isključivanju drugih uzroka sindroma demencije, dok se konačna dijagnoza AB postavlja na temelju obdukcije dobivenog histopatološkog nalaza. Kriteriji za postavljanje dijagnoze su: dijagnoza demencije utvrđena kliničkim pregledom, dokumentirana pomoću MMSE ljestvice (od eng. *Mini Mental Status Examination*) te potvrđena neuropsihološkim testiranjem; deficiti u najmanje dvije kognitivne domene; progresivno smanjenje pamćenja; izostanak sistemskih bolesti. U postavljanju dijagnoze vjerojatne AB, NINCDS-ADRDA kriteriji imaju dobru osjetljivost (oko 80%), ali prenisku specifičnost (oko 70%) (Knopman, 2001).

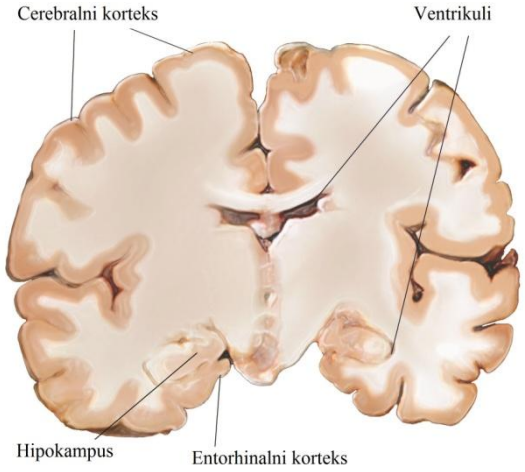
Atrofija moždane kore i hipokampalne regije može se potvrditi kompjutoriziranom tomografijom (od eng. *computed tomography* - CT), snimanjem magnetnom rezonancom (od eng. *magnetic resonance imaging*- MRI) ili pozitronskom emisijskom tomografijom (od eng. *positron emission tomography* - PET).

1.3 SIMPTOMI BOLESTI

U osoba oboljelih od AB dolazi do progresivnog gubitka kognitivnih funkcija, pamćenja i promjena u ponašanju koje uključuju agresivnost, hiperaktivnost, psihozu i depresiju (Hope i sur., 1997). Gubitak kognitivnih funkcija i promjene u ponašanju nastaju zbog propadanja neurona u kortikalnim i subkortikalnim regijama mozga te promjena u radu neurotransmiterskih sustava (Lyness i sur., 2003; Šimić i sur., 2014; Babić i sur., 2014). Tijek i simptomi AB podijeljeni su na pretkliničku fazu AB, ranu fazu AB, srednju fazu AB i kasnu fazu AB.

Pretklinička faza AB

Početak AB je neprimjetan. Razdoblje od nastanka prvih patoloških promjena u mozgu do pojave kliničkih simptoma može biti i do 10 godina čime je otežana rana dijagnoza i liječenje bolesti. Tijekom ove faze oboljela osoba još nema vidljivih simptoma, no u mozgu dolazi do patoloških promjena. Izvan stanica započinje formiranje senilnih plakova, a unutar stanica dolazi do hiperfosforilacije proteina tau i stvaranja neurofibrilarnih snopića. Pojava prvih simptoma te brzina kojom napreduje bolest razlikuje se kod osoba s nasljednim tipom AB i osoba sa sporadičnim tipom AB. (Sutton, 2011) (**slika 1.1**).



Slika 1.1*.Presjek mozga u pretkliničkoj fazi AB*

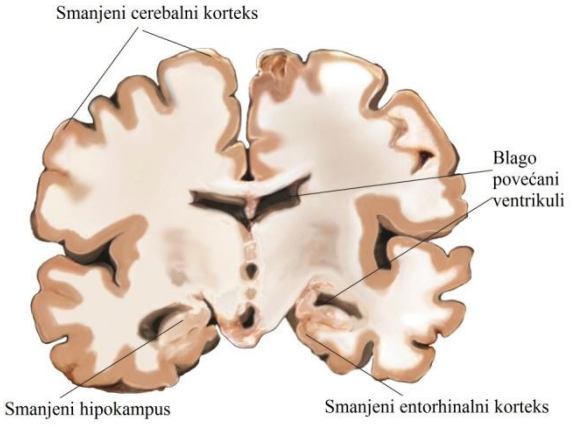
Preuzeto i prilagođeno iz:http://www.nia.nih.gov/sites/default/files/02_preclinicalad_lg.jpg

Rana faza AB

Prvi znak koji upućuje na AB je blagi kognitivni poremećaj (od eng. *mild cognitive impairment* - MCI). Međutim, zaboravljivost se često javlja u osoba starije dobi tako da MCI ne mora nužno biti prvi simptom AB. Osobe s MCI ipak češće razviju AB od onih bez MCI.
U ranoj fazi bolesti prisutne su promjene u govoru, kretanju, snalaženju u prostoru i promjene u ponašanju (Sutton, 2011) (**slika 1.2**).

Srednja faza AB

U srednjoj fazi AB dolazi do pogoršavanja sposobnosti pamćenja što je popraćeno i poteškoćama u obavljanju svakodnevnih poslova. Oslabljena je sposobnost prosuđivanja, prisutne su i promjene raspoloženja i osobnosti, međutim emocije su još uvijek dobro očuvane. Oštećenja zahvaćaju dijelove mozga koji kontroliraju razmišljanje, govor i obradu osjetilnih informacija. Dolazi i do pogoršanja sposobnosti orijentacije u vremenu i prostoru, siromašnijeg govora i njegovog slabijeg razumijevanja (Sutton, 2011) (**slika 1.2**).

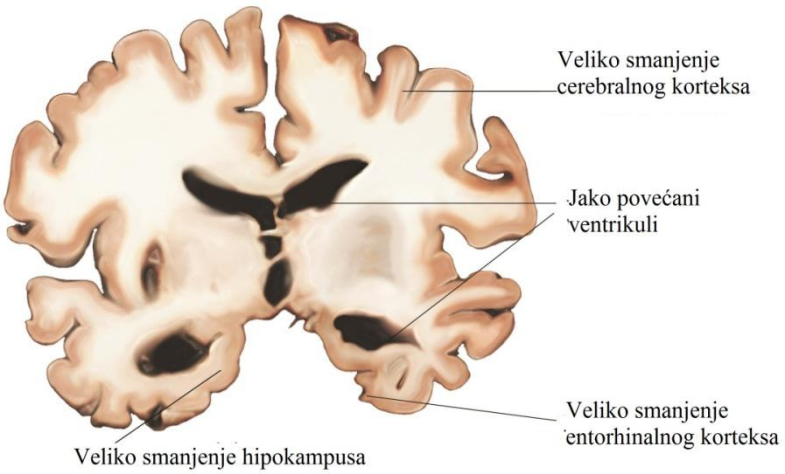


Slika 1.2.*Presjek mozga u ranoj do srednjoj fazi AB*

Preuzeto i prilagođeno iz: http://www.nia.nih.gov/sites/default/files/02_mildad_lg.jpg

Kasna faza AB

U ovoj fazi dolazi do teškog propadanja svih kognitivnih sposobnosti. Ograničena je sposobnost svakodnevnog funkcioniranja, osobe postaju ovisne o brizi drugih. Govor dolazi u fazu eholalije, automatskog ponavljanja riječi u besmislenom nizu. Morfološki dolazi do proširenja plakova i snopića po mozgu te gubitka moždanog tkiva (Sutton, 2011) (**slika 1.3**).

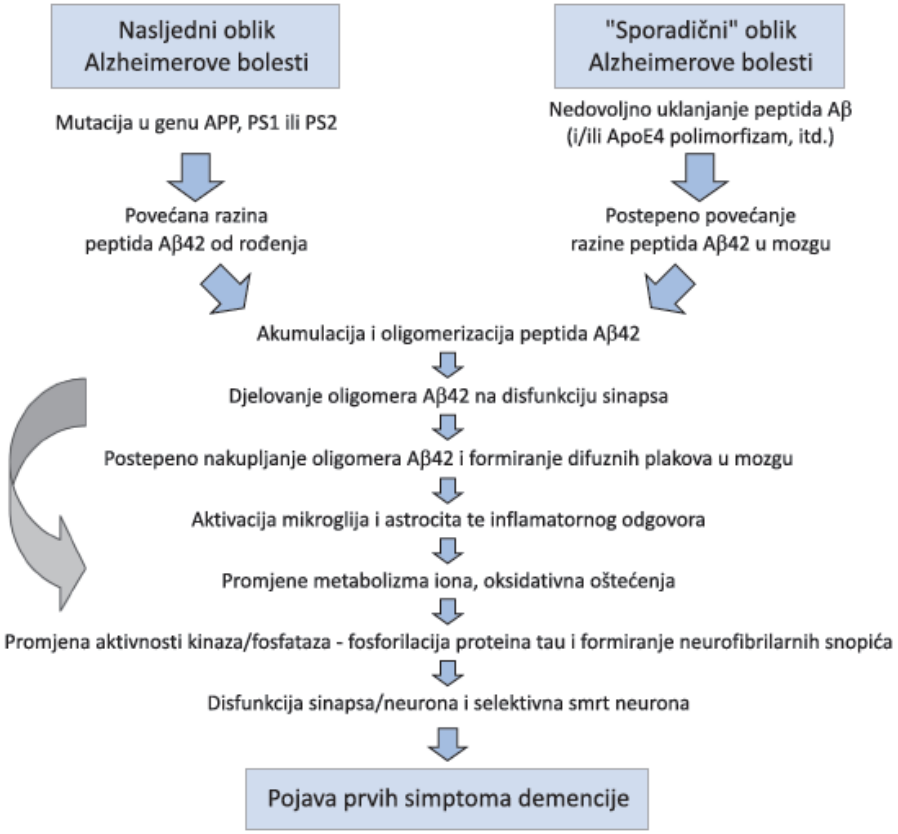


Slika 1.3.*Presjek mozga u kasnoj fazi AB*

Preuzeto i prilagođeno iz: http://www.nia.nih.gov/sites/default/files/02_severead_lg.jpg

1.4 GENETIČKA OSNOVA AB

Alzheimerova bolest je s genetičkog stajališta heterogeni poremećaj koji se javlja kao nasljedni i sporadični tip bolesti (**Slika 1.4**).



Slika 1.4.*Shematski prikaz slijeda događaja amiloidne hipoteze nastanka AB*

Preuzeto iz: Malnar i sur. 2009

1.4.1 Geni uključeni u nasljedni oblik AB

Nasljedni oblik AB prenosi se na autosomno dominantan način, a prvi simptomi javljaju se prije 65. godine života. Zato se ovaj oblik bolesti naziva i nasljedni oblik AB s ranim početkom (od eng. *early-onset Alzheimer's disease* – EOAD).

Mutacija u genu za prekursorni protein amiloid-β (od eng. *amyloid- beta precursor protein-APP*) na kromosomu 21 prva je otkrivena mutacija koja uzrokuje nasljedni oblik AB (Goate i sur., 1991). Postoje i dodatne mutacije *APP* gena, te mutacije u genima za presenilin 1 (*PSEN1*) na kromosomu 14 i presenilin 2 (*PSEN2*) na kromosomu 1 koje objašnjavaju nasljedne slučajeve bolesti (Sherrington i sur., 1995; Levy-Lahad i sur., 1995). Obitelji u kojima se javlja nasljedni oblik AB vrlo su rijetke, te je učestalost takvog oblika AB ispod 0.1% (Harvey i sur., 2003).

Otkriće mutacija u genima *APP*, *PSEN1* i *PSEN2* pridonijelo je razumijevanju molekularnog mehanizma nastanka AB. Zanimljivo je da više od 200 otkrivenih mutacija u ovim genima ima jednak učinak na povećanje omjera peptida $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$, ukazujući na jedinstven mehanizam nastanka nasljednog oblika AB.

1.4.2 Geni uključeni u sporadični oblik AB

Sporadični oblik AB javlja se nakon 65. godine te se još naziva sporadični oblik AB s kasnim početkom (od eng. *late-onsetAlzheimer's disease* – LOAD). Iako se naziva sporadičnim, posljednja genetska istraživanja ukazuju na to kako sporadičan oblik AB vjerojatno nije sporadičan, već se javlja kao posljedica međudjelovanja nekoliko gena i nekoliko čimbenika rizika te da postoji genetska predispozicija za njegov razvoj. Brojne asocijacijske studije i analize vezanosti gena utvrdile su velik broj gena koji bi mogli biti uključeni u nastanak ovog oblika AB, te da su odgovorni za gotovo 80% slučajeva sporadične AB (Blennow i sur., 2006). Međutim, rezultati dobiveni u ovim istraživanjima nisu se uspjeli ponoviti u studijama na drugim populacijama, što ukazuje na to kako još uvijek nije utvrđen gen koji bi direktno bio odgovoran za nastanak ovog oblika AB. Jedini do sada utvrđeni rizični čimbenik za nastanak sporadičnog oblika AB je polimorfizam gena za apolipoprotein E (*APOE*) ε4, ali se ne može smatrati njezinim uzrokom. Gen za APOE nalazi se na kromosomu 19. Postoje tri izoforme proteina: E2, E3 i E4 koje se razlikuju ovisno o prisutnosti aminokiselina arginin i cistein na poziciji 112 i 158. Izoforma E2 ima cistein na pozicijama 112 i 158, E3 ima cistein

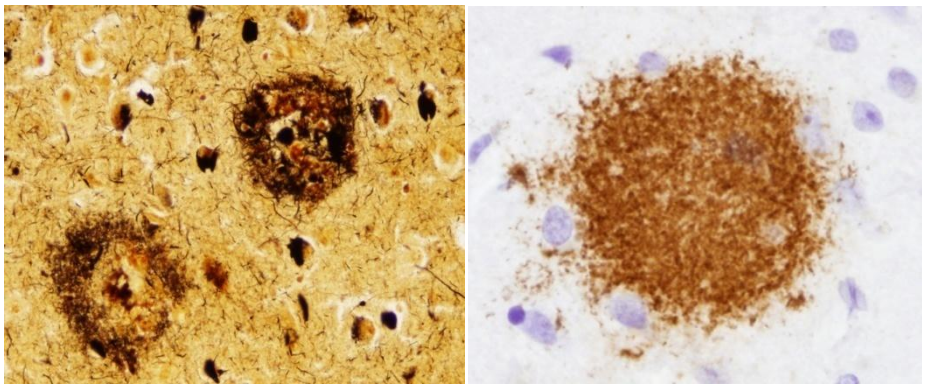
na pozicijama 112 i arginin na 158, a E4 ima arginin na pozicijama 112 i 158 (Zuo i sur., 2006).

Molekularni mehanizmi djelovanja APOE proteina u razvoju AB nisu potpuno jasni, međutim zna se da ima funkciju u prijenosu kolesterola u mozgu, dok je APOE4 varijanta tog proteina manje učinkovita od drugih oblika (Poirier, 1994). ApoE je potreban i za nakupljanje amiloid-β peptida (Aβ) čime potiče njegovu agregaciju i stvaranje plakova (Holtzman i sur., 2000). Dvije populacijske studije iz 1993. godine ukazale su na povezanost između alela ε4 gena za apolipoprotein E (*APOE*) i AB (Corder i sur., 1993; Poirier i sur., 1993). Ovaj polimorfizam prisutan je u 15% zdrave populacije, dok se kod oboljelih od AB javlja u 65% slučajeva. Heterozigoti za ε4 alel imaju tri puta povećan rizik oboljenja od AB, dok je kod homozigota taj rizik povećan 15 puta (Farrer i sur., 1997). ApoE ε4 alel utječe na raniju pojavu simptoma bolesti tako da svaka kopija ε4 alela snižava dob pojave simptoma za 10-ak godina (Corder i sur., 1993).

1.5 PATOGENEZA AB

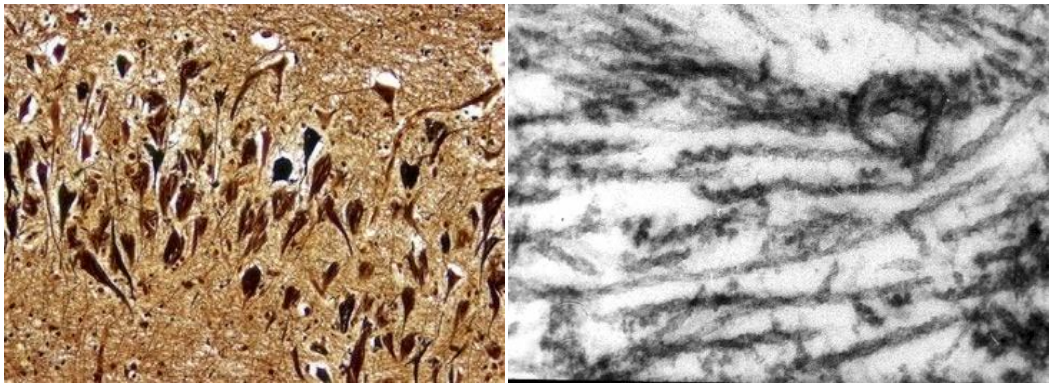
Kod osoba oboljelih od AB dolazi do propadanja neurona u kortikalnim i subkortikalnim regijama mozga. Masa i volumen mozga se smanjuju, a ventrikuli se povećavaju (Sutton, 2011). Na histološkim preparatima središnjeg temporalnog režnja i kore moždanog tkiva bolesnika s AB nalaze se karakteristične mikroskopske lezije: senilni plakovi (SP) i neurofibrilarni snopići (NFS) (Blennow i sur., 2006).

SP su makroskopske lezije ovalnog oblika koje se nalaze u izvanstaničnom prostoru mozga s centralnom proteinskom jezgrom građenom od Aβ. Taloženje Aβ uzrokuje nastanak difuznih plakova (od eng. *diffuse plaques*- DP) u kojima $A\beta_{1-40}$ čini 40%, a $A\beta_{1-42}$ oko 5% plakova (Gandy, 2005.) (**slika 1.5**). Aβ s vremenom prelazi u konformaciju β uzvojnice koja se nalazi u primitivnim SP u obliku gustih snopića. Kada SP okruže distrofični neuriti (od eng. *dystrophic neurites*- DN) nastanu neuritički plakovi (NP) (Selkoe, 2001).



***Slika 1.5**. Prikaz senilnog plaka (lijevo) i difuznog plaka (desno)*
Preuzeto iz: http://neuropathology-web.org/chapter9/chapter9bAD.html

NFS su lokalizirani u neuronima i građeni od dvije duge, nerazgranate podjedinice sparene u dvostruku zavojnicu (od eng. *paired helical filament* – PHF). PHF čini hiperfosforilirani tau protein. Hiperfosforilacija dovodi do razgradnje mikrotubula i poremećaja funkcije sinapsi (Jovanović, 2012). Oblici NFS razlikuju se s obzirom na tip neurona u kojem se nalaze. Veliki kortikalni piramidalni neuroni sadrže NFS u obliku trokuta ili petlje. Štapićasti i klupkasti oblici nalaze se u hipokampusu, a okrugli oblici u bazalnoj i crnoj jezgri, jezgri *raphe* i donjem dijelu moždanog debla. NFS je definiran kao unutarstanična nakupina, međutim postoje i nakupine koje su izvanstanične a nastanu kada neuron umre, a u neuropilu ostane samo NFS (Nixon i Yuan, 2011) (**slika 1.6**).



***Slika 1.6** Prikaz neurofibrilarnih snopića (lijevo) i parnih uzvojitih filamenata (desno)*
Preuzeto iz: http://neuropathology-web.org/chapter9/chapter9bAD.html

Također u AB dolazi i do neurokemijskih promjena koje uključuju narušavanje sistema neurotransmitera, neuropeptida i aminokiselina, razine acetilkolina, serotonina, somatostatina, noradrenalina, gama aminomaslačne kiseline, neuropeptida Y, glutamata, supstancije P i kortikotropin otpuštajućeg faktora (Pavlović i sur., 2007).

1.6 TEORIJE NASTANKA AB

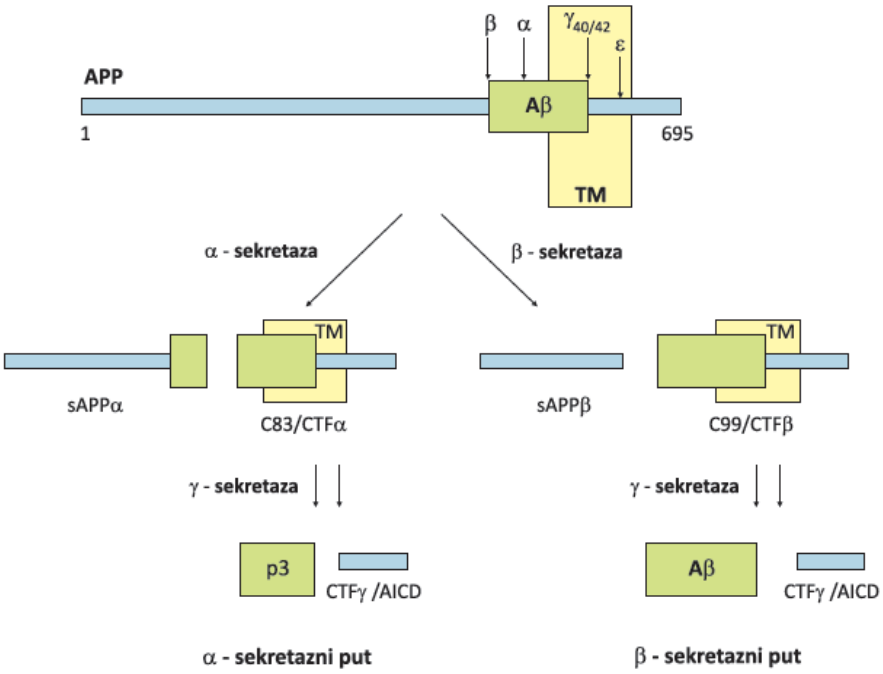
Neuropatološke promjene u AB nastaju kao posljedica različitih patoloških mehanizama. Agregacija amiloid-β peptida (Aβ) i njegovo odlaganje u obliku plakova, hiperfosforilacija proteina tau koja dovodi do nastanka nakupina neurofibrilarnih snopića, neurovaskularna disfunkcija, upalni procesi i oksidativni stres samo su neki od tih mehanizama. S obzirom na različite mehanizme, razvilo se nekoliko hipoteza nastanka AB.

1.6.1 HIPOTEZA AMILOIDNE KASKADE

Smatra se da je ova hipoteza vrlo vjerojatan mehanizam nastanka AB. Hipoteza pretpostavlja da peptid amiloid-β (Aβ) ima centralnu ulogu u patogenezi AB, odnosno da je neravnoteža između stvaranja i odstranjivanja ovog peptida u mozgu inicijalni moment koji naposljetku rezultira neurodegeneracijom i AB (Hardy i sur., 2002).

1968. godine kod starijih osoba nađena je povezanost između kvantitativnih mjera demencije i senilnih promjena u sivoj tvari mozga (Blessed i sur., 1968). Naknadno je sredinom 80-ih godina 20.st. otkriven glavni protein senilnih plakova (Aβ) te njegova aminokiselinska sekvenca (Masters i sur., 1985). Ubrzo je uslijedilo i kloniranje gena za APP, te je predložen mogući mehanizam nastanka Aβ. APP je veliki transmembranski protein unutar kojeg se nalazi slijed aminokiselina iz kojeg nakon cijepanja nastane peptid Aβ (Kang i sur., 1987). Postoji deset različitih oblika APP, od toga tri transkripta sadrže Aβ slijed, a samo se APP_{695} eksprimira u mozgu. Prvotno se smatralo da je peptid Aβ protein koji ne nastaje u normalnoj stanici, međutim istraživanja su pokazala da je on produkt metabolizma svake stanice (Haass i sur., 1992). Jednim dijelom APP nalazi se u transmembranskom prostoru, a ostalih 28 aminokiselina nalazi se u izvanstaničnom prostoru.

Zatim su istraživanja usmjerena prema enzimima koji sudjeluju u izrezivanju Aβ peptida iz proteina APP. Postoje dva važna puta razgradnje APP: put α- sekretaze i put β- sekretaze u kojima sudjeluju tri enzima, α, β i γ sekretaza (**Slika 1.7**).



***Slika 1.7**. Shematski prikaz procesiranja prekursornog proteina amiloid-β (APP)*

Preuzeto iz: Malnar i sur. 2009

Budući da enzim α-sekretaza cijepa APP unutar slijeda Aβ ne dolazi do stvaranja Aβ, već nastaje kraći peptid p3 koji nema sklonost nakupljanja i stvaranja plakova. Taj put naziva se i neamiloidogenim (Lammich i sur., 1999).

U amiloidogenom putu, razgradnja enzimom β-sekratezom dovodi do cijepanja APP na početku Aβ-slijeda i oslobađanja β-topljivog APP (od eng. *B-soluble amyloid precursore protein*- βsAPP). Iz njega u ovisnosti od pozicije djelovanja γ-sekretaze nastane Aβ od 40 ili 42 aminokiseline ($Aβ_{1-40}$ i $Aβ_{1-42}$). U prilog ovoj teoriji govore nasljedni oblici AB koji nastaju uslijed mutacija APP gena te PSEN1 i PSEN2. Disfunkcionalni protein presenilin-1 ključan je enzim za nastanak najvećeg broja obiteljskih oblika AB jer je dio multiproteinskog kompleksa γ-sekretaze, zbog čega dolazi do povećane proizvodnje Aβ42 (Wolfe i Selkoe, 1999). U prilog ovoj teoriji ide i pronalazak da se kod osoba s Down sindromom koje imaju tri kopije APP gena zbog trisomije 21. kromosoma, plakovi razvijaju veoma rano u životu,

slično kao i kod obitelji kod kojih je nađena duplikacija APP lokusa (Rovelet-Lecrux i sur., 2006). Iz navedenog je zaključeno da pojačana ekspresija APP gena potiče odlaganje Aβ.

Topljivi Aβ prolazi kroz konformacijske promjene i teži agregaciji u topljive oligomere i veća netopljiva vlakna. Tijekom tog procesa Aβ42 potiče jače abnormalno slaganje različito dugih peptida Aβ nego Aβ40. U početku se smatralo da samo Aβ koji se nalazi u plakovima ima ovakav neurotoksičan učinak, no kasnije je ustanovljeno da i topljivi oligomeri Aβ mogu dovesti do nekih patoloških promjena (Jarrett i sur., 1993).

Ova teorija ima i nekoliko kontradikcija. *In vivo* injicirani Aβ ne dovodi do toksičnog učinka, nema gradijenta oštećenja oko SP i nema dovoljno dokaza o povezanosti SP s patološkim obilježjima i kliničkim simptomima.

1.6.2 TAU HIPOTEZA

TAU hipoteza pojavila se u isto vrijeme kao i amiloidna hipoteza. Protein tau primarno se nalazi u aksonima neurona, ali također ga nalazimo u manjoj mjeri u dendritima i glija stanicama. Tau je protein povezan s mikrotubulima (od eng. *microtubule associated proteins* –MAP), te čini 18 nm kratke ručice koje povezuju molekule alfa i beta tubulina u mikrotubulima (MT). Kodiran je genom na dugom kraku kromosoma 17 koji se sastoji od 16 eksona. Postoji 6 izoformi tau proteina koje nastaju uslijed alternativnog sparivanja eksona. Svaka izoforma se drugačije eksprimira u vrijeme razvoja (Nixon i Yuan, 2011). Odrasle izoforme tau proteina sastoje se od četiri visoko konzervirana ponavljajuća slijeda 4R (R1-R4), dok fetalnom nedostaje ekson 10 i ima 3R (R1, R3 i R4) (Buee i sur., 2000).

Protein tau građen je od dviju domena, projekcijske domene i domene koja povezuje tau i MT. Domena za povezivanje kopolimerizira s tubulinom u MT te potiče time njihovo sastavljanje i stabilnost. Projekcijska domena veže se za neurofilamente ili druge MT. Biološka aktivnost tau proteina kontrolirana je fosforilacijom, a u manjoj mjeri ovisi i o glikozilaciji. Ukoliko dođe do hiperfosforilacije proteina tau, mijenja se njegova konformacija što uzrokuje razgradnju mikrotubula i nakupljanje hiperfosforiliranog oblika proteina tau u unutrašnjosti stanice zajedno sa ostalim proteinima koji su vezani za mikrotubule. Kao posljedica toga dolazi do poremećenog transporta unutar aksona i smetnji u sinaptičkoj funkciji neurona (Buee i sur., 2000).

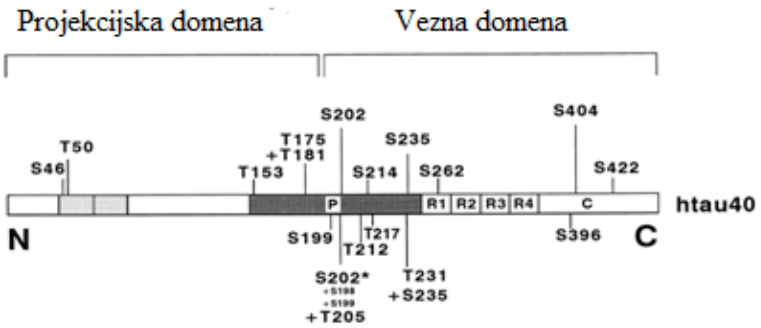
Fosforilacija proteina tau regulirana je složenim odnosom više serin/treonin kinaza, uključujući GSK-3β, PKA, PKC, CDK5, MARK, JNK, p38/MAPK, kasein kinazu II i fosfatazu (npr. PP-1 i PP-2). Neprimjerena fosforilacija, odnosno više od 8 do 12 mola fosfata po molu proteina tau dovesti će do konformacijske promjene proteina tau i gubitka sposobnosti stvaranja poprečnih mostova koji povezuju mikrotubule, što dovodi do polimerizacije i nakupljanja proteina tau u obliku ravnih i sparenih uzvojitih filamenata (Johnson i sur., 2004). U AB neprimjerena hiperfosforilacija tau proteina dovodi do odvajanja tau proteina od mikrotubula što dovodi do raspada mikrotubula i u konačnici do oštećenja aksoplazmatske funkcije sinapsi i smrti živčanih stanica (Iqbal i sur., 2005). Hiperfosforilirani protein tau nakuplja se u obliku netopljivih vlakanaca. U citoplazmi neurona tvori NFS. Protein tau u sustavu NFS-a je inertan i može se samo *in vitro* defosforilacijom izdvojiti iz PHF kompleksa i vršiti funkciju povezivanja mikrotubula.

U osoba oboljelih od AB razine proteina tau veće su 4 do 8 puta u usporedbi sa zdravim osobama iste dobne i spolne grupe. Porast razine proteina tau povezan je s abnormalno hiperfosforiliranim tau proteinom (Khatoon i sur., 1992). Abnormalno hiperfosforilirani protein tau nalazi se i u citosolu moždanog tkiva bolesnika s AB, gdje može činiti i do 40 % ukupnog abnormalnog proteina tau. On ne stupa u interakciju s alfa i beta tubulinom mikrotubula *in vitro*, već dovodi do odvajanja normalnog proteina tau i drugih s mikrotubulima povezanih proteina od mikrotubula (Alonso i sur., 1994). Povezivanje abnormalno hiperfosforiliranog tau proteina iz citosola s normalnim tau proteinom dovodi do stvaranja snopića od 2.1 mm.

Identificirano je više od 40 mjesta fosforilacije proteina tau u osoba s AB (Gong i sur., 2005). Fosforilacija proteina tau na različitim mjestima ima različiti utjecaj na njegovu biološku funkciju i ulogu u patogenezi. Fosforilacija na serinu 262, treoninu 231 i serinu 235 inhibira vezanje proteina tau za mikrotubule za 35%, 25 % i 10 % (Sengupta i sur., 1998). Za navedeni učinak dovoljna je hiperfosforilacija tau proteina od 4 do 6 mola fosfata po molu tau proteina.

In vitro kinetička istraživanja vezanja hiperfosforiliranog tau i normalnog tau proteina pokazala su da su Ser199/Ser202/Thr205, Thr212, Thr231/Ser235, Ser262/Ser356, i Ser422 kritična mjesta fosforilacije koja pridonose pretvorbi normalnog tau u toksičan oblik. Daljnja fosforilacija na mjestima Thr231, Ser396 i Ser422 uzrokuje međusobno povezivanje proteina

tau u filamente (Alonso i sur., 2004). Enzimski imunotest na čvrstoj fazi razvijen je za pet mjesta fosforilacije, treonin 231 (pT231), serin 199 (pS199), treonin 181+231 (pT181+pT231), treonin 231 i serin 235 (pT231+pS235) i serin 369+404 (pS369+pS404) (Andreasen i sur., 2003). Većina mjesta fosforilacije su serin – prolin ili treonin – prolin motivi, a nalaze se izvan MT vezujuće domene (Buee i sur. 2000) (**slika 1.8**).



Slika1.8. *Bar dijagram najduže izoforme proteina tau (htau40) sa prikazanim mjestima fosforilacije proteina tau*
Preuzeto iz: *Illenberger i sur., 1997*

1.6.3 KOLINERGIČKA HIPOTEZA

To je najstarija hipoteza nastanka AB. Budući da kolinergički živčani putovi i njihov neurotransmiter acetilkolin imaju značajnu ulogu u reguliranju pamćenja i drugih kognitivnih funkcija, hipoteza pretpostavlja da propadanjem kolinergičkih neurona i padom koncentracije acetilkolina dolazi do razvoja AB (Francisa i sur., 1999).

1.6.4 UPALNA HIPOTEZA

Hipoteza pretpostavlja da nakupljanje plakova i neurofibrilarnih snopića stimulira upalne procese kojima se nastoje ukloniti patološke nakupine. Time se luče medijatori upale i drugi čimbenici koji zatim dodatno pridonose povećanju APP. Nastali APP stimulira stvaranje plakova i lučenje proupalnih medijatora što pridonosi razvoju AB (Zotova i sur., 2010).

1.6.5 OKSIDATIVNA HIPOTEZA

Kisikovi slobodni radikali imaju važnu ulogu u patofiziološkoj kaskadi koja dovodi do AB (Christen, 2000). Dokazi za ovu hipotezu dolaze iz različitih *in vitro* istraživanja koja pokazuju da slobodni radikali mogu uzrokovati degeneraciju neurona i njihovu smrt

(Padurariu i sur., 2013). To su kemijski nestabilne molekule koje se stvaraju tijekom normalnog metabolizma i unutar patofizioloških kaskada, ali zbog svoje reaktivnosti oštećuju stanice i tkiva kada je njihovo stvaranje veće od uklanjanja (Christen, 2000; Halliwell i Gutteridge, 2003). Vjerojatnost da je oksidativan stres uključen u AB i druge neurodegenerativne bolesti temeljeno je na činjenici da su neuroni jako osjetljivi na slobodne radikale zbog njihovog niskog sadržaja glutationa koji je bitan antioksidans (Cooper, 2003), visokog udjela polinezasićenih masnih kiselina u staničnim membranama (Hazel i Williams, 1990) i metabolizmom mozga koji treba dovoljne količine kisika. Monoaminooksidaza (MAO) je enzim uključen u mehanizam oksidativnog stresa. Nalazi se u vanjskoj mitohondrijskoj membrani (Greenawalt i Schnaitman, 1970) i bitan je u oksidativnoj deaminaciji neurotransmitera, noradrenalina, dopamina i serotonina te egzogenih amina, tiramina. Tijekom katalitičke aktivnosti MAO stvara se vodikov peroksid koji je izvor oksidativnog stresa (Ciccone, 1998; Gotz i sur., 1994; Riederrer i Youdim, 2003). Nekoliko nezavisnih istraživanja povezalo je povećane aktivnosti MAO-B sa AB (Zhou i sur., 2001).

1.7 LIJEČENJE ALZHEIMEROVE BOLESTI

U svakodnevnoj kliničkoj praksi, liječenje AB je simptomatsko. U tijeku su mnoga klinička i eksperimentalna istraživanja, međutim nije vjerojatno da će se pronaći samo jedan određeni lijek za AB, budući da je AB veoma kompleksna. Trenutno su najviše korišteni i najbolje proučeni inhibitori acetilkolinesteraze (AchE), kao donepezil, galantamin, rivastigmin, huperzin A, zatim memantin koji je antagonist N-metil-D-aspartat receptora i neuroprotektivni lijekovi (Nordberg, 2006). Iako su ovi lijekovi ublažili neke od fizioloških simptoma kod osoba oboljelih od AB, uspješnih lijekova s potencijalom modulacije bolesti nema. Hipoteza β-amiloidne kaskade i hiperfosforilacije proteina tau glavne su teorije koje objašnjavaju patogenezu AB, zato se većina terapija modulacija bolesti usredotočuje prvenstveno na tvari koje bi smanjile razinu Aβ i hiperfosforilaciju tau proteina.

1.7.1 Inhibitori kolinesteraza

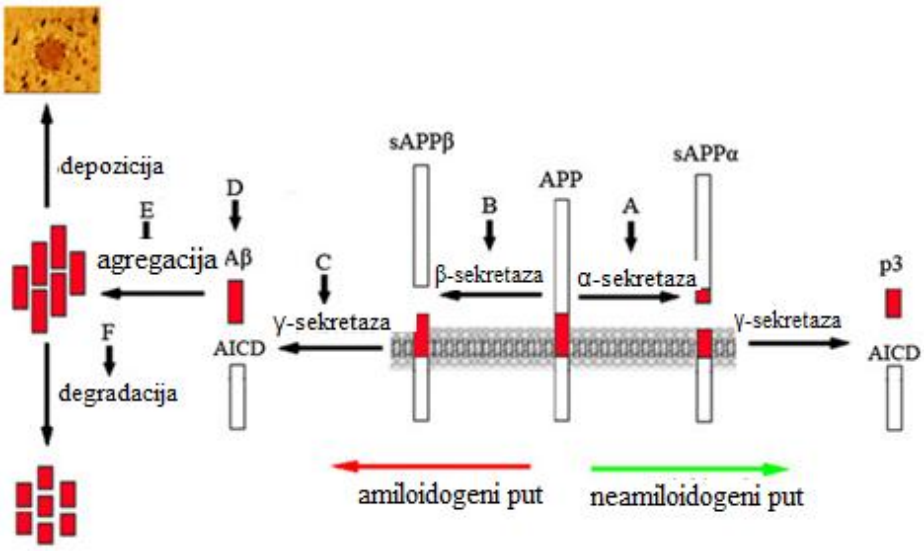
Post-mortem istraživanja pokazala su smanjen unos kolina, otpuštanje acetilkolina i progresivan gubitak kolinergičkih neurona u mozgu osoba oboljelih od AB. Prema kolinergičkoj hipotezi simptomi AB uzrokovani su smanjenom razinom acetilkolina u presinapsi, stoga bi povećanje dostupnog acetilkolina inhibiranjem njegove degradacije

poboljšalo pamćenje i smanjilo kognitivno oštećenje. Mnogi kolinesterazni inhibitori su još u kliničkim istraživanjima, kao huperzin A, kineska biljka koja može reverzibilno i selektivno inhibirati acetilkolinesterazu i ladostigil koji kombinira neuroprotektivni učinak monoaminooksidaza A i B sa inhibicijom kolinesteraza (Giacobini, 2000).

Do sada su odobrena četiri inhibitora acetilkolinesteraze za liječenje blage do umjerene AB: takrin, donepezil, galantamin i rivastigmin. Takrin se više ne koristi zbog svoje hepatotoksičnosti. Donepezil i galantamin uspješni su u poboljšanju i održavanju kognitivnih funkcija potrebnih za svakodnevni život, a također mogu utjecati na procesiranje APP-a. Donepezil je u početku razvijen za liječenje blage do umjerene faze AB, ali davanjem većih doza može se liječiti umjerena do teška faza AB (Giacobini, 2000). Rivastigmin je inhibitor AChE i buturil-kolinesteraze i uspješan je u poboljšanju kognicije.

1.7.2 Aβ strategije liječenja

Jedno od obilježja AB je prisutnost senilnih plakova u hipokampusu koji su primarno formirani od izvanstaničnog Aβ peptida. Aβ je neurotoksin, agregira i formira nakupine koje dovode do neuralne disfunkcije te kliničkih simptoma AB. Prema tome, prevencija AB bila bi moguća smanjenjem stvaranja Aβ, stimulacijom raščišćavanja nastalog Aβ ili sprječavanjem agregacije Aβ u amiloidne plakove (**slika 1.9**).



Slika 1.9 *Shema procesiranja APP, te stvaranja i degradacije Aβ. Potencijalna mjesta djelovanja lijekova označena su vertiklanim strelicama slovima* ***A*** *α-sekretazni aktivatori;* ***B***

*β-sekretazni inhibitori; **C** γ-sekretazni inhibitori/modulatori; **D** imunoterapija; **E** inhibitori agregacije Aβ-; **F** aktivatori degradacije Aβ*
preuzeto iz: Yang i sur., 2012

Inhibitori β-sekretaze

Istraživan je terapijski potencijal β-sekretaze 1 (od eng. *beta-secretase*- BACE1) na *knockuot* miševima. Oni su se razvijali normalno, nisu pokazivali fenotipske razlike od divljeg tipa i stvarali su puno manje Aβ iz APP-a. Zato su BACE1 inhibitori postali dobra terapijska strategija za usporavanje ili sprječavanje progresije bolesti (Lou i sur., 2001). BACE inhibitor dovodi do smanjenja $A\beta_{1-40}$ i $A\beta_{1-42}$, smanjenja sAPPβ i povećanja sekrecije sAPPα. Razvijen je i inhibitor β-sekretaze KMI-429 koji uspješno smanjuje koncentraciju Aβ u APP transgeničnih miševa.

Inhibitori γ-sekretaze

Tretman miševa s inhibitorom γ-sekretaze, DAPT, dovelo je do smanjene razine Aβ u plazmi i cerebrospinalnoj tekućini što je također uočeno kod drugih inhibitora γ-sekretaze. Napredak u razvoju klinički korisnih inhibitora γ-sekretaze usporeno je zbog javljanja popratnih pojava, budući da je jedan od supstrata γ-sekretazi i protein notch koji je bitan za rast i razvoj. Zato se razvoj lijekova sada usmjerava na istraživanje γ-sekretaznih modulatora koji bi pomicali mjesto rezanja γ-sekretaze s Aβ42 na Aβ8 tako da nastanu netoksični Aβ fragmenti. Nesteroidni protuupalni lijek tarenflurbil pokazao se kao dobar kandidat (Xia i sur., 2012).

Aktivatori α-sekretaze

Budući da se α-sekretaza i β-sekretaza natječu za isti supstrat APP-a, uzvodna regulacija aktivnosti α-sekretaze može smanjiti količinu APP-a dostupnog za β-sekretazu i tako smanjiti stvaranje Aβ. Proteini iz obitelji adamalizin, ADAM 10, ADAM 17 i ADAM 9 pokazali su potencijalni terapijski učinak. Prekomjerna ekspresija ADAM 10 u transgeničnih miševa, pokazala je smanjenu depoziciju amiloida u hipokampusu i smanjenu razinu Aβ (Postina i sur., 2004). Istraživanja pokazuju da mnogi uspješni lijekovi za AB podižu aktivnost α-sekretaze. Deprenil je neuroprotektivan lijek korišten za usporavanje procesa AB kod kojeg je

pokazano da povećava aktivnost α-sekretaze promovirajući translokaciju ADAM10 i protein kinaze C (Yang i sur., 2009).

Muskarinski agonisti

M1 muskarinski receptor ima ulogu u povezivanju tri važna obilježja AB, Aβ peptida, hiperfosforilacije tau i gubitka kolinergične funkcije, a također regulira i aktivnost sekretaza. Aktivacija M1 muskarinskih receptora sa agonistima dovodi do povećane sekrecije sAPPα preko aktivacije α-sekretaze, smanjenja Aβ preko inhibicije γ-sekretaze i inhibicije Aβ i smanjenja fosforilacije proteina tau. Talsaklidin je selektivni agonist koji stimulira neamiloidogeno procesiranje α-sekretazom u *in vitro* (Fisher, 2008).

Inhibitori agregacije Aβ

Budući da Aβ ima neurotoksičan utjecaj, njegovo destabiliziranje ili inhibicija njegove agregacije ima terapijski potencijal (Haass i Selkoe, 2007). Nepeptidni lijekovi koji sprječavaju agregaciju mogu djelovati tako da se vežu za Aβ monomere, čime spriječe oligomerizaciju i omogućuju eliminaciju ili alternativno mogu reagirati sa Aβ oligomerima i tako neutralizirati njihovu toksičnost i poticati njegovo raščišćavanje (Amijee i Scopes, 2009). Tramiprosat (Alzhemed), iz prve generacije lijekova, veže se za topljivi Aβ i inhibira stvaranje neurotoksičnih agregata koji dovode so depozicije amiloidnih plakova u mozgu, međutim on nije pokazao uspješnost u trećoj kliničkoj fazi ispitivanja (Aisen i sur., 2009).

Lijekovi koji potiču raščišćavanje Aβ

Aktivna imunizacija (vakcinacija) i pasivna imunizacija (monoklonalna antitijela) razvijene su kako bi se spriječilo stvaranje toksičnih Aβ agregata i uklonili topljivi i agregirani Aβ. Mehanizmi koji mogu poticati uklanjanje Aβ su povećanje topljivosti vezanjem antitijela na Aβ, fagocitoza opsoniziranih Aβ pomoću mikroglija stanica i izlučivanje Aβ iz mozga pomoću plazmatskih antitijela.

Aktivna imunizacija na $A\beta_{1-42}$ pokazala je kod transgeničnih miševa smanjenje plakova i poboljšanje u kognitivnim funkcijama. Ti su rezultati doveli do kliničkih testiranja sintetskog Aβ peptida AN-1792 u osoba sa blagim do umjerenim AB, međutim studija je zaustavljena

jer je 6% osoba razvilo simptome encefalitisa ili meningoencefalitisa. Pretpostavlja se da je upalni proces nastao posredovanjem limfocita T. U svrhu imunizacije upotrijebljen je cijeli $A\beta_{1-42}$, međutim za antigeničnost je bitan samo amino-terminalni kraj $A\beta_{1-16}$ koji ne izaziva upalnu reakciju. Stoga se sada testiraju novi proteini koji nose samo amino-terminalni kraj $A\beta_{1-16}$ da bi se izbjegao štetan T-staničan odgovor (Orgogozo i sur., 2003).

Pasivna imunoterapija se temelji na monoklonalnim antitijelima ili poliklonalnim imunoglobulinima koji ciljaju Aβ da bi omogućili njegovo raščišćavanje. Anti-Aβ antitijela mogu spriječiti stvaranje oligomera i poboljšati kognitivne funkcije (Wilcock i sur., 2008). Trenutno se testira nekoliko monoklonalnih antitijela u osoba s AB kao bapineuzumab i solanezumab. Bapineuzumab je humanizirano anti-Aβ monoklonalno antitijelo testirano na osobama s blagim do umjerenim AB, međutim nije pokazalo značajan efekt na kogniciju. Solanezumab je monoklonalno antitijelo koje specifično veže topljivi Aβ i potiče uklanjanje Aβ iz mozga preko krvi. Pokazano je da on mobilizira $A\beta_{1-42}$ iz plakova i normalizira topljive $A\beta_{1-42}$ u osoba s AB (Siemers i sur., 2008). Pasivna imunizacija moguća je intravenoznim unosom imunoglobulina zdravih osoba koja prirodno imaju poliklonalna anti-Aβ antitijela. Unos imunoglobulina u osoba s AB uzrokovalo je smanjenje ukupnog Aβ u cerebrospinalnoj tekućini (CSF), povećanje ukupne plazmatske koncentracije Aβ te poboljšanje kognitivnih funkcija (Dodel i sur., 2004).

Enzimi koji razgrađuju Aβ

Aβ peptid može se razgraditi Aβ-razgrađujućim enzimima. Postoji kinetička ravnoteža između stvaranja Aβ, razgradnje i prijenosa unutar mozga i izvan mozga. Proteinaze koje mogu razgraditi Aβ peptid su neprilizin (od eng. *neprilysin*-NEP), enzim koji razgrađuje inzulin (od eng. *insulin-degrading enzyme*-IDE), plazmin i endotelin konvertirajući enzim ECE1 i 2 (od eng. *endothelin converting enzyme*). Injiciranje NEP inhibitora pokazalo je smanjenu razgradnju Aβ i opadanje kognitivnih aktivnosti, dok prekomjerna ekspresija NEP dovodi do poboljšanog prostornog pamćenja i smanjene razine Aβ. Sa starenjem dolazi do smanjenja NEP aktivnosti, zato se osim smanjenja stvaranja Aβ, povećanje razgradnje Aβ smatra dobrim terapijskim potencijalom (Wang i sur., 2006).

Apolipoprotein E (ApoE) potiče raščišćavanje Aβ

Novija istraživanja govore da smanjeno raščišćavanje, odnosno degradacija Aβ više pridonosi nakupljanju Aβ, nego njegovo pojačano stvaranje u sporadičnoj AB (Mawuenyega i sur., 2010; Mulder i sur., 2012). ApoE 4 alel povećava rizik nastanka kasnog oblika AB. Preko stimulacije jezgrenog receptora povećana je lipidacija ApoE. Lipidirani ApoE aktivira mikroglija i/ili astrocite da razgrađuju Aβ. Dakle, terapeutici usmjereni na ApoE mogu smanjiti razinu Aβ u mozgu i imaju potencijal modulacije bolesti (Cramer i sur., 2012).

Lijekovi koji utječu na transport kroz krvno-moždanu barijeru

Receptor za krajnje produkte uznapredovale glikozilacije (od eng. *receptor for advanced glycation end- products*- RAGE) transportira Aβ preko krvno-moždane barijere iz sistemske cirkulacije i tako omogućuje njegovu akumulaciju u mozgu. Inhibicijom interakcije RAGE i liganda smanjuje se akumulacija Aβ i neurotoksičnost, što pokazuje potencijalni terapijski učinak u liječenju AB (Chen i sur., 2007). PF-04494700 je antagonist RAGE-a koji je sada u drugoj fazi kliničkog testiranja.

Inhibitori HMG-CoA reduktaze- statini

Epidemiološka istraživanja pokazala su smanjenu prevalenciju AB kod osoba koje uzimaju statine. *In vitro* istraživanja pokazuju da prehrana bogata kolesterolom povećava procesiranje APP-a β-sekretazom, dok smanjenje kolesterola dovodi do smanjenog stvaranja Aβ. Zaključak da povećane razine kolesterola potpomažu stvaranju Aβ, dok statini smanjuju njegovo stvaranje govori o potencijalu statina kod liječenja AB, međutim potrebna su klinička istraživanja gdje će se pratiti metabolizam kolesterola i APP-a tijekom i nakon tretmana statinima (Solomon i Kivipelto, 2009).

Inhibitori monoaminooksidaza (MAO)

Izoenzimi MAO-A i MAO-B metaboliziraju serotonin (uglavnom MAO-A) i dopamin te noradrenalin (MAO-A i MAO-B), ali samo se količina MAO-B povećava starenjem (Mahy i sur., 2000). MAO-A i MAO-B dijele 70% identitet sekvence i imaju jednak FAD kofaktor koji je kovalentno vezan na konzerviranom ogranku cisteina (Weyler i sur., 1990). Njihova

aktivna mjesta razlikuju se volumenom što uzrokuje njihovu različitu specifičnost prema supstratu i osjetljivost prema inhibitorima (Shih i sur., 1999).

1.7.3 Lijekovi koji ciljaju protein tau

Kod AB tau je abnormalno hiperfosforiliran što dovodi do stvaranja agregata toksičnih za neurone. Iako je hipoteza koja govori da je tau uključen u razvoj AB glavna uz amiloidnu, samo je jedan spoj, valproična kiselina, došao do treće faze nasumičnog kliničkog istraživanja, ali rezultati nisu povoljni budući da nije došlo do poboljšavanja kognicije (Tariot i Aisen, 2009; Tariot i sur., 2009).

Dva su glavna terapijska pristupa ciljanja proteina tau: modulacija tau fosforilacije pomoću inhibitora specifičnih kinaza i inhibiranje agregacije tau ili poticanje raspadanja tau agregata.

Sprječavanje fosforilacije proteina tau

Budući da je fosforilacija tau povišena kod AB, inhibitori tau kinaza mogu se koristiti u terapiji AB. Fosforilacija tau regulirana je različitim kinazama i fosfatazama. Protein fosfataza (PP)-2A može pojačati defosforilaciju tau, a također inhibira MAPK koja fosforilira tau. Ciklin ovisna kinaza 5 (CDK5) uključena je u fosforilaciju tau kod AB. Inhibicijom CDK5 u transgeničnih miševa pokazano je da se suprimira fosforilacija tau i sprječava stvaranje neurofibrilarnih snopića (Noble i sur., 2003).

Kinaza 3 glikogen sintaze (GSK-3β) uključena je u procesiranje tau i amiloida, staničnom signaliziranju i transkripciji gena, stoga njena deregulacija može imati ulogu u patogenezi AB (Pei i sur., 2008). Litij inhibira GSK-3β čime dolazi do smanjenja fosforilacije tau, stoga pokazuje potencijal u prevenciji tautopatija (Tariot i Aisen, 2009).

Sprječavanje agregacije proteina tau

Tau je topljivi protein koji može tvoriti netopljive filamentozne agregate. Mehanizam odgovoran za konverziju normalnog topljivog monomernog tau u netopljive filamentozne agregate glavni je terapijski cilj kod razvoja mnogih lijekova za AB. Pronađeni su i testirani u staničnoj kulturi inhibitori tau agregacije neovisni od njegove fosforilacije (Pickhardt i sur., 2005).

Poteškoća u razvoju uspješne terapije za AB je dizajniranje selektivnih tvari koje nemaju nepoželjne i potencijalno toksične nuspojave, te je nepovoljno da su potrebne godine da se dođe do faze kliničkog testiranja lijeka. U tijeku su mnoga istraživanja farmakodinamike i regulatornih mehanizama terapijskih ciljeva koji će poboljšati sigurnost i efikasnost lijeka. Razvoj AB je kompleksan proces i uključuje više faktora, a detalji razvoja nisu u potpunosti razjašnjeni na razini potrebnoj za pronalazak lijeka. Međutim, samo jedan terapijski cilj ili patogeni put uključen u nastanak AB teško je pronaći budući da se to odvija na razini gena, proteina, organela, stanica, organa, organizma i okoline (Bolognesi i sur., 2009).

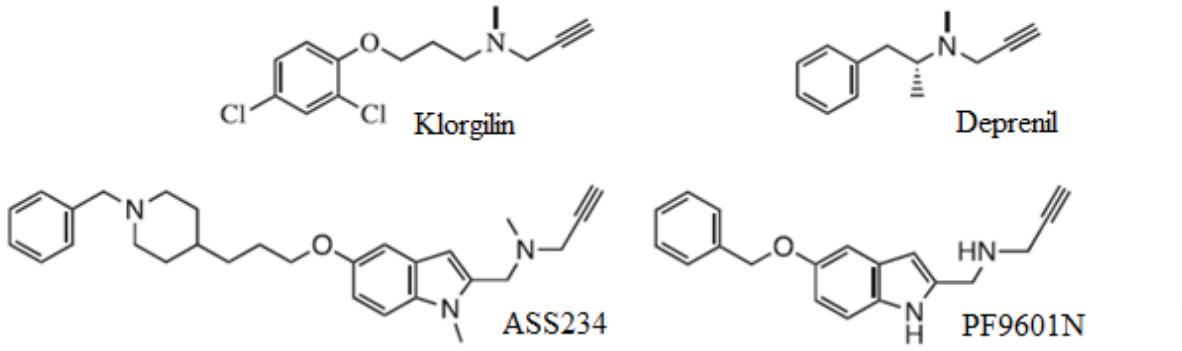
Multi-target terapije mogu biti dizajnirane na više načina (Hopkins, 2008). Standardna strategija je prepisivanje više individualnih lijekova. Takav pristup već se koristi kod AB gdje se inhibitori acetilkolinesteraza daju zajedno sa NMDA receptor antagonistom za bolji simptomatski učinak. Druga strategija je razvoj lijekova koji imaju dva ili više aktivna spoja isporučena u istoj kapsuli ili tableti. Glavni nedostatak obje strategije je potreba da obavezno oba spoja, odnosno lijeka moraju biti sigurni i efikasni individualno i u kombinaciji, a to je potreba koja učvršćuje manjkavu hipotezu jedan cilj, jedan lijek, jedna bolest (Youdim i sur., 2005). Treća strategija je dizajniranje jednog spoja sa selektivnom polifarmakologijom (od eng. *polypharmacology*), gdje je takav spoj sintetski hibrid koji ciljano i simultano djeluje na nekoliko mehanizama uključenih u razvoj AB (inhibitori acetilkolinesteraza, antioksidansi, modulatori metabolizma APP-a) (Geldenhuys i sur., 2013). Takvi lijekovi su sada u pretkliničkoj fazi ispitivanja (www.cbligand.org/AD/), kao novi obećavajući spoj ASS234 zbog višestrukih potencijalnih terapijskih učinaka (Bolea i sur., 2014).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

ASS234 patentiran je kako bi se istovremeno pomoću samo jedne molekule inhibirale kolinesteraze i MAO (referenca patenta: WO 2011/113988 A1).

Spoj ASS234*(N-((5-(3-(1-benzilpiperidin-4-il)propoksi)-1-metil-1H-indol-2-il)metil)-N-metilprop-2-in-1-amin)* je sintetiziran koristeći istu propagilnu grupu koja je prisutna u klorgilinu i deprenilu. ASS234 građen je od acetilkolinesteraznog inhibitora donepezila i MAO inhibitora FA65 (*N-((5-benziloksi)-1H-indol-2-il)metil)prop-2-in-1-amina*), derivata PF9601N (Samadi i sur., 2012; Sanz i sur., 2008) (**slika 1.10**).

Budući da su AchE i BuchE bitne za cijepanje neurotransmitera acetilkolina, pokazano je da je u liječenju neurodegeneracije potrebno inhibirati obje (Greig i sur., 2005; Venneri i sur., 2005).



Slika 1.10. *Strukture propagilnih inhibitora: klorgilina, L-deprenila, PF9601N i ASS234. (preuzeto iz Esteban i sur., 2014)*

Utjecaj spoja ASS234 na agregaciju i fosforilaciju tau proteina još nije ispitivan. S obzirom da FA65 inhibira MAO-A i B, učinak na fosforilaciju tau proteina ispitati će se pomoću inhibitora MAO-B (PF9601N) te inhibitora MAO-A (klorgilina) na modelu neuroblastomskih SH-SY5Y stanica.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Popis korištenih materijala i priprema otopina

Sastav medija za uzgoj stanica

DMEM (od eng. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) je složeni hranjivi medij, proizvođača Gibco, Life technologies. Konačni volumen od 500 ml komplementiran je dodatkom sljedećih sastojaka:

- serum goveđeg fetusa (engl. *Fetal bovine serum,* FBS) – 10% v/v – dodano 50 ml
- L-glutamin – 2 mM – dodano 5 ml 200 mM izvorne otopine
- Penicilin streptomicin – 10,000 U/ml penicilina i 10 mg/ml streptomicina – dodano 5 ml

Sastav i priprema otopina

Fosfatni pufer PBS (od eng. *phosphate buffer saline*) priprema se miješanjem 80 ml otopine I, 100 ml otopine II i destilirane vode do konačnog volumena od 1 L. Vrijednost pH ovako pripremljenog PBS pufera iznosi između 7,1 i 7,3.

OTOPINA I:

- NaCl – 100 g
- KCl – 2,5 g
- Na_2HPO_4 – 14,35 g
- KH_2PO_4 – 2,5 g
- Nadopuniti dH_2O do 1 L

OTOPINA II:

- $CaCl_2$ – 100 g
- $MgCl_2x6H_2O$ – 2,5 g

  Nadopuniti dH_2O do 1 L

Medij za smrzavanje priprema se miješanjem 1.8 ml DMSO nadopunjenog do 10 ml DMEM medijom.

Tripsin je pripremljen dodatkom 100 ml 2,5% (10x koncentriranog) tripsina, proizvođača GIBCO, Invitrogen, SAD u 900 ml PBS-a, pripremljenog kao što je gore opisano.

Tripansko modrilo pripremljeno je dodatkom 100 µl 40% izvorne otopine Trypan blue i 10 ml PBS-a, pripremljenog kako je gore navedeno da bi se dobila 0,4% otopina.

MTT reagens pripremljen je otapanjem 1 g Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide praška u 200 ml PBS-a, pripremljenog kao što je gore navedeno. Tako je dobivena izvorna otopina, koja je za eksperiment razrjeđena 10 puta.

RIPA pufer:

- 50 mM Tris, pH 8.0
- 150 mM NaCl
- 1% Igepal CA-630
- 0,1% SDS
- O,5% deoksikolat

Koktel proteaznih inhibitora (Sigma kat.br. P-2714)
U 500 µl RIPA staničnog ekstrakcijskog pufera smo dodali 5 µl koktela proteaznih inhibitora.

Bradford reagens za određivanje koncentracije proteina.

Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad, kat. br. 500-0006)

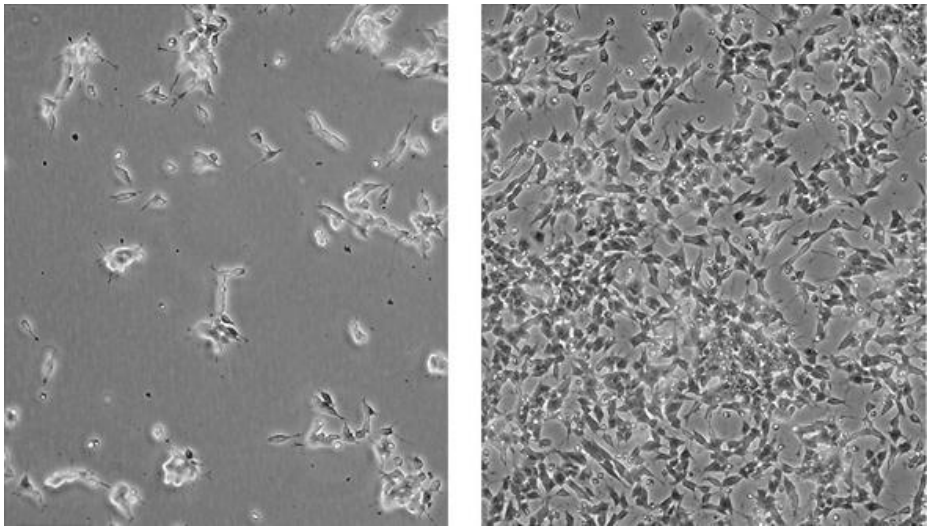
3.2 Rad sa stanicama u kulturi

Prilikom rada sa stanicama u kulturi potrebno je veliku pažnju posvetiti sterilnosti. Sve manipulacije sa stanicama izvođene su u sterilnom okruženju, u laminaru s okomitim strujanjem zraka. U radu sa stanicama korištene su sterilne pipete i uvijek su korištene rukavice prethodno sterilizirane 70%-nim etanolom. Stanice su rasle u plastičnim T- bocama različitih dimenzija (*flask*), bez filtra na čepu, u vlažnoj atmosferi, u inkubatoru pri 5% ugljikovog dioksida i temperaturi od 37°C. Za presađivanje i rad sa stanicama korišteni su odgovarajući sterilni mediji.

3.2.1 Stanična linija

U ovom radu korištene su komercijalno dostupne SH-SY5Y neuroblastomske stanice. SH-SY5Y stanice su nastale kloniranjem (SK-N-SH → SH-SY→ SH-SY5→ SH-SY5Y) podlinije

neuroblastomske stanične linije SK-N-SH koja je dobivena iz metastatskog tumora kostiju. To su epitelne stanice koje mogu biti adherentne i mogu rasti u suspenziji (**slika 3.1**).



Slika 3.1. *Stanice SH- SY5Y niske gustoće (lijevo) i visoke gustoće (desno), pri povećanju 100x.*

Preuzeto sa: http://www.lgcstandards-atcc.org/~/media/Attachments/B/D/0/3/1851.ashx

3.2.2 Presađivanje stanica

Stanice su presađivane kada bi dosegle oko 90% konfluentnosti, otprilike svaka dva do tri dana. Nakon što je pod mikroskopom provjerena konfluentnost stanica, u laminaru je sterilnom staklenom pipetom uklonjen stari medij iz T-boce. U T-bocu je oprezno dodano 4-5 ml 10% v/v tripsina. Tripsin cijepa proteinske veze među stanicama i tako omogućuje njihovo odvajanje od podloge. Kada su se stanice odlijepile od podloge, tripsin je inaktiviran dodavanjem 10 ml 10%-tnog medija stanicama. Temeljitim resuspendiranjem i ispiranjem stanica s podloge u 10 ml medija omogućeno je homogeno raspoređivanje stanica u mediju. 10 ml medija sa stanicama razdijeljeno je na podloge dviju novih T-boca (2x5 ml). Stanice su rasle u vlažnoj atmosferi inkubatora, na temperaturi od 37°C i sa 5% CO_2. Postupak presađivanja stanica ponavljan je do željene količine stanica potrebne za analizu.

3.2.3 Odmrzavanje stanica

Smrznute kriotubice sa stanicama stavljene su na led da se polako otapaju, stanice ne smiju početi metabolizirati medij s DMSO. Kada je otopina blizu potpunog odmrzavanja, prebaci se

u Falcon epruvetu od 15 ml. Nakon potpunog otapanja, dodaje se 10 ml DMEM-a komplementiranog s 2 mM glutaminom i antibioticima penicilinom i streptomicinom i 10%-tnim serumom iz fetusa goveda koji je ohlađen na ledu. Stanice se centrifugiraju na 300 x g, 5 min pri 4˚C. Supernatant se izbaci, stanice se resuspendiraju u 10 ml DMEM-a + 10% FBS-a prethodno zagrijanog na sobnu temperaturu. Stanice se prebace u veliku T-bocu (T-175) i dodaje još 20 ml DMEM-a + 10% FBS-a. Stanice su kultivirane na 37˚C, 5% CO_2.

3.2.4 Određivanje broja stanica

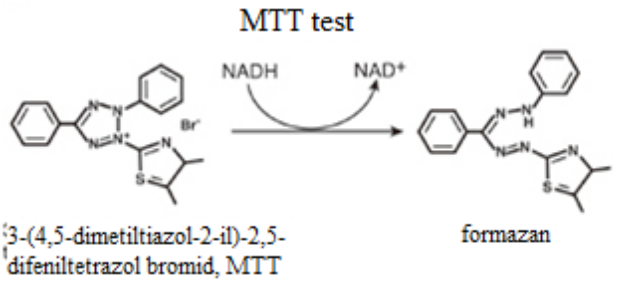
Stanice je potrebno prebrojati kako bi se uzeo broj stanica potreban za eksperiment. Za brojanje stanica koristi se otopina tripanskog modrila, koja boji mrtve stanice u plavo zbog oštećenja njihove membrane, dok žive stanice ostaju neobojene. Nakon što se stanice odvoje od podloge prema gore opisanom postupku, dobro se resuspendiraju, uzme se 20 µl stanične suspenzije i pomiješa sa 80 µl otopine tripanskog modrila i prebaci pod pokrovno stakalce Burker-Turk komorice za brojanje. Pod svjetlosnim mikroskopom u četiri kvadratića komorice prebroje se žive stanice koje padaju na L stranice kvadratića, te se njihov broj preračuna u broj stanica u mililitru, uzevši u obzir volumen komorice i razrjeđenje stanične suspenzije tripanskim modrilom prema sljedećoj formuli:

$$\text{br.st./ml} = (N/4) \times 5 \times 10^4$$

pri čemu je N broj stanica u 4 kvadratića komorice, broj 5 predstavlja razrjeđenje (20 µl stanične suspenzije u 80 µl tripanskog modrila), a 10^4 volumen komorice.

3.2.5 MTT test

MTT test proliferacije stanica je kolorimetrijski test koji detektira aktivnost mitohondrijske dehidrogenaze u živim stanicama. Mjeri redukciju tetrazolium boje (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol bromid, MTT) u netopljivi formazan ljubičaste boje u mitohondrijima živih stanica (**slika 3.2**). Redukcija MTT-a povećava se što je veća metabolička aktivnosti stanice, iz toga razloga odražava broj živih stanica. Test se koristi za određivanje citotoksičnosti spojeva.



Slika 3.2 *Redukcija MTT u netopljivi formazan*

Stanice su odvojene od podloge i prebrojane prema gore opisanom protokolu. Izračunat je ukupan volumen za nasađivanje i volumen stanične suspenzije potreban da bi se dobila potrebna koncentracija stanica po jažici. Stanice su nasađene na mikrotitarsku pločicu s 96 jažica, u volumenu od 100 µl po jažici (50 000 stanica/cm^2). Nakon četverodnevnog uzgoja u kulturi, stanice u jažicama tretirane su 30 nM, 50 nM i 100 nM okadaičnom kiselinom. Nakon 24h tretmana na stanice i na slijepu probu dodaje se 40 µl MTT reagensa po jažici. Pločica se omota aluminijskom folijom i ostavi 3 sata u inkubatoru, na 37°C. Nakon 3 sata na pločicu se dodaje 160 µl dimetil-sulfoksida (DMSO) u mediju, resuspendira pipetom te stavi na tresilicu pet minuta. DMSO je organsko otapalo koje netopljivi formazan čini topljivim. MTT reagens se dodaje i u kontrolne stanice koje nisu tretirane okadaičnom kiselinom.

Zatim se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 570 nm na čitaču mikrotitarskih pločica (model 680 Series; *Biorad Laboratories, Hercules, USA*). Apsorbancija je direktno proporcionalna vijabilnosti stanica. Nakon očitanja vrijednosti apsorbancije na spektrofotometru izračuna se postotak rasta (od eng. *percentage of growth*- PG) prema sljedećoj formuli:

PG = 100 x (ODtest - ODtzero) / (ODctrl - ODtzero),

ODtzero - srednja vrijednost optičke gustoće stanica

ODtest - prosjek mjerenja optičke gustoće nakon željenog perioda vremena

ODctrl- prosjek mjerenja optičke gustoće nakon željenog perioda, kontrola.

3.2.6 Tretiranje stanica

Nasađivano je 50 000 stanica/cm^2 u 25 cm^2 T-boce. Stanice su nakon 4 dana u kulturi tretirane, a tretmani su dodani u mediju s 1% FCS. Kontrolne SH-SY5Y stanice nisu tretirane. Jedan set SH-SY5Y stanica tretiran je okadaičnom kiselinom 30 nM koncentracije. Drugi set

SH-SY5Y stanica prvo je tretiran 1h sa klorgilinom 10 μM koncentracije, nakon čega je tretiran 30 nM okadaičnom kiselinom 24 h. Treći set SH-SY5Y stanica tretiran je prvo 1h s PF9601N10 μM koncentracije, nakon toga 30 nM okadaičnom kiselinom 24 h. Vrijednosti 30 nM okadaične kiseline su korištene jer se MTT testom pokazalo da ne djeluju citotoksično (za razliku od okadaične kiseline koncentracije 50 nM i 100 nM).

3.2.7 Sakupljanje proteina

Nakon završenih tretmana, sakupljeni su proteini iz stanica prema sljedećem protokolu.
Stanični medij se ukloni iz T-boce dok se preostali medij ispere PBS-om. Stanice se sastružu iz T-boce nakon dodatka RIPA staničnog ekstrakcijskog pufera i koktela proteaznih inhibitora pomoću plastičnog strugača i sakupe, nakon čega se centrifugiraju. Volumen dodanog staničnog ekstrakcijskog pufera ovisi o broju stanica u staničnom talogu te ekspresiji i fosforilaciji proteina. Za 10^7 SH-SY5Y stanica koristi se 0.5 ml ekstrakcijskog pufera da se dobije 1 mg/ml ukupnih proteina. Sakupljene stanice se liziraju 30 minuta na ledu sa vorteksiranjem svakih 10 minuta. Ekstrakt se zatim prebaci u tubice i centrifugira na 10,000 x g, 10 minuta na 4˚C. Supernatant se alikvotira u nove tubice i spremi na -80˚C.

3.2.8 Određivanje koncentracije proteina po Bradfordu

Ova metoda temelji se na brzom pomaku maksimuma apsorbancije, od 465 nm na 595 nm, koji se javlja u trenutku kada se boja Coomasie briljant plavo (od eng. *Coomasie Brilliant Blue*) u kiseloj otopini veže za proteine pri čemu nastaje smeđe do plavo obojenje. Za vezanje boje na proteine važne su elektrostatske sile između sulfatnih grupa boje i bazičnih aminokiselinskih ostataka u proteinima te hidrofobne interakcije sa ostatcima aromatskih aminokiselina. Koncentracije proteina koje se mjere u uzorcima variraju, stoga je potrebno napraviti standardnu krivulju s poznatim koncentracijama proteina.

Pripreme se razrjeđenja BSA (od eng. *bovine serum albumin*) za standardnu krivulju i slijepa proba (100 μl pufera u kojem su pripremljeni uzorci). Prije mjerenja količine proteina u uzorcima, uzorci se razrijede 10 puta, te se u kivetu dodaje 100 μl razrijeđenog uzorka i 1 ml reagensa Bradford. Nakon inkubacije 5 minuta na sobnoj temperaturi, mjeri se apsorbancija pri 595 nm prema slijepoj probi kojoj je dodan reagens. Standardna krivulja računa se prema

vrijednosti apsorbancije poznatih koncentracija BSA. Koncentracija proteina u uzorku ekstrapolira se iz krivulje, pri čemu se uzima u obzir faktor razrjeđenja uzorka.

3.2.9 ELISA metoda

ELISA (od eng. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) predstavlja preciznu i visoko osjetljivu metodu određivanja kvantifikacije bioloških parametara (npr. protutijela ili antigena). Imunokemijske metode općenito temelje se na četiri osnovne komponente:

- antigenu (protutijelu) koji će biti detektiran
- protutijelu (antigenu) kojim će se detektirati
- metodi separacije nastalog kompleksa antigen-protutijelo od ostalih nevezanih komponenti
- metodi detekcije kompleksa antigen-protutijelo

Učinkovitost metode mjeri se uspješnošću nastanka kompleksa antigen-protutijelo, te sposobnošću detekcije nastalog kompleksa. Tako se imunokemijska reakcija antigena i protutijela može mjeriti apsorbancijom, fluorescencijom ili fluorescencijskom polarizacijom. Mjerenjem apsorbancije spektrofotometrom pri određenoj valnoj duljini, moguće je kvantificirati fosforilaciju peptidnog supstrata. Optimizacija peptidnog supstrata i testiranje reakcijskih uvjeta svakako doprinose optimizaciji testa.

Za određivanje razine fosforilacije p-tau 199 i p-tau 181 korišteni su komercijalno dostupni ELISA kompleti, Human (Hu) Tau [pT181] i Human (Hu) Tau [pS199] proizvođača *Invitrogen Corporation, Camarillo, CA, USA*, koji omogućavaju kvantitativno određivanje koncentracija fosforiliranih tau proteina (pS199 i pT181) iz staničnog lizata. Za provođenje ELISA analize korišten je ELISA čitač (model 680 Series; *Biorad Laboratories, Hercules, USA*) te automatski aparat za ispiranje (model PW 40; *Biorad Laboratories, Hercules, USA*).

ELISA se provodi na mikropločicama (od eng. *microplate*) sa 96 jažica. Na dno jažice veže se primarno monoklonalno protutijelo, na kojeg se nakon dodavanja uzorka veže pS199, odnosno pT181 protein. Na kompleks protutijela i pS199, odnosno pT181 peptida hvata se sekundarno, odnosno detekcijsko protutijelo (Hu [pT181], Hu [pS199]) koje specifično prepoznaje fosforilirani tau protein. Nakon inkubacije od 14 do 18 sati na 4^{o}C aspirira se višak otopine i jažice se ispiru 4 puta puferom za ispiranje. Nakon ispiranja dodaje se 100 µl

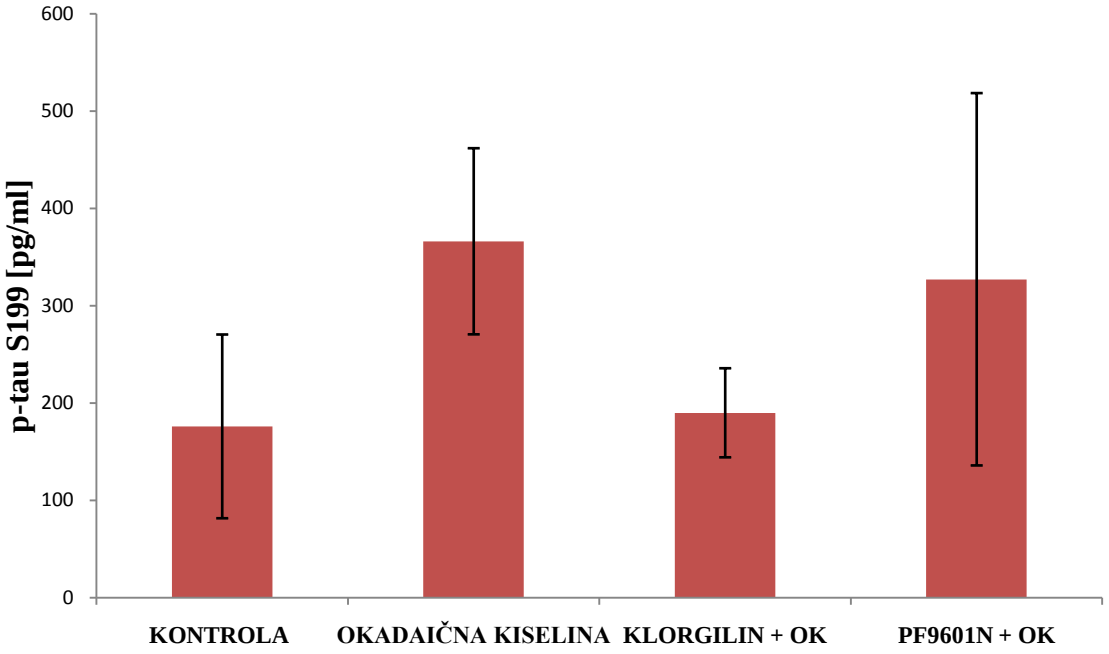
otopine *Anti-rabbit IgG* (HRP) u sve jažice. Nakon inkubacije od 30 minuta na sobnoj temperaturi, jažice se ispiru 4 puta puferom za ispiranje, te se dodaje 100 µl stabilizacijskog kromogena koji oboji otopinu supstrata u plavo. Nakon inkubacije od 30 min na sobnoj temperaturi u mraku dodaje se 100 µl stop otopine koja mijenja boju otopine u žuto. Nakon toga očitava se apsorbancija uzoraka na ELISA čitaču, te se prema koncentracijama standarda određuje koncentracija pT181 i pS199 u pojedinim jažicama.

3.3 Statistička analiza

Za statističku analizu korišten je IBM SPSS Statistics 19 (*IBM, Sjedinjene Američke Države*). Statističke razlike između skupina analizirane se Studentovim *t* testom pri čemu je razina značajnosti bila podešena na p=0,05. Svi rezultati izraženi su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

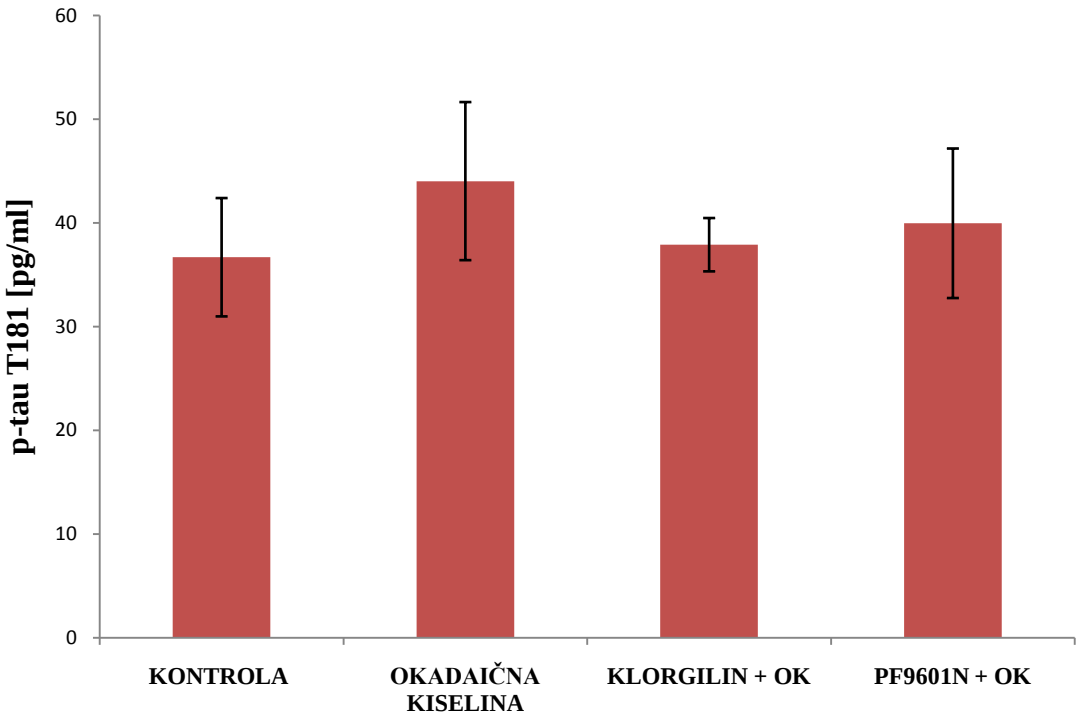
4. REZULTATI

Studentovim t-testom je dokazano da je razina p-tau S199 bila statistički značajno niža u kontrolnim neuroblastomskim SH-SY5Y stanicama u odnosu na stanice tretirane okadaičnom kiselinom (t=2.452, df=4, **p=0.035**). Predtretman SH-SY5Y stanica klorgilinom značajno je smanjio razinu fosforilacije na epitopu S199 (t=2.879, df=4, **p=0.023**), dok predtretman sa PF9601N nije značajno utjecao na razinu p-tau S199 (t=0.316, df=4, p=0.384). Nije bilo značajne razlike u razini p-tau S199 između SH-SY5Y stanica tretiranih sa klorgilinom i sa PF9601N (t=1.208, df=4, p=0.147). Razina p-tau S199 na kontrolnim SH-SY5Y stanicama, stanicama tretiranim okadaičnom kiselinom, stanicama predtretiranim klorgilinom i sa PF9601N 1h, te tretiranim okadaičnom kiselinom 24h je prikazana na **slici 4.1.**



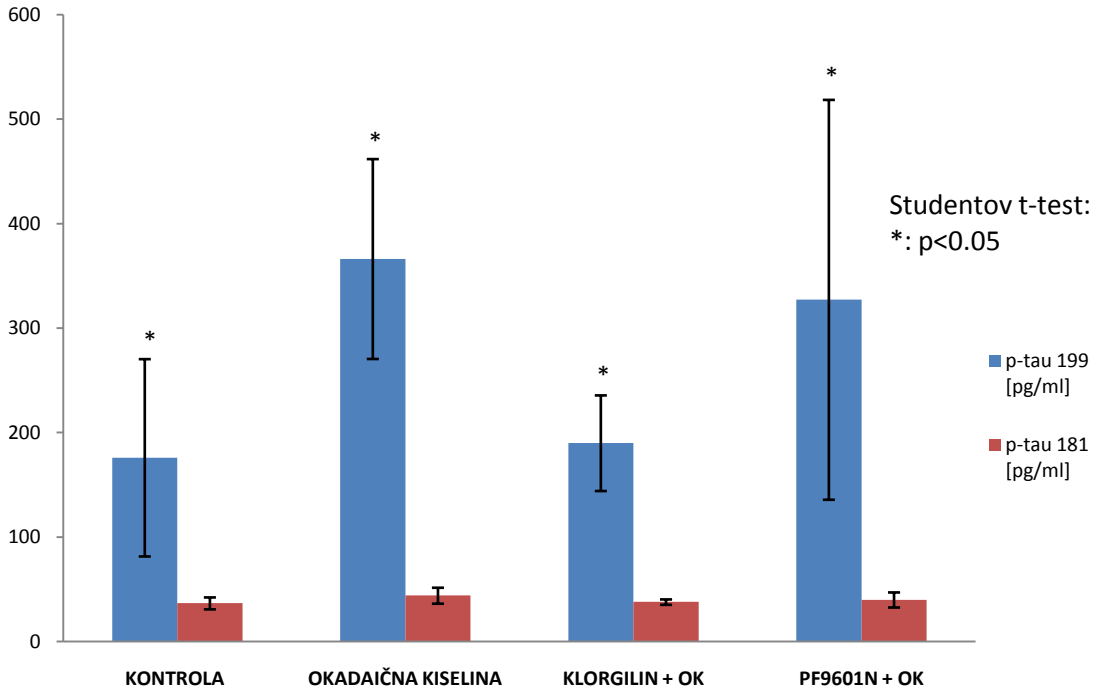
Slika 4.1. *Razina fosforilacije tau proteina na epitopu S199 u kontrolnim SH-SY5Y stanicama, stanicama tretiranim okadaičnom kiselinom (OK), stanicama predtretiranim klorgilinom i sa PF9601N 1h, te tretiranim OK 24h.*

Nije dokazana statistički značajna razlika u razini p-tau T181 između kontrolnih SH-SY5Y stanica i stanica tretiranih okadaičnom kiselinom (t=1.335, df=4, p=0.126). Ni predtretman klorgilinom (t=1.320, df=4, p=0.129) niti sa PF9601N (t=0.672, df=4, p=0.269) nije značajno utjecao na fosforilaciju tau proteina na epitopu T181. Nije bilo značajne razlike u razini p-tau T181 između SH-SY5Y stanica tretiranih sa klorgilinom i sa PF9601N (t=0.466, df=4, p=0.333). Razina p-tau T181 na kontrolnim SH-SY5Y stanicama, stanicama tretiranim okadaičnom kiselinom, stanicama predtretiranim klorgilinom i sa PF9601N 1h, te tretiranim okadaičnom kiselinom 24h je prikazana na **slici 4.2.**



Slika 4.2. *Razina fosforilacije tau proteina na epitopu T181 u kontrolnim SH-SY5Y stanicama, stanicama tretiranim okadaičnom kiselinom (OK), stanicama predtretiranim klorgilinom i sa PF9601N 1h, te tretiranim OK 24h.*

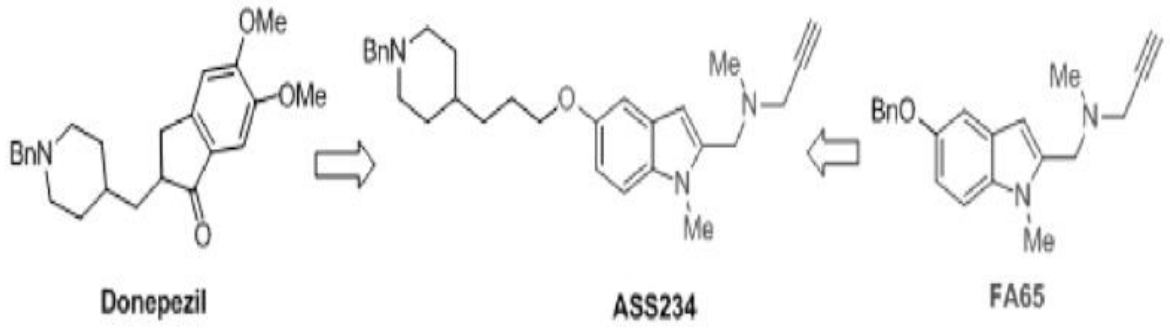
Razina fosforilacije p-tau S199 je bila značajno viša od fosforilacije p-tau T181 za kontrolne SH-SY5Y stanice (t=2.551, df=4, **p=0.032**), SH-SY5Y stanice tretirane okadaičnom kiselinom (t=5.816, df=4, **p=0.002**), klorgilinom (t=5.745, df=4, **p=0.002**) i sa PF9601N (t=2.598, df=4, **p=0.030**) (**slika 4.3**).



slika 4.3. *Usporedba razine fosforilacije p-tau S199 i p-tau T181 unutar istog tretmana SH-SY5Y stanica. Rezultati su prikazani kao M±SD.*

5. RASPRAVA

Bolea i sur. razvili su i patentirali ASS234 *(N-((5-(3-(1-benzilpiperidin-4-il)propoksi)-1-metil-1H-indol-2-il)metil)-N- metilprop-2-in-1-amin)* koji je građen od acetilkolinesteraznog inhibitora donepezila i MAO inhibitora FA65 (*N-((5-benziloksi)-1H-indol-2-il)metil)prop-2-in-1-amina*), derivata PF9601N kako bi se istovremeno pomoću jedne molekule inhibirale kolinesteraze i MAO (**slika 5.1**) (Samadi i sur., 2012; Sanz i sur., 2008). ASS234 uz inhibiciju enzima, inhibira i *in vitro* $A\beta_{1-42}$ agregaciju, sprječava smanjenje antioksidantnih enzima katalaze i superoksidaze-1 te ima mogućnost prolaska kroz krvno-moždanu barijeru (Bolea i sur., 2014).



Slika 5.1. *Strategija dizajna koja je vodila do sinteze multifunkcionalne molekule ASS234 (preuzeto iz Bolea i sur., 2013)*

Utjecaj spoja ASS234 na agregaciju i fosforilaciju tau proteina još nije ispitivan. S obzirom da FA65 (dio spoja ASS234) inhibira MAO-A i B, u ovom radu je ispitan učinak na fosforilaciju tau proteina pomoću inhibitora MAO-B (PF9601N) te inhibitora MAO-A (klorgilina) na modelu neuroblastomskih SH-SY5Y stanica.

U nezavisnim pilotskim studijama pokazano je da statistički značajno povišene koncentracije proteina p-tau na epitopu treonin 181 (Vanmechelen i sur., 2000; Schoenknecht i sur., 2003) i serin 199 (Itoh i sur., 2001), ukazuju na razvoj AB (Blennow i sur., 2001; Blennow i Hampel, 2003). Prema rezultatima ovog istraživanja, tretman neuroblastomskih SH-SY5Y stanica klorgilinom značajno smanjuje razinu fosforilacije tau proteina na epitopu S199. Međutim, predtretman klorgilinom ne pokazuje smanjenje fosforilacije tau proteina na epitopu T181. U

istraživanjima je pokazano da je klorgilin selektivan za MAO-A i tvori adukt s N5 atomom prstena flavina, te kronično liječenje s navedenim inhibitorom dovodi do inhibicije veće od 85%, čime se smanjuje razgradnja neurotransmitera metaboliziranim sa MAO-A (serotonin, noradrenalin, dopamin) (Arnett i sur., 1987). Klorgilin, kao selektivan inhibitor MAO-A često je korišten u *in vivo* istraživanjima AB (Magyar, 2011), međutim do sada nije istražena njegova uloga u fosforilaciji proteina tau. Nije poznato da li MAO-A može utjecati na fosforilaciju tau proteina i da li inhibicija MAO-A klorgilinom može utjecati na fosforilaciju tau. Inhibicija MAO-A prvenstveno utječe na neutrotransmitere važne za razvoj depresije i poremećaja anksioznosti.

Inhibitori MAO-A osim što povećavaju neurotransmisiju amina, smanjuju stvaranje neurotoksičnih produkata, kao vodikovog peroksida i aldehida koji potiču stvaranje reaktivnih kisikovih radikala i tako dovode do mogućeg oštećenja neurona (De Colibus i sur., 2005; Fowler i Tipton, 1984). Većina MAO inhibitornih lijekova koja se trenutno koriste su ireverzibilni inhibitori, kao $_{L}$-deprenil koji je selektivan za MAO-B i stvara adukt sa N5 atomom prstena flavina (Binda i sur., 2002). On inhibira degradaciju dopamina u mozgu i koristi se kao lijek za Parkinsonovu bolest. Također kao neuroprotektivan agens, on se koristi već godinama za usporavanje procesa neurodegenerativnih bolesti, a u nekim je kliničkim istraživanjima ublažio simptome AB. On smanjuje stvaranje slobodnih radikala nastalih metaboliziranjem dopamina inhibicijom MAO-B. Također je pokazano da može regulirati procesiranje APP-a preko protein kinaza C (PKC) signalnog puta i signalnog puta mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK), što objašnjava njegov klinički efekt u kasnoj fazi AB (Naoi i sur., 2015).

Aktivnost MAO-B povećava se s starenjem što dovodi do povećanog stvaranja vodikovog peroksida. U AB povećana je aktivnost MAO-B u središnjem živčanom sustavu (Andersen, 2004; King i sur., 2006). Oksidativan stres može biti odgovoran za štetne kovalentne modifikacije tau, kao stvaranje intermolekulskih disulfidnih mostova i nitraciju tirozina. Te modifikacije mogu dovesti do hiperfosforilacije i agregacije i tako doprinijeti oslobađanju tau od MT i stvaranju agregata. Iako je često oksidativni stres smatran uzvodnim događajem u odnosu na tau patologiju, nedavna istraživanja pokazala su da tau može interferirati sa funkcijom mitohondrija i potaknuti oksidativan stres (David i sur., 2005; Revett i sur., 2012).

MAO-B inhibitor rasagilin, bifunkcionalna je molekula koja također ima i aktivnost inhibicije AchE. Budući da regulira procesiranje APP-a, aktivira PKC i MAPK signalne puteve, inhibira staničnu smrt i regulira neurotrofičke faktore, ima terapijski potencijal u liječenju AB, međutim nisu još objavljeni podatci kliničkih istraživanja. Ladostigil je acetilkolin-butirilkolinesterazni inhibitor i inhibitor monoaminooskidaze A i B u mozgu, sa niskom inhibicijom MAO u jetri. Također regulira procesiranje APP-a, aktivira PKC i MAPK (Weinreb i sur., 2012).

Tretiranje neuroblastomskih SH-SY5Y stanica PF9601N spojem nije utjecalo na fosforilaciju proteina tau na epitopu treonin 181 i serin 199. PF9601N je neamfetaminski tip MAO-B inhibitora za kojeg je *in vitro* pokazano da ima neuroprotektivna svojstva kod Parkinsonove bolesti (Sanz i sur., 2008) ali i neuroprotektivna svojstva na *in vivo* modelima (Cutillas i sur., 2002; Pérez i Unzeta., 2003; Pérez i sur., 2003; Battaglia i sur., 2006).Također pokazano je da je PF9601N selektivan inhibitor MAO-B (Perez i sur., 1999). U nekoliko *in vivo* modela Parkinsonove bolesti, PF9601N je djelovao kao neuroprotektivan agens, međutim neuroprotektivna svojstva nezavisna su od inhibicije MAO-B (Perez i Unzeta, 2003).

Mnogi procesi i putevi su opaženi u osoba oboljelih od AB, dolazi do akumulacije i agregacije Aβ, hiperfosforilacije tau, kolinergičke hipofunkcije i poremećaja u funkciji mitohondrija i oksidativnog stresa. Ti procesi i putevi se preklapaju i utječu jedan na drugog u patogenezi AB što čini težim shvaćanje staničnih mehanizama neurodegeneracije (Šimić i sur., 2014).

Zbog razočaravajućih rezultata nasumičnih kliničkih istraživanja mora se preispitati pristup liječenja AB koji je često prema hipotezi jedan protein, jedan lijek, jedna bolest. Istraživani lijekovi usmjeravani su na samo jedan cilj koji je povezan sa jednim patogenim putem povezanim s razvojem AB.

Budući da je istraživanje AB pokazalo samo neke uspjehe u simptomatskom liječenju, a mnoge neuspjehe za lijekove koji imaju potencijal modulacije bolesti, teško je procijeniti koliko smo blizu uspješnog liječenja AB. Do sada provedena nasumična klinička istraživanja nisu u skladu sa prijašnjim optimističnim predviđanjima za velikim otkrićem lijeka za AB.
AB (Lansbury, 2004).

6. ZAKLJUČAK

Na temelju retultata ovog istraživanja možemo zaključiti da:

- klorgilin smanjuje fosforilaciju tau proteina na epitopu S199 u neuroblastomskim SH-SY5Y stanicama. Utjecaj na fosforilaciju na epitopu T181 nije uočen

- utjecaj PF9601N na fosforilaciju tau proteina nije uočen u neuroblastomskim SH-SY5Y stanicama

- dobiveni rezultati pridonose razumijevanju potencijalnog terapijskog učinka inhibitora MAO-A i MAO-B u AB, no za potpuniju sliku potrebno je provesti daljnja istraživanja utjecaja klorgilina na fosforilaciju tau proteina i na drugim epitopima, posebice Ser202/Thr205 i Ser396/Ser404

7. LITERATURA

Aisen P., Gauthier S., Ferris S. i sur. (2009): A phase III, placebo-controlled, double-blind, randomized trial of tramiprosate in the clinical management of patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease (the Alphase study). *61 st American Academy of Neurology annual meeting; Seattle, WA, USA*

Alonso A.C., Zaidi T., Grundke-Iqbal I., Iqbal K. (1994): Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 5562-6.

Alonso A.D., Mederlyova A., Novak M., Grundke-Iqbal I., Iqbal K. J. (2004): Promotion of hyperphosphorylation by frontotemporal dementia tau mutations. *Biol. Chem*. 279: 34873–34881.

American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (IV-TR). 4. izd. Washington DC: American Psychiatric Publishing Inc; 2000.

Amijee H., Scopes D.I. (2009): The quest for small molecules as amyloid inhibiting therapies for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 17:33–47.

Andersen J.K. (2004): Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med* 10: 18-25.

Andreasen N., Sjorgen M., Blennow K. (2003): CSF markers for Alzheimer's disease: total tau, phospho - tau and AB42. *World Journal of Biological Psychiatry* 4: 147-155.

Arnett C.D., Fowler J.S., Macgregor R.R., Schlyer D.J., Wolf A.P., Langstrom B., Halldin C. (1987): Turnover of brain monoamine-oxidase measured in vivo by positron emission tomography using L-[C-11]deprenyl. *J. Neurochem.* 49: 522–527.

Babić M., Švob Štrac D., Mück-Šeler D., Pivac N., Šimić G.(2014): Pathogenesis and early diagnosis of Alzheimer's disease: involvement of the monoaminergic system. *Xjenza* 2(2):78-81.

Battaglia V., Sanz E., Salvi M., Unzeta M., Toninello A. (2006): Protective effect of PF9601N on mitochondrial permeability transition pore. *Cell Mol Life Sci* 63: 1440-1448

Baulac S., LaVoie M. J., Kimberly W. T., Strahle J., Wolfe M. S.,Selkoe D. J. i sur. (2003): Functional gamma-secretase complexassembly in Golgi/trans-Golgi network: interacti onsamong presenilin, nicastrin, Aph1, Pen-2, and gamma-secretasesubstrates. *Neurobiol Dis* 14: 194-204.

Binda C., Newton-Vinson P., Hubalek F., Edmondson D.E., Mattevi A. (2002): Structure of human monoamine oxidase B, a drug target for the treatment of neurological disorders. *Nat. Struct. Biol.* 9: 22–26.

Blennow K., Hampel H. (2003): CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 2: 605- 613.

Blennow K., Vanmechelen E., Hampel H. (2001): CSF total tau, Ab42 and phosphorylated tau protein as biomarkers for Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol.* 24: 87-97.

Blennow K., de Leon M. J., Zetterberg H. (2006): Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology* 368: 387–403.

Blennow K., Wallin A., Gottfries C.G. (1991): Presence of parietal lobe symptomatology distinguishes early and late onset Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiat* 6: 147–54.

Blessed G., Tomlinson B. E., Roth M. (1968): The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects. *Br J Psychiatry* 114: 797–811.

Bolea I., Gella A., Monjas L., Pérez C., Rodríguez-Franco M.I., Marco-Contelles J.L., Samadi A., Unzeta M. (2014): The multipotent, permeable drug ASS234 inhibits Aβ aggregation, possesses antioxidant properties and protects from Aβ-induced apoptosis. *Curr. Alzheimer Res.* (u tisku).

Bolea I., Juarez-Jimenez J., de los Rios C., Chioua M., Pouplana R., Javier Luque F., Unzeta M., Marco-Contelles J., Samadi A. (2011): Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of donepezil and N-[(5-(benzyloxy)-1-methyl-1H-indol-2-yl)methyl]-N-methylprop-2-yn-1-amine hybrids as new multipotent cholinesterase/monoamine oxidase inhibitors for the treatment of Alzheimer's Disease. *J. Med.Chem.* 54: 8251–8270.

Bolognesi M.L., Matera R., Minarini A., Rosini M., Melchiorre C. (2009): Alzheimer's disease: new approaches to drug discovery. *Curr Opin Chem Biol*. 13: 303–08.

Buee L., Bussiere T., Buee - Scherrer V., Delacourte A., Hof P. R. (2000): Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neruodegenerative disorders. *Brain Research* Reviews 33: 95-130.

Chen X., Walker D.G., Schmidt A.M., Arancio O., Lue L.F., Yan S.D. (2007): RAGE: a potential target for Abeta-mediated cellular perturbation in Alzheimer's disease. *Curr Mol Med*. 7: 735-742.

Corder E. H, Saunders A. M., Strittmatter W. J., Schmechel D. E.,Gaskell P. C., Small G. W. i sur. (1993): Gene dose of apolipoproteinE type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in lateonset families. *Science* 261: 921-3.

Cramer P.E., Cirrito J.R., Wesson D.W. (2012): ApoE-directed therapeutics rapidly clear β-amyloid and reverse deficits in AD mouse models. *Science* 335: 1503-1506.

Cutillas B., Ambrosio S., Unzeta M. (2002): Neuroprotective effect of the monoamine oxidase inhibitor PF9601N on rat nigral neurons after 6-hydroxydopamine-striatal lesion. *Neurosci Letters* 329: 165-168

David D.C., Hauptmann S., Scherping I., Schuessel K., Keil U., Rizzu P., Ravid R.,Drose S., Brandt U., Muller W.E., (2005): Proteomic and functional analyses reveal a mitochondrial dysfunction in P301L tau transgenic mice.*J Biol Chem*, 280:23802–23814.

De Colibus L., Li M., Binda C., Lustig A., Edmondson D.E., Mattevi A. (2005): Three-dimensional structure of human monoamine oxidase A (MAO-A): relation to the structures of rat MAO-A and human MAO-B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 12684–12689.

Dodel R.C., Du Y., Depboylu C., i sur. (2004): Intravenous immunoglobulins containing antibodies against beta-amyloid for the treatment of Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75: 1472–74.

Farrer L. A., Cupples L. A., Haines J. L., Hyman B., Kukull W. A., Mayeux R. i sur. (1997): Effects of age, sex, and ethnicity on the associati between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease: a meta-analysis. *The Journal of the American Medical Association* 278: 1349-56.

Ferri C. P., Prince M., Brayne C., i sur. (2005):Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study.The *Lancet Neurology* 366: 2112-17.

Fisher A. (2008): M1 muscarinic agonists target major hallmarks of Alzheimer's disease—the pivotal role of brain M1 receptors. *Neurodegener Dis* 5: 237–40.

Fowler C.J., Tipton K.F. (1984): On the substrate specificities of 2 forms of monoamine oxidase. *J. Pharm. Pharmacol*. 36: 111–115.

Francis P.T., Palmer A.M., Snape M., Wilcock G.K. (1999):The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66: 137-147.

Esteban G. i sur. (2014): Kinetic and structural analysis of the irreversible inhibition of humanmonoamine oxidases by ASS234, a multi-target compound designed foruse in Alzheimer's disease. Biochim. Biophys. Acta, u tisku

Gandy S. (2005): The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease. *The Journal of Clinical Investigation* 115: 1121-1129.

Geldenhuys W.J., Van der Schyf C.J. (2013): Rationally designed multi-targeted agents against neurodegenerative diseases. *Curr. Med. Chem.* 20: 1662–1672.

Giacobini, E. (2000): Cholinesterase Inhibitors Stabilize Alzheimer's Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 920: 321–327.

Goate A., Chartier-Harlin M. C., Mullan M. (1991): Segregation of a missence mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349: 704-706.

Gong C.X., Liu F., Grundke-Iqbal I., Iqbal K. J. (2005): Post-translational modifications of tau protein in Alzheimer's disease. *Neural Transm*.112: 813–838.

Graeber M. B. i sur. (1997): Rediscovery of the case described by Alois Alzheimer in 1911: historical, histological and molecular genetic analysis. *Neurogenetics* 1: 73- 80.

Greig N.H., Utsuki T., Ingram D.K., Wang Y., Pepeu G., Scali C., Yu Q.S., Mamczarz J., Holloway H. W., Giordano T., Chen D.M., Furukawa K., Sambamurti K., Brossi A., Lahiri D.K. (2005): Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer beta-amyloid peptide in rodent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 17213–17218.

Haass C., Schlossmacher M. G., Hung A. Y., Vigo-Pelfrey C.,Mellon A., Ostaszewski B. L. i sur. (1992): Amyloid beta-peptide isproduced by cultured cells during normal metabolism.*Nature* 359: 322-5.

Haass C., Selkoe D.J. (2007): Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 101–12.

Hanger, D.P., Anderton B.H., Noble W. (2009): Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends in Molecular Medicine* 15: 112-119.

Hardy J., Selkoe D. J. (2002): The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297: 353–6.

Harvey R. J., Skelton-Robinson M., Rossor M. N. (2003): The prevalence and causes of dementi a in people under the age of 65 years. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 74: 1206-9.

Holtzman D. M., Bales K. R., Tenkova T., Fagan A. M., ParsadanianM., Sartorius L. J. i sur. (2000): Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in amouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*U S A 97: 2892-7.

Hope T., Keene J., Fairburn C., McShane R., Jacoby R. (1997): Behavior changes in dementia 1: Point of entry data of prospective study. *Int J Geriatr Psychiatry* 12: 1062-1073.

Hopkins A.L. (2008): Network pharmacology: the next paradigm in drugdiscovery. *Nat Chem Biol* 4: 682–90.

Illenberger S., Zheng-Fischhöfer Q., Preuss U., Stamer K., Baumann K., Trinczek B., Biernat J., Godemann R., Mandelkow E. M., Mandelkow E. (1998): The Endogenous and Cell Cycle-dependent Phosphorylation of tau Protein in Living Cells: Implications for Alzheimer's Disease. *Mol. Biol. Cell* 9: 1495-1512.

Iqbal K., Alonso Adel C., Chen S. i sur. (2005): Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 1739: 198–210.

Itoh N., Arai H., Urakami K., Ishiguro K., Ohno H., Hampel H., Buerger K., Wiltfang J., Otto M., Kretzschmar H., Moeller H.J., Imagawa M., Kohno H., Nakashima K., Kuzuhara S., Sasaki H., Imahori K. (2001): Large-scale, multicenter study of cerebrospinal fluid tau protein phosphorylatedat serine 199 for the antemortem diagnosis of Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 50: 150-156.

Jarrett J. T., Berger E. P., Lansbury P. T. Jr. (1993): The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 32: 4693–7.

Johnson G.V., Stoothoff W.H. (2004): Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *J Cell Sci* 117: 5721-9.

Jovanović Z. (2012): Mehanizmi neurodegeneracije kod Alchajmerove boelsti. *Medicinski Preglednik* 65: 301-307

K. Magyar (2011): The pharmacology of selegiline, Monoamine Oxidases and Their Inhibitors, vol. 100, 65–84.

Kang J., Lemaire H. G., Unterbeck A., . J. M, MastersC. L., Grzeschik K. H. i sur. (1987): The precursor of Alzheimer's diseaseamyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325: 733-6.

Khatoon S., Grundke-Iqbal I., Iqbal K. (1992): Brain levels of microtubule associated protein tau are elevated in Alzheimer's disease brain: a radioimmunoslot-blot assay for nanograms of the protein. *J Neurochem* 59: 750–3.

King M.E., Kan H.M., Baas P.W., Erisir A., Glabe C.G., Bloom G.S. (2006): Tau-dependent microtubule disassembly initiated by prefibrillar beta-amyloid. *J Cell Biol* 175: 541-546.

Knopman D. S., DeKosky S. T., Cummings J. L. i sur. (2001):Practice parameter: diagnosis of dementia (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 56: 1143-53.

Kohnken R., Buerger K., Zinkowski R., Miller C., Kerkman D., DeBernardis J., Shen J., Moeller H.J., Davies P., Hampel H. (2000): Detection of tau phosphorylated at threonine 231 in cerebrospinal fluidof Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett.* 287: 187- 190.

Lammich S., Kojro E., Postina R., Gilbert S., Pfeiffer R., Jasionowski M. i sur. (1999): Constitutive and regulated alpha-secretasecleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein bya disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci* U S A 96: 3922-7.

Lansbury P.T. Jr. (2004): Back to the future: the 'old-fashioned' way to new medications for neurodegeneration. *Nat Med*. 10: 51–57

Levy-Lahad E., Wasco W., Poorkaj P., Romano D. M., OshimaJ., Pettingell W. H. i sur. (1995): Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269: 973-7

Lou Y., Bolon B., Kahn S. (2001): Mice dificient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta - amyloid generation. *Nature Neuroscience* 4: 231-232.

Luchsinger J. A., Mayeux R. (2004): Cardiovascular risk factors and Alzheimer's disease. *Current Atherosclerosis Reports* 6: 261-266.

Lyness S. A., Zarow C., Chui H. C. (2003): Neuron loss in key cholinergic and aminergic nuclei in Alzheimer disease: a meta-analysis. *Neurobiol Aging* 24, 1-23.

Mahy N., Andres N., Andrade C., Saura J. (2000): Age-related changes of MAO-A and -B distribution in human and mouse brain. *Neurobiology* 8: 47–54.

Malnar M., Košiček M., Hećimović S. (2009): Alzheimerova bolest: od molekularnog mehanizma do rane dijagnoze. *Medicina* 45: 234-243.

Mangialasche F., Solomon A., Winblad B., Mecocci P., Kivipelto M. (2010): Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *Lancet Neurol* 9: 702–16.

Masters C. L., Simms G., Weinman N. A., Multhaup G., McDonald B. L., Beyreuther K. (1985): Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 4245–9.

Mawuenyega K.G., Sigurdson W., Ovod V. i sur. (2010): Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science* 330:1774.

Mayeux R. (2003): Epidemiology of neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci* 26: 81–104.

McKhann G., Drachman D., Folstein M., Katzman R., Price D., Stadlan E. M. (1984): Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34: 939-44.

Mortimer J. A., Snowdon D. A., Markesbery W. R. (2003): Head circumference, education and risk of dementia: findings form the Nun Study. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology* 25: 671-679.

Mulder S.D., Veerhuis R., Blankenstein M.A., Nielsen H.M. (2012): The effect of amyloid associated proteins on the expression of genes involved in amyloid-β clearance by adult human astrocytes. *Exp Neurol* 233:373-379.

Naoi M., Riederer P., Maruyama W. (2015):Modulation of monoamine oxidase (MAO) expression in neuropsychiatric disorders: genetic and environmental factors involved in type A MAO expression: *Journal od Neural Transission:*

Nixon R. A., Yuan A. (2011): Cytoskeleton of the nervous. Springer Science, New York

Noble W., Olm V., Takata K., Casey E., Mary O., Meyerson J., Gaynor K., LaFrancois J., Wang L., Kondo T., Davies P., Burns M., Veeranna , Nixon R., Dickson D., Matsuoka Y., Ahlijanian M., Lau L.F., Duff K. (2003): Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo. *Neuron.* 38: 555-565.

Nordberg A. (2006): Mechanisms behind the neuroprotective actions of cholinesterase inhibitors in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 20: 12–18.

Orgogozo J.M., Gilman S., Dartigues J.F., Laurent B., Puel M., Kirby L.C., Jouanny P., Dubois B., Eisner L., Flitman S., Michel B.F., Boada M., Frank A., Hock C. (2003): Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. *Neurology* 61:46-54.

Padurariu M., Ciobica A., Lefter R., Serban I.L., Stefanescu C., Chirita R. (2013): The oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Psychiatr Danub.* 25: 401-9.

Pavlović D. M., Pavlović A. M., Žugić S. (2007): Patogeneza Alchajmerove bolesti. *Vojnosanitetski Pregled* 64: 765-772.

Pecotić Z., Perkov D. (2007): Alzheimerova demencija, dijagnosticiranje, šifriranje i inicijalna terapija, II nadopunjeno izd. Zagreb: Hrvatska udruga za Alzheimerovu bolest.

Pei J.J., Sjogren M., Winblad B. (2008): Neurofi brillary degenerationin Alzheimer's disease: from molecular mechanisms toidentifi cation of drug targets. *Curr Opin Psychiatry* 21: 555–61.

Pérez V., Romera M., Lizcano J.M., Marco J.L., Unzeta M. (2003): Protective effect PF9601N, a novel MAO-B inhibitor, on dopamine-lesioned PC12 cultured cells. *J Pharm Pharmacol* 55: 713-716

Pérez V., Unzeta M. (2003): PF9601N, a new MAO-B inhibitor, attenuates MPTP-induced depletion of striatal dopamine levels in C57/BL6 mice. *Neurochem Int* 42: 221-239

Pickhardt M., Gazova Z., von Bergen M., Khlistunova I., Wang Y., Hascher A., Mandelkow E.M., Biernat J., Mandelkow E. (2005): Anthraquinones inhibit tau aggregation and dissolve Alzheimer's paired helical filaments in vitro and in cells. *J Biol Chem* 280: 3628-3635

Poirier J. (1994): Apolipoprotein E in animal models of CNS injuryand in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 17: 525-30.

Poirier J., Davignon J., Bouthillier D., Kogan S., Bertrand P., Gauthier S. (1993): Apolipoprotein E polymorphism andAlzheimer's disease. *The Lancet Neurology* 342: 697-9.

Postina R., Schroeder A., Dewachter I., Bohl J., Schmitt U., Kojro E., Prinzen C., Endres K., Hiemke C., Blessing M., Flamez P., Dequenne A., Godaux E., van Leuven F., Fahrenholz F. (2004): A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer's disease mouse model.*J Clin Invest* 113:1456-1464.

Revett T.J., Baker G.B., Jhamandas J., Kar S. (2012): Glutamate system, amyloid ss peptides and tau protein: functional interrelationships and relevance toAlzheimer disease pathology. *J Psychiatry Neurosci*, 37:110190.

Rovelet-Lecrux A., Hannequin D., Raux G., i sur. (2006): APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nature Genetics* 38: 24–6.

Samadi A., de los Rios C., Bolea I., Chioua M., Iriepa I., Moraleda I., Bartolini M., Andrisano V., Galvez E., Valderas C., Unzeta M., Marco-Contelles J. (2012): Multipotent MAO and cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: synthesis,pharmacological analysis and molecular modeling of heterocyclic substituted alkyland cycloalkyl propargyl amine. *Eur. J. Med. Chem.* 52: 251–262.

Sanz E., Quintana A., Battaglia V., Toninello A., Hidalgo J., Ambrosio S., Valoti M., Marco J.L., Tipton K.F., Unzeta M. (2008): Anti-apoptotic effect of MAO-B inhibitor PF9601N[N-(2-propynyl)-2-(5-benzyloxy-indolyl) methylamine] is mediated by p53 pathwayinhibition in MPP(+)-treated SH-SY5Y human dopaminergic cells. *J. Neurochem.* 105: 2404–2417.

Schoenknecht P., Pantel J., Hunt A., Volkmann M., Buerger K., Hampel H., Schroeder J. (2003): Levels of total tau and tau protein phosphorylated at threonine 181in patients with incipient and manifest Alzheimer's diesase. *Neurosci Lett.* 339: 172- 174

Selkoe D. J. (2001): Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiological Reviews* 81: 741-766.

Sengupta A., Kabat J., Novak M., Wu Q., Grundke-Iqba I., Iqbal K. i sur. (1998): Maximal inhibition of tau binding to microtubules requires the phosphorylation of tau at both Thr 231 and Ser 262.*Neurobiol. Aging*. 19: 124–524.

Sherrington R., Rogaev E. I., Liang Y., Rogaeva E. A., LevesqueG., Ikeda M. i sur. (1995): Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375: 754-60.

Shih J.C., Chen K., Ridd M.J. (1999): Monoamine oxidase: from genes to behavior. *Ann Rev Neurosci* 22: 197-217

Siemers E.R., Friedrich S., Dean R.A. i sur. (2008): Safety, tolerability and biomarker eff ects of an ABeta monoclonal antibody administered to patients with Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 4: 774.

Solomon A., Kivipelto M. (2009): Cholesterol-modifying strategies for Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother* 9: 695–709.

Sutton A. L. (2011): Alzheimer Disease sourcebook: basic consumer health information about. *Omnigraphics*, Detroit

Šimić G., Babić M., Borovečki F., Hof P.R. (2014): Early failure of the default-mode network and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *CNS Neuroscience and Therapeutic* 20(7):692-698.

Tariot P., Aisen P., Cummings J. i sur. (2009): The ADCS valproateneuroprotection trial: primary effi cacy and safety results. *Alzheimers Dement* 5: 84–85.

Tariot P.N., Aisen P.S. (2009): Can lithium or valproate untie tangles in Alzheimer's disease? *J Clin Psychiatry* 70: 919–21.

Vanmechelen E., Vanderstichele H., Davidsson P., Van Kerschaver E., Van Der Perre B., Sjogren M., Andreasen N., Blennow K. (2000): Quantification of tau phosphorylated at threonine 181 in human cerebrospinalfluid: a sandwich ELISA with a synthetic phosphopeptide for standardization. *Neurosci Lett.* 28: 549- 52.

Venneri A., McGeown W.J., Shanks M.F. (2005): Empirical evidence of neuroprotection by dual cholinesterase inhibition in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 16: 107–110.

Wang D.S., Dickson D.W., Malter J.S. (2006): β-Amyloid Degradation and Alzheimer's Disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 3: 58406.

Weinreb O., Amit T., Bar-Am O., Youdim M.B. (2012): Ladostigil: a novel multimodal neuroprotective drug with cholinesterase and brain-selective monoamine oxidase inhibitory activities for Alzheimer's disease treatment. *Curr Drug Targets* 13: 483-494.

Weyler W., Hsu Y.P.P., Breakefield X.O. (1990): Biochemistry and genetics of monoamineoxidase. *Pharmacol. Ther.* 47: 391–417.

Wilcock D.M., Colton C.A. (2008): Anti-amyloid-beta immunotherapy in Alzheimer's disease: relevance of transgenic mouse studies to clinical trials. *J Alzheimers Dis*. 15: 555–69.

Wimo A., Prince M. (2010): World Alzheimer report 2010: the global economic impact of dementia. *Alzheimer's Disease International* 2: 1-56.

Wolfe M. S., Selkoe D. (1999): Two transmembrane aspartates in PS-1 required for endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* 398: 513-7.

World Health Organization. ICD-10: international statistical classification of diseases and related health problems. 10. izd. Geneva: World Health Organization; 2004.

Xia W., Wong S.T., Hanlon E., Morin P. (2012): γ-Secretase modulator in Alzheimer's disease: shifting the end. *J Alzheimers Dis.* 31: 685-96.

Xu Y., Yan J., Zhou P., Li J., Gao H., Xia Y., Wang Q. (2012): Neurotransmitter receptors and cognitive dysfunction in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 97: 1–13.

Yang H.Q., Sun Z.K., Ba M.W., Xu J., Xing Y. (2009): Involvement of protein trafficking in deprenyl-induced α-secretase activity regulation in PC12 cells. *Eur J Pharmacol* 610:37-41.

Yang H.Q., Xing Y. (2012): Role of neprilysin in the pathogenesis of Alzheimer's disease.*Prog Biochem Biophys*39: 721-725.

Youdim M.B.H., Buccafusco J.J. (2005): Multi-functional drugs for various CNS targets in the treatment of neurodegenerative disorders. *Trends Pharmacol. Sci.* 26: 27–35.

Zotova E., Nicoll J. A., Kalaria R., Holmes C., Boche D. (2010): Inflammation in Alzheimer's disease: relevance to pathogenesis and therapy. *Alzheimer's Research & Therapy* 2: 1

ELEKTRONIČKI IZVORI:

http://neuropathology-web.org/chapter9/chapter9bAD.html

http://www.nia.nih.gov/sites/default/files/02_preclinicalad_lg.jpg

www.cbligand.org/AD/

http://www.lgcstandards-atcc.org/~/media/Attachments/B/D/0/3/1851.ashx

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Čakovcu, 23.10.1988 godine gdje sam završila osnovnoškolsko obrazovanje i srednjoškolsko obrazovanje u Gimaziji Čakovec, jezični smjer.

Sveučilišni preddiplomski studij molekularne biologije upisala sam 2007.godine, te 2012. godine stekla zvanje *Sveučilišni prvostupnik molekularne biologije.*
Sada sam apsolventica sam na Sveučilišnom diplomskom studiju molekularne biologije koji sam upisala 2012 godine.

Dobitnica sam rektorove nagrade za istraživački rad „Regulacija transkripcije gena *MGAT3* u malignim tumorima porijekla epitelnih stanica“ koji sam radila 2014. godine pod vodstvom doc.dr.sc. Petre Korać.

Kao posebna područja interesa istaknula bih rad sa kulturama stanica *in vitro*, farmakologiju, farmakogenomiku te ciljanu antitumorsku terapiju lijekovima.