

# Povezanost kognitivne sposobnosti s glutamatnom i inzulinskom signalizacijom u štakorskom modelu Parkinsonove bolesti

---

Piknjač, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:215842>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-21**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno matematički fakultet  
Biološki odsjek

Marija Piknjač

**Povezanost kognitivne sposobnosti s  
glutamatnom i inzulinskom signalizacijom u  
štakorskom modelu Parkinsonove bolesti**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad je izrađen u laboratoriju za Molekularnu neurofarmakologiju Zavoda za Farmakologiju i Hrvatskog instituta za istraživanje mozga Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom dr.sc. Ane Knezović i suvodstvom doc.dr.sc. Sofie Ane Blažević u sklopu znanstvenog projekta „Mechanisms of nutrient-mediated effects of endogenous glucagone-like peptide -1 on cognitive and metabolic alterations in experimental models of neurodegenerative disorders“ financiranog od Hrvatske zaklade za znanost (šifra projekta HRZZ- IP-2018-01-8938, voditelj projekta prof.dr.sc. Melita Šalković-Petrišić) i kofinanciranog od Znanstvenog centra izvrsnosti za temeljnu, kliničku i translacijsku neuroznanost (EU projekt “Experimental and clinical research of hypoxic-ischemic damage in perinatal and adult brain”; GA KK01.1.1.01.0007; voditelj projekta prof.dr.sc. Miloš Judaš). Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

## ZAHVALE:

*Zahvaljujem se voditeljici dr.sc. Ani Knezović na strpljenju, pomoći, savjetima i vremenu kojeg je žrtvovala u svakom trenutku kako bi mi pomogla u izradi ovog diplomskog rada, te velika hvala za priliku koju mi je pružila. Hvala i suvoditeljici ovog rada, doc.dr.sc. Sofiji Ani Blažević, na savjetima, pomoći i strpljenju.*

*Zahvaljujem se i osoblju Zavoda za farmakologiju Medicinskog fakulteta koje mi je pomoglo sa snalaženjem u laboratorijima, a posebnu zahvalnost dugujem med.lab.teh. Jospiu Paviću, koji mi je pomogao pri izvođenju eksperimenata.*

*Hvala mojoj obitelji i mojem dečku koji su u svakom trenutku bili uz mene i pružali mi podršku tokom cijelog školovanja.*

*Hvala Hrvatskoj zakladi za znanost bez čije financijske pomoći nebi bilo moguće izraditi istraživanja na kojima se temelji ovaj diplomski rad.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

### POVEZANOST KOGNITIVNE SPOSOBNOSTI S GLUTAMATNOM I INZULINSKOM SIGNALIZACIJOM U ŠTAKORSKOM MODELU PARKINSONOVE BOLESTI

Marija Piknjač

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Parkinsonova bolest, osim što se smatra poremećajem kretanja, može se manifestirati i pojavom kognitivnih poremećaja. U nastanak kognitivnog deficita u Alzheimerovoj bolesti uključeni su poremećaji glutamatne i inzulinske signalizacije. Jedan od glavnih ciljeva ovog rada je istražiti kogniciju štakorskog modela Parkinsonove bolesti, te povezanost s glutamatnom i inzulinskom signalizacijom u mozgu, inducirana obostranom intrastrijatalnom primjenom 6-hidroksidopamina. 6-hidroksidopamin je toksin koji se koristi za selektivnu depleciju dopaminergičkih neurona. Tri mjeseca nakon primjene 6-hidroksidopamina provedeni su motorički i kognitivni testovi (test rotirajućeg cilindra, Morrisov test plivanja u labirintu, test pasivnog izbjegavanja), te su životinje bile žrtvovane. U regijama mozga (hipokampus, hipotalamus i strijatum) promatrane su promjene ekspresije proteina uključenih u inzulinsku i glutamatnu signalizaciju, te ekspresija tirozin hidroksilaze imunofluorescencijom, Westernskom metodom otiska i enzimskog testa visoke osjetljivosti (ELISA). Tri mjeseca nakon primjene 6-hidroksidopamina uočen je kognitivni i motorički deficit, dok je ekspresija proteina uključenih u inzulinsku signalizaciju ostala uglavnom nepromijenjena. Uz motorički i kognitivni deficit, uočena je smanjena ekspresija tirozin hidroksilaze, te snižena aktivacija AMPAR-a u hipokampusu i strijatumu, dok su dopaminergičke jezgre u supstanciji nigri ostale očuvane. Rezultati upućuju na moguću povezanost disfunkcije glutamatne signalizacije i kognitivnog deficita u štakorskom modelu Parkinsonove bolesti.

(52 stranice, 15 slika, 64 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: 6-hidroksidopamin, tirozin hidroksilaza, kognitivni deficit, inzulinski signalizacijski put, glutamatni signalizacijski put

Voditelj: Dr.sc. Ana Knezović

Suvoditelj: Doc.dr.sc. Sofija Ana Blažević

Ocjenitelji: 1. Doc.dr.sc. Sofija Ana Blažević

2. Izv.prof.dr.sc. Damjan Franjević

3. Izv.prof.dr.sc. Anamaria Štambuk

Rad prihvaćen: 15.09.2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Division of Biology

Master Thesis

### ASSOCIATION OF COGNITIVE ABILITY WITH GLUTAMATE AND INSULIN SIGNALLING IN A RAT MODEL OF PARKINSON'S DISEASE

Marija Piknjač

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Parkinson's disease, in addition to being considered a motoric disorder, can be manifested by the appearance of cognitive deficit. Glutamate and insulin signalling dysfunction is involved in the development of cognitive deficit in Alzheimer's disease. One of the main goals of this thesis is to investigate cognition in rat model of Parkinson's disease, and its association with brain glutamate and insulin signalling, induced by bilateral intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine (toxin used for the selective depletion of dopaminergic neurons). Three months after 6-hydroxydopamine treatment, animals were subjected to motoric and cognitive tests (RotaRod, Passive avoidance, Morris Water Maze) and later sacrificed. Expression of tyrosine hydroxylase and proteins involved in insulin and glutamate signalling were assessed in hippocampus, hypothalamus and striatum by immunofluorescence, Western blot and ELISA methods. Cognitive and motor deficit was observed three months after the administration of 6-hydroxydopamine, while protein expression involved in insulin signalling remained largely unchanged. Motor and cognitive deficit were observed as well as a decrease in tyrosine hydroxylase expression and AMPAR activation in the hippocampus and striatum, while dopaminergic nuclei in *substantia nigra* were preserved, suggesting a possible association between glutamate signalling dysfunction and cognitive deficit in a rat model of Parkinson's disease.

(52 pages, 15 figures, 64 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: 6-hydroxydopamine, tyrosine hydroxylase, cognitive deficit, insulin signalling pathway, glutamate signalling pathway

Supervisor: Ana Knezović, Ph.D.

Co-supervisor: Asst.prof. Sofia Ana Blažević

Reviewers: 1. Asst. prof. Sofia Ana Blažević  
2. Assoc.prof. Damjan Franjević  
3. Assoc.prof. Anamaria Štambuk

Thesis accepted: 15.09.2021.

## SADRŽAJ:

1. UVOD .....	1
1.1. Parkinsonova bolest .....	1
1.1.1. Patofiziologija Parkinsonove bolesti.....	2
1.1.2. Motorički simptomi Parkinsonove bolesti .....	4
1.1.3. Nemotorički simptomi Parkinsonove bolesti.....	5
1.1.4. Poremećaj inzulinskog i glutamatnog sustava u Parkinsonovoj bolesti.....	6
1.2. Životinjski modeli Parkinsonove bolesti.....	8
1.2.1. 6-hidroksidopamin .....	9
1.2.2. Štakorski model Parkinsonove bolesti izazvan središnjom primjenom 6-hidroksidopamina .....	9
1.2.3. Promjene uzrokovane središnjom primjenom 6-hidroksidopamina.....	10
1.2.4. Kognitivni deficit u štakorskom modelu Parkinsonove bolesti .....	11
2. CILJ RADA .....	12
3. MATERIJALI I METODE .....	13
3.1. Životinje.....	13
3.2. Korišteni reagensi i antitijela .....	13
3.3. Eksperimentalni štakorski model Parkinsonove bolesti.....	14
3.4. Kognitivno i motoričko testiranje .....	15
3.4.1. Test rotirajućeg cilindra ( <i>RotaRod test</i> -RR) .....	16
3.4.2. Morrisov test plivanja u labirintu ( <i>Morris water maze swimming test</i> -MWM).....	16
3.4.3. Test pasivnog izbjegavanja ( <i>Passive avoidance test</i> - PAT) .....	16
3.5. Žrtvovanje životinja.....	17
3.5.1. Homogeniziranje tkiva.....	17
3.5.2. Mjerenje koncentracije proteina .....	18
3.5.3. Analiza Westernskom metodom otiska (Western blot) .....	18
3.5.4. Imunofluorescentna analiza .....	20
3.5.5. Mjerenje koncentracije glutamata i inzulina.....	20
3.6. Statistička analiza.....	21
4. REZULTATI.....	22
4.1. Motoričke i kognitivne promjene.....	22
4.1.1. Test rotirajućeg cilindra ( <i>RotaRod</i> ) i test pasivnog izbjegavanja ( <i>Passive avoidance test</i> ).....	22

4.1.2. Morrisov test plivanja u labirintu ( <i>Morris water maze swimming test</i> - MWM).....	23
4.2. Koncentracija inzulina u hipokampusu, hipotalamusu i strijatumu .....	27
4.3. Koncentracija glutamata u hipotalamusu .....	28
4.4. Ekspresije proteina inzulinskoga i glutamatnoga signalnoga puta, te tirozin hidroksilaze u hipokampusu.....	29
4.5. Ekspresije proteina inzulinskoga i glutamatnoga signalnoga puta, te tirozin hidroksilaze u hipotalamusu.....	32
4.6. Ekspresije proteina inzulinskoga i glutamatnoga signalnoga puta, te tirozin hidroksilaze u strijatumu .....	35
4.7. Imunofluorescencijska analiza tirozin hidroksilaze (TH) u mozgu štakorskog modela Parkinsonove bolesti .....	38
4.7.1. Ekspresija tirozin hidroksilaze u parijetalnom korteksu i hipokampusu.....	38
4.7.2. Ekspresija tirozin hidroksilaze u supstanciji nigri .....	40
5. RASPRAVA .....	41
6. ZAKLJUČCI.....	45
7. LITERATURA .....	46
8. ŽIVOTOPIS .....	52



## KRATICE

**6-OHDA:** 6-hidroksidopamin

**AKT:** protein kinaza B

**AMPAR:** receptor za  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionska kiselina

**CTRint:** intaktna kontrolna skupina

**CTRis:** kontrolna skupina s intrastrijatalno primjenjenim otapalom

**CTX:** parijetalni korteks

**DAPI:** 4',6-diamidino-2-fenilindol dihidroklorid

**DNA:** deoksiribonukleinska kiselina (eng. *Deoxyribonucleic acid*)

**DTT:** ditioneitol

**EDTA:** Etilendiamintetraoctena kiselina

**ELISA:** imunoenzimski test visoke osjetljivosti (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

**ERK:** izvanstaničnim signalom regulirana kinaza (eng. *Extracellural signal- rugulated kinase*)

**GABA:** Gama-aminomaslačna kiselina (eng. *Gamma amynobutric acid*)

**GSK-3 $\alpha$ :** glikogen sintaza kinaza -3 $\alpha$

**GSK-3 $\beta$ :** glikogen sintaze kinaze -3 $\beta$

**HPC:** hipokampus

**HPT:** hipotalamus

**IR:** inzulin receptor

**IRM:** inzulinska rezistencija u mozgu

**IRS:** supstrat inzulinskog receptora

**KAR:** kainatni receptori

**LSWB** - pufer za ispiranje s niskom koncentracijom soli (eng. *Low-salt washing buffer*)

**MAO-B:** monoaminooksidaza – B

**MFB:** medijalni snop prednjeg mozga (eng. *Medial forebrain bundle*)

**MPP+:** 1-metil-4-fenilpiridin

**MPTP:** 1-metil,1-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin

**MWM:** Morrisov test plivanja u labirintu (eng. *Morris water maze*)

**NGS:** kozji serum (eng. *Normal goat serum*)

**NMDAR:** receptor za N-metil-D-asparaginsku kiselinu

**PAT:** test pasivnog izbjegavanja (eng. *Passive avoidance test*)

**PB:** Parkinsonova bolest

**PBS:** puferirana otopina fosfatnih soli (eng. *Phosphate buffer saline*)

**PFA:** paraformaldehid

**PI3K:** fosfatidil-inozitol-3-kinaza

**RR:** test rotirajućeg cilindra (eng. *RotaRod*)

**S:** strijatum

**SAD:** Sjedinjene američke države

**SDS:** natrijev dodecil sulfat

**SEM:** standardna pogreška (eng. *standard error of the mean*)

**SNpc:** *substantia nigra pars compacta*

**SŽS:** središnji živčani sustav

**TH:** tirozin hidroksilaza

**VTA:** ventralno – tagmentalno područje

**WB:** Westernska metoda otiska (eng. *Western blot*)

## 1. UVOD

Parkinsonova bolest (PB) je drugi najčešći neurodegenerativni poremećaj povezan sa starenjem nakon Alzheimerove bolesti, te se procjenjuje da 7 do 10 milijuna ljudi u svijetu boluje od ove bolesti. Parkinsonova bolest se više ne smatra čistim poremećajem kretanja već se može manifestirati i demencijom. Približno 20-40% bolesnika s PB-om pate od kognitivnih poremećaja u ranoj fazi, a više od 75-80% njih će u konačnici razviti demenciju, čineći PB trećim najčešćim oblikom demencije (Aarsland i sur, 2001). Stoga, učinkovito liječenje radi ublažavanja ne samo socijalnih i osobnih tegoba bolesnika s neurodegenerativnim poremećajima već i zdravstvenih troškova, predstavlja hitan globalni prioritet. Trenutačno se ne zna u potpunosti pozadina nastanka demencije u bolesnika s Parkinsonovom bolesti, no posljednja istraživanja ukazuju na moguću povezanost inzulinske rezistencije u mozgu s razvojem demencije i kod PB-a (Hölscher, 2020). Istraživanja sugeriraju da bi dijabetes tipa 2 i PB mogli imati zajednički patološki mehanizam, te prisutnost dijabetesa povećava rizik za razvoj PB-a za 40%. Kao i kod Alzheimerove bolesti postoji mogućnost da je u razvoj demencije uključena i glutamatna ekscitotoksičnost, koja je primijećena i kod bolesnika s PB-om (Athauda i Foltynie, 2016). No, nažalost, nije moguće otkriti uzrok nastanka demencije u ljudi nego se ona dijagnosticira u već uznapredovalom stadiju, te je zbog toga potrebno sve veću pažnju posvetiti proučavanju ranih simptoma bolesti te eksperimentalnom dizajnu prekliničkih studija i životinjskih modela koji se koriste za ispitivanje lijekova/terapija i ne-motoričkih simptoma u PB-u, kako bi se poboljšao prijenos rezultata sa životinje na čovjeka.

### 1.1 Parkinsonova bolest

Parkinsonova bolest (PB) predstavlja idiopatski, sporoprogresivni degenerativni poremećaj središnjeg živčanog sustava (SŽS) koji se manifestira sporošću i siromaštvom pokreta, mišićnim rigiditetom, tremorom u mirovanju i nestabilnošću pri održavanju položaja tijela. Istraživanja su procijenila da Parkinsonova bolest zahvaća najmanje 1% populacije ljudi iznad 60 godina. Poremećaj je dobio ime po engleskom liječniku Jamesu Parkinsonu, koji je prvi detaljno opisao bolest u publikaciji *An Essay on the Shaking Palsy*, 1817. godine (Schapira i Jenner, 2011).

PB se povezuje s propadanjem dopaminergičkih neurona u regiji srednjeg mozga zvanom *substantia nigra*, a osim propadanja neurona, dolazi do pojave Lewyevih tjelešaca u navedenoj regiji mozga. Lewyeva tjelešca predstavljaju stanične inkluzije proteina alfa-sinukleina, neurofilamenata i ubikvintina, te se smatraju glavnim uzročnicima demencije u pacijenata s neurodegenerativnim poremećajima, iako još uvijek nije u potpunosti jasno jesu li Lewyeva tjelešca uzrok ili posljedica bolesti. Iako PB u početnim stadijima sporo napreduje, iznimno je progresivna bolest (Cookson, 2009). Jedan od prvih simptoma koji se uočava u ranoj fazi je tremor ili drhtavica – nevoljno, ritmično, izmjenjivo ili oscilatorno pokretanje međusobno nepovezanih skupina mišića - koji se u kasnijim stadijima povezuje s bradikinezijom i rigiditetom. Tijekom vremena, poznavanje i razumijevanje etiologije PB-a se značajno promijenilo na bolje. Gubitak pigmenta u regiji srednjeg mozga zvanom *substantia nigra*, nakon obdukcije preminulog pacijenta s PB-om, uočen je prvi puta 1919. godine, a 1950. istraživanja su pokazala da su spomenuti pigmentirani neuroni koji propadaju zapravo dopaminergički te gubitak dopamina u subkortikalnim moždanim reznjevima predstavlja uzrok poremećaja motorike (Fahn, 2008).

Uzrok PB-a često se povezuje s upotrebom pesticida, herbicida, izlaganju otrovnim spojevima koji su produkti raznih industrija. Pojedinci su razvili simptome parkinsonizma nakon injekcije 1-metil,1-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), molekule koja se akumulira u mitohondrijima i uzrokuje oštećenja (Langston, 1985). Postoje i istraživanja koja sugeriraju da oksidacija i nastanak slobodnih radikala može biti uzrok oštećenjima kod pacijenata s PB-om (Kumar i sur, 2012). Također, PB može biti i genetski uvjetovan, a rizik za razvijanje bolesti veći je kod ljudi čiji su članovi obitelji oboljeli od Parkinsonove bolesti.

### **1.1.1. Patofiziologija Parkinsonove bolesti**

Parkinsonova bolest je poremećaj bazalnih ganglija, a oni se sastoje od mnogih jezgri. Bazalni gangliji uključuju strijatum (*nucleus caudatus* i putamen), *globus pallidus externus* i *globus pallidus internus*, subtalamičku jezgru, supstanciju nigru (*pars compacta* i *pars reticulata*), *nucleus accumbens* te intralaminarne jezgre talamusa (Lanciego i sur, 2012). Tijekom normalnog starenja, javlja se mala, ali spora dopaminergička degeneracija bez ikakvih motoričkih simptoma. Idiopatski PB, nepoznatog je podrijetla, ali smatra se da se razvija postupno, s polaganom degeneracijom dopaminergičnih neurona što dovodi do klasičnih motoričkih simptoma PB-a u kasnijoj životnoj dobi (Ramsden i sur, 2001).

Degeneracija dopaminergičkih neurona očituje se u dijelu supstancije nigre koji se naziva *pars compacta* (SNpc). Značajno je da gubitak dopamina u SNpc povećava ukupni ekscitacijski put u bazalnim ganglijima, remeti voljnu motoričku kontrolu i uzrokuje karakteristične simptome PB-a. Kako bolest zalazi u kasnije stadije, degeneracija dopamina dovodi do daljnjih promjena na neuralnim putevima u bazalnim ganglijima, uključujući promijenjenu funkciju drugih neurotransmitera bazalnih ganglija poput glutamata, GABA (Gama-aminomaslačna kiselina, eng. *Gamma aminobutyric acid*) i serotonina. Čini se da dopaminergičku degeneraciju uzrokuje više faktora - na nju utječu i endogeni i okolišni elementi. Upala i imunološki odgovori sve se više smatraju važnim posrednicima dopaminergičke degeneracije (Deumens i sur, 2002).

Parkinsonova bolest se više ne smatra samo poremećajem kretanja, već se može manifestirati i demencijom. Smatra se da su Lewyjeva tjelešca glavni uzrok demencije kod PB-a, iako to nije u potpunosti dokazano. Lewyjeva patologija obuhvaća mnoga područja mozga, a neka izvješća sugeriraju da supstancija nigra nije prvo mjesto na kojem se Lewyjeva tjelešca formiraju kod Parkinsonove bolesti. Ove stanične inkluzije vjerojatno predstavljaju završnu fazu kaskade složenih događaja. Također su prisutne u poremećaju poznatijem kao "demencija s Lewyjevim tjelešcima", što sugerira da su ta stanja međusobno povezana zajedničkom patologijom, a možda i zajedničkom etiologijom. Niti gubitak živčanih stanica, ni stvaranje Lewyjevih tjelešaca nisu apsolutno specifični za PB, ali oba su potrebna za *post mortem* dijagnozu bolesti (Cookson, 2009).

Parkinsonizam, poznat i kao (sekundarni) Parkinsonov sindrom neurološki je sindrom u kojem pacijent pokazuje neke od simptoma povezanih s Parkinsonovom bolešću poput tremora, rigiditeta, bradikinezije i posturalne nestabilnosti. Ali parkinsonizam ne predstavlja Parkinsonovu bolest niti se smatra da je parkinsonizam uzrokovan Parkinsonovom bolešću, a pacijenti obično slabo reagiraju na farmakološku intervenciju. Neki poznati uzroci parkinsonizma su izloženost toksinima, metamfetaminu, traumi, drugim poremećajima živčanog sustava ili bolestima živčanog sustava. Formiranje staničnih inkluzija poput Lewyjevih tjelešaca nije uočeno u parkinsonizmu (Galvan i Wichmann, 2008).

### 1.1.2. Motorički simptomi Parkinsonove bolesti

Kod Parkinsonove bolesti, gubitak dopaminergičnih neurona u supstanciji nigri utječe na sposobnost bazalnih ganglija da koordiniraju inhibicijske i ekscitacijske signale motoričkih neurona. Zbog toga dolazi do hipokinezije - smanjene motoričke funkcije ili aktivnosti i umanjene sposobnosti kretanja. Jedan od prvih vidljivih motoričkih simptoma koji se pojavljuju kod PB-a je tremor. Tremor obično započinje u jednoj strani tijela (često u jednoj ruci ili jednoj nozi) frekvencijom podrhtavanja od 3-7 Hz. Tremor se smatra jednim od glavnih simptoma Parkinsonove bolesti, a neke studije navode da je prisutan u do 80% bolesnika s dijagnozom PB-a. Rigiditet (ukočenost) je još jedan uobičajeni vidljivi motorički simptom povezan s PB-om. Rigiditet je povišeni tonus miškulature u proksimalnim i distalnim, agonističkim i antagonističkim mišićima, cijelom dužinom pokreta. Bolesnici kod kojih se razvije ukočenost zauzimaju tipičan položaj tijela – semiflektirani trup s nogama savijenim u koljenima i rukama u laktovima (Dovzhenok i Rubchinsky, 2012).

Bradikinezija, još jedna glavna motorička značajka PB-a, nepoznatog je uzroka i ostaje predmet rasprave. Bradikinezija označava usporenu, spontanu motoriku pri kojoj su pokreti i započinjanje pokreta usporeni, te je smanjena amplituda pokreta. Jedna od hipoteza sugerira da je bradikinezija kompenzacijski odgovor, namijenjen usporavanju voljnih pokreta i poboljšanju točnosti pokreta. Druga hipoteza sugerira da je bradikinezija uzrokovana deficitom u proizvodnji sile. Teorija deficita proizvodnje sile osporena je studijama koje pokazuju da su osobe s PB-om sposobne postići odgovarajuće kontrakcije mišića na neurofiziološkim testovima. Neki istraživači sugeriraju da bradikinezija nije samo manifestacija motoričke usporenosti (brzine kretanja i pokretanja), već može odražavati specifični neuralni deficit koji potječe iz striatuma (Shiner i sur, 2012).

Mnogi pacijenti s dijagnozom PB-a imaju i poremećaje posturalnih refleksa koji su odgovorni za uspravan položaj tijela. Pacijenti s ovim poremećajem često su nestabilni pri naglim pokretima tijela i nagloj promjeni smjera ili pravca kretanja. Takvi poremećaji mogu se manifestirati kao anteropulzija (savijanje tijela prema naprijed), retropulzija (savijanje prema nazad) ili lateropulzija (savijanje tijela u stranu). Loša ravnoteža i nestabilan položaj tijela često su uočeni motorički simptomi kod osoba s PB-om. Donedavno se smatralo da se javljaju relativno kasno u toku bolesti, međutim, postoje značajni dokazi da se promjene u kontroli položaja tijela i ravnoteži događaju čak i u ranim fazama (Kimmell i sur, 2015).

Još jedan zabilježeni motorički simptom bolesti je karakteristični hod sitnim koracima uz otežano započinjanje hoda i magnetni hod uz otežano mijenjanje pravca kretanja. Napredovanjem bolesti izmjenjuju se spore kretnje s nekontroliranim ubrzanjem kratkih koraka, a rjeđe se javlja i povremena ukočenost ili fenomen zaleđivanja (eng. *freezing effect*) pri čemu se bolesnik naglo ukoči i kraće vrijeme ostaje nepokretan, posebice tijekom hoda ili promjene pravca (Buckley i sur, 2008).

### **1.1.3. Nemotorički simptomi Parkinsonove bolesti**

U zadnjih nekoliko desetljeća, pojava nemotoričkih simptoma u Parkinsonovoj bolesti postala je široko prepoznatljiv problem. U vrijeme dijagnoze, simptomi poput boli, poremećaja urinarnog trakta, depresije i anksioznosti prisutni su u oko 20% pacijenata. Otprilike sedam godina nakon dijagnoze, pojava ovih nemotoričkih simptoma povećava se za 88%. Uz to, simptomi poput poremećaja spavanja, poremećaja rada crijeva, gastroezofagealnog refluksa i olfaktornih promjena javljaju se kod velikog broja oboljelih. Uočeno je da pacijenti s PB-om imaju razne poremećaje spavanja, a ovakvi nemotorički simptomi mogu započeti godinama, ako ne i desetljećima, prije razvoja klasičnih kliničkih motoričkih simptoma bolesti. Poremećaj brzog kretanja očiju u snu ili REM poremećaj ponašanja tokom spavanja direktno je povezan s razvojem sinukleopatija, u kojima proteini  $\alpha$ -sinukleina stvaraju fibrile koji se nakupljaju u stanicama dopaminergičkih neurona, što dovodi do degradacije i smrti stanice. Procjenjuje se da se poremećaji spavanja javljaju u 60-98% bolesnika s PB-om (Bonnet i sur, 2012).

Kognitivni i bihevioralni simptomi mogu se pojaviti u najranijim fazama Parkinsonove bolesti, prije bilo kakvih tretmana i terapija, a mogu biti i biomarkeri za dijagnozu bolesti. Procjenjuje se da 19 - 30% pacijenata s rano dijagnosticiranim PB-om ima kognitivna oštećenja i da se ista pogoršavaju s napredovanjem bolesti. Kognitivno oštećenje i razvoj demencije sve se više smatraju dijelom tijeka Parkinsonove bolesti. Gotovo 90% PB pacijenata s demencijom pokazuje barem jedan neuropsihijatrijski simptom, a 77% ih pokazuje dva ili više. Čimbenici rizika za razvoj blagog kognitivnog oštećenja uključuju stariju dob na početku bolesti, spol (muškarci oboljevaju više od žena), depresiju, težinu motoričkih simptoma i uznapredovalu fazu bolesti. Preko 80% pacijenata s PB-om razvija demenciju unutar 20 godina od početne dijagnoze. Depresija može pogoršati kognitivna oštećenja kod PB-a, a učestalost depresije kod PB procjenjuje se na 25% do 33% (Leroi i sur, 2012).

#### 1.1.4. Poremećaj inzulinskog i glutamatnog sustava u Parkinsonovoj bolesti

Glutamat je najrasprostranjeniji ekscitatorni neurotransmitter u mozgu sisavaca. Oslobađa se u sinaptičkoj pukotini i veže za glutamatne receptore. Ionotropni glutamatni receptori su ionski kanali vezani ligandom i aktiviraju se glutamatnim neurotransmiterima te su posrednici u ekscitacijskom sinaptičkom prijenosu u SŽS-u. Ionotropni glutamatni receptori predstavljaju osnovu sinaptičke plastičnosti i imaju važnu ulogu u učenju i pamćenju (Featherstone, 2010).

Definirane su 3 skupine ionotropnih glutamatnih receptora:  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionska kiselina (AMPA), N-metil-D-asparaginska kiselina (NMDAR) i kainatni receptori (KAR). NMDA receptori se sastoje od osnovne podjedinice GluN1 u kombinaciji s podjedinicama GluN2A-2D. AMPA receptori se sastoje od kombinacije podjedinica GluR1-4, a KA receptori se sastoje od kombinacije podjedinica GluR5-7, KA1 i KA2. AMPAR i KAR uglavnom posreduju u dotoku  $\text{Na}^+$ , dok su NMDAR dvostruko zatvoreni kanali i imaju visoku vodljivost kalcija (Karakas i sur, 2015).

Bergman i sur. (1994) dolaze do saznanja kako prekomjerna aktivacija glutamatnih receptora u nigrostriatalnim neuronima može dovesti do stanične smrti uslijed ekscitotoksičnosti glutamata. Prethodne studije pokazale su da ekscitotoksičnost glutamata može izazvati degeneraciju dopaminergičnih neurona i popratnu motoričku disfunkciju kod PB-a (Meredith i sur, 2009). U patološkim uvjetima, kada se suvišak glutamata oslobađa iz presinaptičke membrane ili je oslabljena funkcija ponovnog unosa glutamata, koncentracija izvanstaničnog glutamata raste. Aktivirana mikroglija i reaktivni astrociti oslobađaju velike količine glutamata. Previše glutamata inducira pretjeranu stimulaciju glutamatnih receptora i povećava koncentraciju  $\text{Na}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$  u stanici, što može izravno uzrokovati oštećenje neurona i staničnu smrt. Glutamatna ekscitotoksičnost uključena je u mnoge vrste neurodegenerativnih bolesti. Eksitotoksičnu kaskadu glutamata kod Parkinsonove bolesti pokreće višak izvanstaničnog glutamata, što na kraju može dovesti do ozljeda i smrti stanica. Prekomjernom aktivacijom NMDA receptora, povećani priljev  $\text{Ca}^{2+}$  iona dodatno pogoršava razinu reaktivnih kisikovih spojeva, dovodi do oštećenja mitohondrija i povećava osjetljivost na staničnu smrt. Uz to, pretjerana aktivacija AMPA receptora izaziva preopterećenje  $\text{Na}^+$  ionima, što rezultira visokom unutarstaničnom propusnošću i akutnim oticanjem stanica (Iovino i sur., 2020). Povećanje slobodnih radikala posebno je važno za patogenezu PB-a, jer su dopaminergički neuroni u SNpc posebno osjetljivi na oksidativni stres. Oksidativni stres u SNpc pacijenata s PB-om uzrokuje i smanjenje razine glutathiona uz koje se povezuje i smanjenje oksidacije lipida, bjelančevina i DNA te dolazi do povećanja ukupnog sadržaja željeza u SNpc što uzrokuje pojačavanje oksidativnog stresa.



U ovom slučaju, oksidativni stres u SNpc dovodi do prekomjernog stvaranja peroksida, a nedostatak glutaciona dovodi do smanjene sposobnosti mozga da uklanja peroksid ( $H_2O_2$ ). Kontinuirano nakupljanje peroksida inducira staničnu smrt (Wang i sur., 2020).

S druge strane, inzulin ima značajnu ulogu u regulaciji pamćenja i kognitivne funkcije, što se smatra relevantnim za progresivno oštećenje kognitivne funkcije kod PB-a. Inzulin je važan za regulaciju metabolizma glukoze, sinaptičke plastičnosti i neuralnog rasta, sa značajnim neuroprotektivnim djelovanjem (Schubert i sur, 2004). U stanici se inzulin veže za inzulinski receptor (eng. *insulin receptor*; IR), a vezanje inzulina na receptor aktivira dva glavna signalizacijska puta – fosfatidilinozitol 3-kinaza (PI3K)/Akt put i signalizacijski put kinaze pod kontrolom izvanstaničnih signala (eng. *extracellular signal-regulated kinases*; ERK). Istraživanja koleracije između PB-a i dijabetesa tipa 2, pokazala su da je prisutnost kognitivnog deficita značajno viša u pacijenata s PB kojima je dijagnosticiran i *diabetes mellitus*, nego kod pacijenata koji boluju samo od PB-a, sugerirajući da bi dijabetes mogao biti jedan od rizičnih faktora koji uzrokuje kognitivnu disfunkciju kod pacijenata s PB. Međutim, specifična uloga inzulina u zaštiti kognitivnih funkcija jasnije je potvrđena studijama koje su pokazale da su pacijenti s PB-om i demencijom skloni inzulinskoj rezistenciji u mozgu (IRM), čak i kad im nije dijagnosticiran dijabetes (Athauda i Foltynie, 2016). Kognitivni deficit i progresija do demencije kod PB proizlaze iz promjena u strukturi i funkciji hipokampusa, jer su neuroni hipokampusa posebno osjetljivi na promjene u inzulinskoj osjetljivosti. IRM, promatrano na molekularnoj razini, je karakterizirana smanjenim odgovorom na signalizaciju inzulina nizvodno od puta inzulinski receptor (IR) - supstrat inzulinskog receptora (IRS) - fosfatidil inozitol-3 kinaza (PI3K) u mozgu, što može dovesti do neurodegeneracije i kognitivnih poremećaja kao što je vidljivo u Alzheimerovoj bolesti, ali i do metaboličkih promjena hipotalamičkih funkcija, kao što je vidljivo kod pretilosti i dijabetes melitusa tipa 2. Motorička disfunkcija u PB-u posljedica je degeneracije dopaminergičkih neurona koji projiciraju iz supstancije nigre pars compacta (SNpc) u strijatum, a bazalni gangliji također su područje u kojem inzulinska signalizacija igra važnu ulogu (Morris i sur, 2009). Metabolička disfunkcija, osobito ona koja se odnosi na stanje IRM-a, sve je više u fokusu istraživanja PB-a. Ranije studije o PB-u otkrile su da gubitak IR imunoreaktivnosti u neuronima SNpc i disfunkcija inzulina/IR sustava može prethoditi smrti dopaminergičkih neurona (Fiory i sur, 2019).

## 1.2. Životinjski modeli Parkinsonove bolesti

U pogledu modeliranja PB-a, postoje dva glavna netransgenična PB modela stvorena pomoću egzogenih toksina: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) i 6-hidroksidopamin (6-OHDA). Zajednička značajka svih modela induciranih neurotoksinom jest da direktno utječu na inhibiciju mitohondrijskog kompleksa I ili kompleksa III (Schober, 2004).

6-OHDA predstavlja jedan od najčešće korištenih neurotoksina u modelima degeneracije neurona u nigrostrijatalnoj regiji. U mozgu, 6-OHDA ima sposobnost induciranja degeneracije dopaminergičkih i noradrenergičkih neurona. Navedene vrste neurona posebno su osjetljive na 6-OHDA jer njihovi membranski transportni proteini imaju visok afinitet za ovu molekulu. Jednom kada se apsorbira u neurone, 6-OHDA se akumulira u citosolu, gdje dovodi do progresivnog propadanja neurona zbog citotoksičnosti inducirane oksidativnim stresom. Ukoliko želimo primijeniti toksin na područje mozga od interesa, 6-OHDA se onda obično ubrizgava stereotaksijski. Sistemsom primijenom, 6-OHDA ne može doprijeti do područja mozga od interesa jer ne prolazi kroz krvno-moždanu barijeru. Zbog poteškoća u ciljanju malih moždanih struktura kao što su supstancija nigra ili medijalni snop prednjeg mozga, 6-OHDA se češće koristi kod štakora, nego kod miševa za modeliranje PB- a (Deumens, 2001).

Na jačinu neurodegenerativnog učinka induciranog primjenom 6-OHDA značajan utjecaj ima regija u koju primjenjujemo toksin. Najčešće se unilateralno injektira u supstanciju nigru, medijalni snop prednjeg mozga ili strijatum. Iako su općenito živčani završeci osjetljiviji na toksičnost 6-OHDA od aksona i tijela neurona, direktnom primjenom u supstanciju nigru ili medijalni snop prednjeg mozga, 6-OHDA stvara potpunu i brzu leziju u nigrostrijatalnoj regiji. Direktnom primjenom u područje supstancije nigre, degeneracija dopaminergičnih neurona odvija se unutar 12 sati, što prethodi značajnom gubitku strijatalnih živčanih završetaka. Direktnom intrastrijatalnom primjenom, 6-OHDA retrogradno inducira djelomično, sporo i progresivno oštećenje nigrostrijatalne regije u razdoblju do 3 tjedna. Primjena 6-OHDA intrastrijatalno uzrokuje lezije koje su relevantnije za istraživanje mehanizma PB-a jer je ovakvom primjenom molekule uočena češća pojava ne-motoričkih simptoma bolesti, uključujući kognitivnu i gastrointestinalnu disfunkciju (Truong i sur, 2006).

1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) je neurotoksin koji uzrokuje oštećenje nigrostrijatalnih dopaminergičkih neurona, sa značajnim gubitkom dopaminergičkih neurona u strijatumu i SNpc. MPTP je lipofilni, primarno netoksični spoj koji prelazi krvno-moždanu barijeru i ulazi u mozak, gdje ga enzim monoaminooksidaza-B (MAO-B) metabolizira u toksični kation 1-metil-4-fenilpiridin (MPP+), koji uništava dopaminergičke neurone u supstanciji nigri.

On se akumulira u mitohondrijima i ometa funkciju kompleksa 1 respiratornog lanca, što dovodi do stanične smrti i nakupljanja slobodnih radikala (Przedborski i Vila, 2003). Neurotoksičnost toga spoja prvi put je otkrivena 1976. u Marylandu, nakon što je Barry Kidston, student kemije, sam sintetizirao MPP drogu i dodao u nju veliki udio MPTP-a te ju je sam sebi ubrizgao. U roku od tri dana razvio je simptome parkinsonizma - bradikineziju, rigiditet i tremor. Nakon njegove smrti, obdukcijски nalaz pokazao je uništene dopaminergičke neurone u supstanciji nigri (Fahn, 1996). Langston i sur. su pokusima na majmunima otkrili da injekcije MPTP-a uzrokuju simptome parkinsonizma i promjene na mozgu istovjetne onima u bolesnika s PB-om, te da se MPTP može koristiti za simuliranje bolesti u svrhu proučavanja fiziologije i mogućnosti liječenja u laboratoriju (Langston i sur, 1985).

### **1.2.1. 6-hidroksidopamin**

6-Hidroksidopamin (6-OHDA) je hidroksilirani analog neurotransmitera dopamina te je njegovim otkrićem došlo do značajnog napretka u proučavanju modela PB. Izoliran je 1956. godine (Senoh i Witkop, 1959), a njegovi biološki učinci ispitani su prvi put 1963, kada je uočena povezanost 6-OHDA s deplecijom noradrenalina u srcu miša (Porter i sur, 1963). Otkriće da 6-OHDA može inducirati selektivnu degeneraciju na simpatičkim adrenergičkim živčanim završecima, dovelo je do novog koncepta u neurobiologiji, u kojem se neurotoksična molekula koristi za ciljanje određene skupine stanica. Danas 6-OHDA predstavlja jedan od najčešće korištenih neurotoksina u modelima neurodegenerativnih bolesti *in vivo* i *in vitro* (Blum i sur, 2001).

### **1.2.2. Štakorski model Parkinsonove bolesti izazvan središnjom primjenom 6-hidroksidopamina**

Uobičajena mjesta primjene 6-OHDA su SNpc, medijalni snop prednjeg mozga (eng. *medial forebrain bundle*-MFB) ili strijatum, ali konačni izgled motornih simptoma varira ovisno o uni- ili bi-lateralnoj primjeni toksina i o njegovoj dozi (Iancu i sur, 2005). Unilateralna primjena 6-OHDA u SNpc ili MFB uzrokuje brzu i drastičnu degeneraciju tijela dopaminergičnih neurona te anterogradnu progresiju neurodegeneracije. Primjenom u strijatum, toksin inicijalno utječe na dopaminergičke završetke (uz daljnju retrogradnu progresiju degeneracije) (Branchi i sur, 2008).

Štakori s unilateralnim lezijama uzrokovanim 6-OHDA pokazuju asimetrično motoričko ponašanje koje se može kvantificirati i koje korelira sa stupnjem lezije, te predstavlja dobro validirani model uznepredovanih faza PB-a obilježenih motoričkim promjenama, dok je za kognitivne simptome potrebna bilateralna injekcija niskih koncentracija 6-OHDA jer uzrokuje uravnoteženi gubitak dopaminergičkih neurona i bolje oponaša stanje kod ljudi, osobito rane faze PB-a (Hritcu i sur, 2008).

### **1.2.3. Promjene uzrokovane središnjom primjenom 6-hidroksidopamina**

Veliki broj dokaza ukazuju na činjenicu da primjena 6-OHDA u jezgre bazalnog ganglija glodavaca inducira nekoliko funkcionalnih motoričkih abnormalnosti koje se mogu koristiti kao vrijedni životinjski modeli u istraživanju PB-a na pretkliničkoj razini. U 6-OHDA modelu, neurotoksin se često aplicira u specifične podregije strijatuma kako bi se izazvala stupnjevana, progresivna i spora dopaminergička degeneracija s pojavom suptilnih motoričkih deficita, koji se pojavljuju u ranim simptomatskim fazama PB-a (Simola i sur, 2007). Primjenom 6-OHDA u dorzomedijalni dio strijatuma štakora (DMS) uočen je značajni deficit u testu vremena reakcije (eng. *Reaction-time task*), u kojem su štakori naučeni da nakon vizualnog poticaja moraju pritisnuti ručicu kako bi došli do hrane. Ovim testom mjeri se sposobnost motoričke inicijacije, te je uočeno da tretirani štakori imaju lošiju i usporeniju motoričku reakciju od kontrolnih grupa (Amalric i sur, 1995). Još jedan test kojim se mjeri motorički deficit induciran primjenom 6-OHDA je *forepaw adjusting steps* (FAS) test. FAS test koristi se kako bi se ispitali motorički deficiti u prednjim udovima i kao mjera akinezije, kardinalnog simptoma PB-a. Sastoji se od mjerenja sposobnosti štakora u izvođenju koraka kojima se prilagođavaju kretanju po zadanoj vodoravnoj površini. Kod štakora s induciranim lezijama u mozgu izmjeren je smanjeni broj koraka u FAS testu, kao i smanjena sposobnost uporabe i pokretanja prednjih udova (Olsson i sur, 1995). Dobiveni rezultati u navedenim studijama koreliraju s pojavom nedostataka u kontroli fine motorike prednjih udova u pacijenata s PB.

Studije koje su promatrale motoričke sposobnosti štakora s lezijama nakon uni-lateralne primjene 6-OHDA pokazale su poremećaje u kretanju i hodanju na rotarod uređaju, te je uočeno da nastale lezije uzrokuju spontanu ipsilateralnu rotaciju i kontralateralnu aktivnost ekstenzora koljena tijekom normalnog hodanja. Elektromiografskim snimkama uočeno je da postoje razlike u obrascima aktivacije mišića tijekom rotacije i hodanja kod životinja s lezijama u usporedbi s kontrolnom grupom te životinje s deplecijom dopamina pokazuju povremene valove ritmičkih kontrakcija mišića u mirovanju (Metz i sur, 2005).

#### 1.2.4. Kognitivni deficit u štakorskom modelu Parkinsonove bolesti

Korištenje štakorskog modela PB-a primjenom 6-OHDA predstavlja pouzdan alat za proučavanje kognitivnih simptoma kao što su disfunkcija u izvršavanju zadanih problema, oštećenja u dugoročnom ili kratkoročnom pamćenju i vizualno-prostorni deficit. Brojne studije kojima je temeljni cilj bio istraživanje nemotoričkih simptoma PB-a, koristile su upravo intrastrijatalnu bilateralnu primjenu 6-OHDA. Pokušavajući modelirati neuropsihijatrijska i kognitivna oštećenja, Tadaiesky i sur. (2008) podvrgnuli su skupinu štakora bilateralnoj primjeni 6-OHDA u dorzalni strijatum (ukupna doza od 12 µg). Tri tjedna nakon operativnog postupka, provedeni su kognitivni testovi i mjerenja biokemijskih parametara. Rezultati su pokazali da su štakori s lezijama 6-OHDA imali približno 40% smanjenu gustoću tirozin hidroksilaze (TH) u strijatumu i 60% smanjenu gustoću u SNpc (Tadaiesky i sur, 2008). TH predstavlja ključan faktor u sintezi dopamina, adrenalina i noradrenalina, stoga poremećaji u enzimskoj regulaciji TH dovode do progresivnih oštećenja mozga. Štakori s lezijama podvrgnuti kognitivnim testovima poput Morrisovog testa plivanja u labirintu (eng. *Morris Water maze test*) i testu prepoznavanja novih predmeta (eng. *Novel object recognition*) pokazali su znatno lošije rezultate u vizualno prostornoj percepciji u usporedbi s kontrolnom skupinom (Solari i sur, 2013). U štakora s teškom deplecijom dopamina (90-99%), najistaknutije promjene u mozgu bile su povećana fosforilacija serina IR supstrata-2 (IRS2) i smanjena fosforilacija protein kinaze B (AKT), kao i smanjena ekspresija glikogen sintaze kinaze -3α (GSK-3α), a nije bilo značajnijih perifernih promjena glukoze i inzulina. Unilateralna intrastrijatalna primjena 6-OHDA pokazala je utjecaj na razinu serumskog inzulina i signalizaciju strijatalnog inzulina, no nije inducirala perifernu inzulinsku rezistenciju pri mjerenjima 6 tjedana nakon induciranja lezije (Morris i sur, 2008).

## 2. CILJ RADA

Hipoteza: Intrastrijatalna primjena 6-OHDA uzrokuje smanjenu kognitivnu i motoričku sposobnost, povezanu sa smanjenom ekspresijom tirozin hidroksilaze te proteina glutamatnog i inzulinskog signalizacijskog sustava u pojedinim regijama mozga.

Opći cilj ovoga rada je istražiti sposobnost učenja i pamćenja u štakorskom modelu Parkinsonove bolesti induciranog obostranom intrastrijatalnom primjenom neurotoksina 6-hidroksidopamina pomoću kognitivnih i motoričkih testova, te povezanost kognitivnih i motoričkih promjena s glutamatnom i inzulinskom signalizacijom u mozgu pomoću imunohistokemijskih metoda.

Specifični ciljevi rada:

- 1) Ispitati motoričke i kognitivne promjene životinja 3 mjeseca nakon bilateralne intrastrijatalne primjene 6-OHDA.
- 2) Ispitati utječe li bilateralna intrastrijatalna primjena 6-OHDA na ekspresiju inzulina i proteina inzulinskog signalizacijskog puta u mozgu štakora 3 mjeseca nakon primjene u ovisnosti o regiji mozga.
- 3) Analizirati promjene u ekspresiji glutamata i glutamatnih receptora u mozgu štakora 3 mjeseca nakon intrastrijatalne aplikacije 6-OHDA u ovisnosti o regiji mozga.
- 4) Istražiti promjene u ekspresiji proteina tirozin hidroksilaze imunofluorescencijskim metodama i Westernskom metodom otiska (eng. *Western blot*) u pojedinim regijama mozga.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Životinje

Istraživanje je provedeno na odraslim mužjacima Wistar soja štakora težine 250-350 g, starima 3 mjeseca (Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zavod za farmakologiju). Svi postupci koji uključuju životinje, njihovu skrb, primjenu lijekova, *in vivo* testove i žrtvovanje provedeni su sukladno institucijskim smjernicama koja su sukladna nacionalnim i internacionalnim zakonima: (1) Direktiva Europskog parlamenta i Vijeća za zaštitu životinja korištenih u znanstvene svrhe; (2) Hrvatski zakon o dobrobiti životinja (NN135/06); (3) Zakon o promjenama i dopunama Hrvatskog zakona o dobrobiti životinja (NN37/13); (4) Hrvatski zakon o zaštiti životinja (NN 102/17); (5) Smjernice za skrb životinja u laboratorijskim postupcima ili u druge znanstvene svrhe (NN55/13); (6) Smjernice za postupke anestezije laboratorijskih životinja. *In vivo* pokusi na životinjama, kognitivno testiranje i žrtvovanje životinja odobreni su od Etičkog povjerenstva/Odbora za dobrobit životinja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, kao i od Ministarstva poljoprivrede (KLASA: UP/1-322-01/18-01/57; UBROJ: 525-10/0255-18-5). Životinje su za ovo istraživanje uzgojene i smještene u registriranoj nastambi za životinje na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Postupci provedeni na životinjama izvođeni su poštivanjem 3R principa. Osobe koje su rukovale sa životinjama su isključivo službeno osposobljene za rad sa laboratorijskim životinjama.

#### 3.2. Korišteni reagensi i antitijela

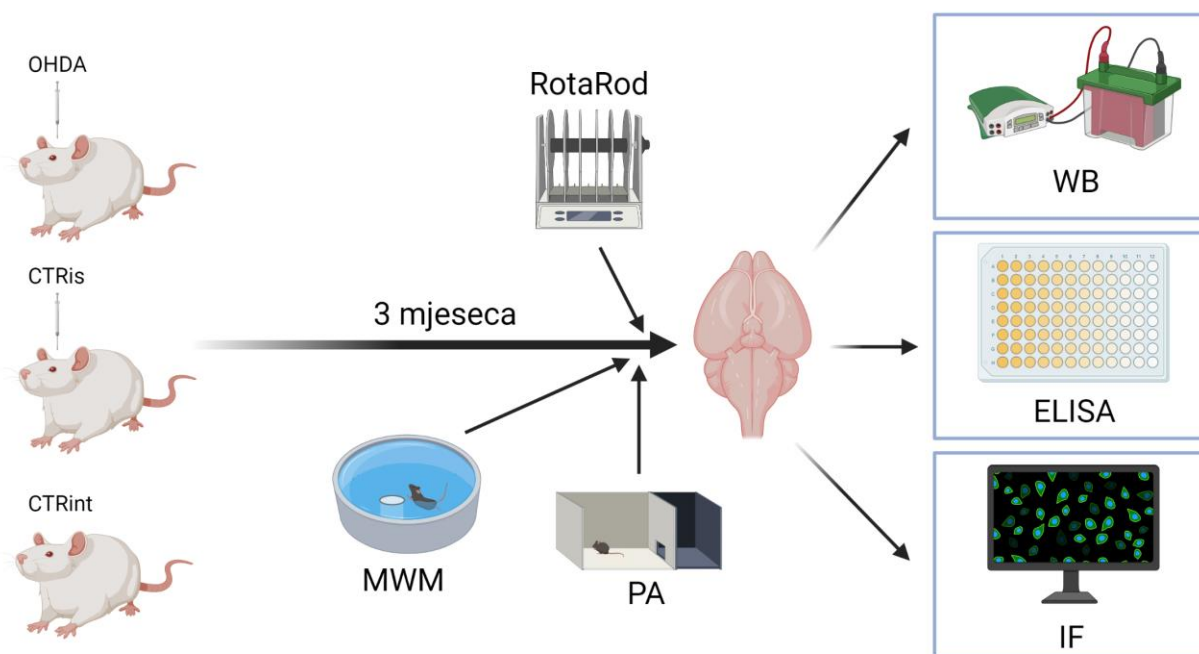
Za dobivanje modela Parkinsonove bolesti korišten je neurotoksin 6-OHDA (Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Njemačka). U istraživanju su korišteni koktel inhibitora proteaza, inhibitor fosfataza PhosStop i medij za pokrivanje prereza s DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol dihidroklorid) bojom (Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Njemačka), enzimski imunotestovi (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) za mjerenje inzulina (Merck Millipore, SAD) i glutamata (MyBioSource, SAD). Za potrebe analize Westernskom metodom otiska (eng. *Western blot*) korištena su primarna antitijela na IR, TH, AMPAR, fosforiliranu formu AMPAR (Merck Millipore, SAD), fosforilirana forma NMDAR (Merck Millipore, SAD), PI3K p85 i ERK (Cell signaling, SAD). Za imunofluorescencijsku analizu uz već spomenuto antitijelo na TH korišteno je i primarno antitijelo NeuN (Merck Millipore, SAD), kao marker za neurone. Sekundarna protutijela korištena u istraživanju su mišja i zečja protutijela vezana uz peroksidazu, te fluorescentna protutijela AlexaFluor488 i AlexaFluor555 (Cell signaling, SAD).

Za izradu akrilamidnih gelova za elektroforezu i vizualizaciju proteina nakon elektroforeze korišten je TGX Stain-Free FastCast acrylamide kit (Bio-Rad, SAD), a za vizualizaciju proteina nakon vezanja antitijela korišten je kemiluminiscencijski kit – SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific, SAD).

### **3.3. Eksperimentalni štakorski model Parkinsonove bolesti**

Prije operacijskog postupka štakori su izvagani te označeni vodootpornim markerima na području repa različitim bojama i brojevima kako bi se mogli razlikovati prilikom izvođenja operacijskog postupka i pokusa. Pomoću oznaka podijeljeni su u 3 skupine: kontrolna skupina (CTR<sub>is</sub>, N=9), intaktna skupina (CTR<sub>int</sub>, N=9) i skupina kojoj je apliciran neurotoksin (OHDA - 8 µg, N=6). U općoj anesteziji (ketamin 70 mg/kg / ksilazin 7 mg/kg intraperitonealno), štakorima je apliciran 6-OHDA obostrano u strijatum (caudate putamen, koordinate: AP-0 mm; ML-3 mm; DV-7 mm) u ukupnoj dozi od 16 µg (otopljen u 0.02% askorbinskoj kiselini; 8 µg u 2 µL po hemisferi mozga). Kontrolnim životinjama je istim postupkom intrastrijatalno apliciran jednaki volumen otapala (0.02% askorbinska kiselina), a treća skupina životinja nije tretirana (intaktna skupina) (Slika 1, napravljena pomoću BioRender.com).





**Slika 1. Shematski prikaz protokola eksperimenta.** Tri mjeseca starim mužjacima Wistar soja štakora intrastrijatalno je apliciran 6-OHDA (OHDA) ili otapalo (CTRis) dok je treća skupina ostala intaktna (CTRint). Tri mjeseca nakon intrastrijatalne primjene životinje su bile podvrgnute kognitivnim i motoričkim testovima: testu pasivnog izbjegavanja (PAT), Morris Water Maze testu (MWM) i RotaRod testu. Dan nakon testova životinje su žrtvovane u dubokoj anesteziji, te im je izvađen mozak i pripremljen za daljnje analize: Westernska metoda otiska (eng. *Western blot*; WB), analizu imunoenzimskim testovima visoke osjetljivost (ELISA) i imunofluorescencijsku (IF) analizu.

### 3.4. Kognitivno i motoričko testiranje

Tri mjeseca nakon primjene 6-OHDA, životinje su bile podvrgnute kognitivnim i motoričkim testovima. Kognitivne funkcije učenja i pamćenja testirane su s dva standardna testa: Morrisov test plivanja u labirintu (eng. *Morris Water Maze Swimming Test*; MWM) i test pasivnog izbjegavanja (eng. *Passive Avoidance Test*; PAT), a testiranje motoričke sposobnosti životinja provedeno je pomoću testa rotirajućeg cilindra (eng. *Rotarod*; RR) (Slika 1).

### **3.4.1. Test rotirajućeg cilindra (*Rotarod test - RR*)**

RR test se bazira na mjerenju vremena koje životinja prisilno provede na rotirajućem cilindru. Dva dana prije mjerenja odrađena su vježbanja kako bi životinje priviknuli na sam test. Maksimalno vrijeme koje su štakori mogli provesti na rotirajućem cilindru iznosilo je 180 s. Provedena su 2 mjerenja po životinji kako bih kasnije mogla izračunati srednju vrijednost za usporedbu između ispitanih grupa. Ukratko, štakor se postavi horizontalno na rotirajući cilindar koji je dovoljno visoko od poda kako bi inducirao izbjegavanje pada u životinja, a dovoljno nisko kako ne bi došlo do ozljede samih životinja prilikom pada. Vrijeme koje štakor provede na rotirajućem cilindru (konstantna brzina) mjera je njegove ravnoteže, koordinacije, te fizičkog i motoričkog stanja.

### **3.4.2. Morrisov test plivanja u labirintu (*Morris Water Maze Swimming Test - MWM*)**

MWM test koristi se za testiranje prostorne memorije i proveden je u bazenu promjera 180 cm s vodom standardne temperature 25°C. Samo testiranje se provodi pomoću softvera za praćenje životinja Ethovision XT (Noldus), s isključnim vremenom od 1 minute. Bazen se podijeli na 4 jednaka kvadranta označena engleskim kraticama za strane svijeta na kojima se nalaze: NW-sjeverozapad, NE-sjeveroistok, SW-jugozapad, SE-jugoistok. Skrivena platforma pod vodom se smjesti u kvadrant NW. Testiranje je provedeno kroz 6 uzastopnih dana. Mjereno je vrijeme potrebno da štakori nađu platformu kroz 5 uzastopnih dana (4 testiranja po danu) i broj ulazaka (grešaka) u kvadrante bez platforme (Faza učenja). Posljednji dan testiranja, platforma se uklonila i mjerilo se vrijeme koje životinja provede tražeći platformu u kvadrantu u kojem se ona nalazila, te broj ulazaka/grešaka u druge odjeljke.

### **3.4.3. Test pasivnog izbjegavanja (*Passive avoidance test - PAT*)**

PAT je korišten za testiranje strahom motiviranog učenja i pamćenja izbjegavanjem elektrošoka. Jačina elektrošoka (0.1-0.6 mA) varira ovisno o starosti i težini životinje. Komora koja se koristi u PAT podijeljena je na 2 odjeljka, svijetli i tamni, a između njih se nalaze vrata. U testu je mjereno vrijeme potrebno da životinja uđe u tamni odjeljak dan nakon što je u njemu podvrgnuta elektrošoku jačine 0,5 mA u trajanju od 2 sekunde. Prvi dan provedena je habituacija – životinje su istraživale oba odjeljka bez podvrgavanja elektrošoku, te nakon ulaska u tamni dio izvadile su se nakon 15 s. Sljedeći dan životinje su podvrgnute elektrošoku nakon što uđu u tamni odjeljak, kako bi naučile izbjegavati tamnu komoru (Vježbanje).

Treći dan provedeno je pravo testiranje gdje se mjerilo vrijeme potrebno da životinja uđe u tamnu komoru s maksimalnim vremenom od 5 minuta.

### **3.5. Žrtvovanje životinja**

Nakon bihevioralnih pokusa životinje su žrtvovane u dubokoj anesteziji (tiopental 75 mg/kg/ diazepam 7 mg/kg). Životinje su dekapitirane i mozak im je izvađen. Polovica mozga koja je predviđena za analizu proteina pomoću Westernske metode otiska (WB) i analizu imunoenzimskim testovima visoke osjetljivosti (ELISA) razdijeljena je po anatomskim regijama (hipokampus/HPC, hipotalamus/HPT i strijatum/S). Uzorci su pohranjeni za homogenizaciju i daljnju analizu na -80°C. Preostale polovice mozga su isprane u hladnoj fiziološkoj i uronjene u 4% puferirani paraformaldehid (PFA) na 2 dana. Nakon fiksacije mozgovi životinja su krioprezervirani serijskim otopinama saharoze (15% i 30%), te pohranjeni na -80°C za imunohistokemijsku analizu.

#### **3.5.1. Homogeniziranje tkiva**

Za izolaciju proteina i kasnije mjerenje proteinske ekspresije, uzorke HPC, HPT i S stavila sam u 500 µL ili 300 µL otopine pufera za lizu stanica (1 M Trisa (tris(hidroksimetil)aminometan) pH 8,0; 1 M NaCl; 0,005 M EDTA; 1 M DTT; 0,01 M natrij vanadata; 1% NP-40) s proteaza (1:100) i fosfataza (1 tableta na 10 mL pufera) inhibitorima, nakon čega sam tkivo homogenizirala na ledu pomoću sonikatora (Microson Ultrasonic Cell Disruptor XL, Manassas, VA, SAD) oko 10 sekundi po uzorku. Homogenat sam potom centrifugirala 10 minuta na 12 500 g i 4 °C (Biofuge fresco heraeu, Hanau, Njemačka), a supernatant pohranila na -80 °C do daljnje upotrebe.

### 3.5.2. Mjerenje koncentracije proteina

Koncentraciju proteina u uzorcima mjerena je metodom po Lowry-u. Nakon homogenizacije uzoraka, potrebno je izmjeriti ukupnu koncentraciju proteina u uzorku. U 10  $\mu$ L ukupnog staničnog lizata doda se 2 mL reagensa bakrova sulfata (49 mL otopine 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  u 0,1 M NaOH i 1 mL otopine jednake količine 1%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  i 2% NaK tartarata) i inkubira 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga dodaje se 0,2 mL folin reagens (H<sub>2</sub>O i Folin-ciocalteu, 2:1) i ostavi 30 minuta. Apsorbanciju nastale plave boje očita se pri valnoj duljini od 750 nm na spektrofotometru (Iskra HPV 220, Slovenija). Koncentracija proteina izračunala se na temelju apsorbancije standardnih otopina albumina goveđeg seruma, a kao slijepa proba korišteno je 10  $\mu$ L 0,1 N HCl.

### 3.5.3. Analiza Westernskom metodom otiska (*Western blot*)

Westernska metoda otiska korištena je kako bih mogla analizirati promjenu ekspresije proteina od interesa. Proteini sam razdvojila elektroforezom na poliakrilamidnom gelu gdje pod utjecajem napona putuju ovisno o njihovoj molekularnoj masi. Nakon gel - elektroforeze proteini se prenose na membranu za preslikavanje proteina i vizualiziraju obilježavanjem pomoću primarnih i sekundarnih protutijela koja željeni proteini lokalizacijski sprežu s kemiluminiscentnom reakcijom koju je moguće detektirati kamerom. SDS-poliakrilamidni gel za sabijanje i gel za razdvajanje 12% su pripremila sam prema uputama iz gotovog kita (TGX Stain-Free FastCast acrylamide kit). Ukratko, u otopine A i B za pripremu gela za razdvajanje i sabijanje dodala sam 10% amonijev persulfat (APS) i tetrametiletilendiamin (TEMED) kako bi se gelovi polimerizirali i bili spremni za nanošenje uzoraka. Pripremljene gelove sam potom stavila u kadice za elektroforezu s puferom za elektroforezu (10 g SDS-a u 100 mL H<sub>2</sub>O; 30 g Trisa i 115,2 g glicina otopljenih u 1 L H<sub>2</sub>O). Prije nanošenja na gel uzorke sam pripremila uzimanjem jednakog volumena homogenata i pufera za nanošenje na gel za elektroforezu (*sample* pufer [2 mL glicerola; 6 mL 10% SDS; 2,5 mL 1 M tris pufera pH 6,7; 2-4 mg bromfenol plavila] te 10%  $\beta$ -merkaptetanola). Pripremljene uzorke sam potom nakratko centrifugirala te kuhaju na temperaturi od 95°C, 5 minuta. Nakon kuhanja, uzorke sam centrifugirala 60 sekundi na 13 000g (Mikro 120, Hettich, Njemačka) nakon čega se nanose na gel u količini od 40  $\mu$ g za HPC i 30  $\mu$ g za HPT i S (uzorci su nanoseni na 2 mini gela po regiji). U prvu jažicu stavila sam 2  $\mu$ L proteinskog markera koji služi kao standard molekularnih težina pomoću kojeg ću za vrijeme analize moći odrediti molekularnu težinu proteina od interesa. U ovoj analizi koristila sam postavke elektroforeze: 200 V i 400 mA tijekom 45 minuta (Bio-Rad PowerPac Basic, Hercules, CA, SAD).

Nakon elektroforeze, gelove sam odvojila od stakalaca i prenijela u kadu s destiliranom vodom te potom snimila kamerom (ChemiDoc Imaging Systems, Bio-rad, Hercules, California, SAD). TGX Stain-Free gelovi omogućuju brzu fluorescencijsku detekciju i snimanje ukupnih proteina na gelu koji će mi kasnije služiti kao kontrola prilikom analize proteina od interesa. Nakon snimanja, gelove sam isprala u destiliranoj vodi i stavila u pufer za transfer (Bjerrum Schafer-Nielsen pufer za transfer proteina: 5.82g Trisa, 2.93 g glicina, 200 ml metanola, 3.75 ml 10% SDS-a, dopuniti do 1 L destilirane vode). Prilikom slaganja „sendviča“ potrebnog za transfer proteina s gela na membranu prvo sam namočila filter papire i nitroceluloznu membranu (pore veličine 0,2  $\mu\text{m}$ ) u pufer za transfer, potom redom složila filter papire, membranu, gel i opet filter papire te se na kraju sve pomoću valjka lagano izvaljala kako bih izbacila moguće mjehuriće zraka koji se nalaze između gela i membrane (2 mini gela se transferiraju zajedno na jednu membranu). Pripremljene transfer „sendviče“ sam stavila u kazete uređaja za turbo transfer (Trans-Blot Turbo Transfer System, Bio-Rad, SAD) pri postavkama od 2,5 A i 25 V, kroz 7 minuta. Nakon transfera, membrane sam isprala u destiliranoj vodi i provjerila uspješnost transfera bojanjem u Ponceau otopini 2-3 minute (0,1% Ponceau S otopina pripremljena u 5%-tnoj octenoj kiselini). Membrane sam potom isprala u puferu s niskom koncentracijom soli (LSWB, eng. *Low-salt washing buffer*, pH 7,5; 1,211 g TRIS-a i 8,766 g NaCl u 1 L H<sub>2</sub>O), 3 puta po 5 minuta na miješalici. Kako bih smanjila mogućnost nespecifičnog vezanja, membrane sam blokirala u 5% nemasnom mlijeku (1 g nemasnog mlijeka u prahu; 20 mL LSBW; 100  $\mu\text{L}$  Tween 20) inkubacijom kroz 1 h na sobnoj temperaturi. Nakon blokiranja membrane sam stavila na inkubaciju preko noći na 4 °C s antitijelima otopljenima u otopini za blokiranje (razrjeđenja TH, IR, PI3K p85, ERK, pNMDAR, pAMPA, AMPAR- 1:1000). Idući dan, membrane sam tri puta isprala u LSBW puferu i inkubirala 1 sat na sobnoj temperaturi s odgovarajućim sekundarnim antitijelom (anti-mouse 1:2000, anti-rabbit 1:2000) razrijeđenim u otopini za blokiranje. Membrane sam potom ponovno isprala 3 puta po 5 min u LSBW-u te inkubirala u kemiluminiscentnoj otopini pripremljenoj miješanjem jednakih volumena otopine vodikovog peroksida i luminola (Super Signal West Femto) kako bih vizualizirala tražene proteine kamerom (DNR Bio-Imaging Systems MicroChem, Jerusalem, Israel). Za analizu bendova dobivenih westernskom metodom otiska, korišten je program Image J (ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Ukupni proteini su korišteni kao kontrola postupka te su intenziteti proteina izraženi u omjeru prema signalu ukupnih proteina u istom uzorku na odgovarajućoj membrani. Rezultati promjene fosforilacije izraženi su kao omjeri fosforiliranog proteina i ukupnog proteina. Rezultati su prikazani u obliku srednje vrijednosti  $\pm$  standardna pogreška (SEM).

### 3.5.4. Imunofluorescentna analiza

Polovice mozgova namjenjene imunofluorescentnoj analizi su nakon fiksacije u 4% puferiranom paraformaldehidu krioprezervirane serijskim otopinama saharoze (15 i 30%). Zatim je središnji dio mozga odvojen i uklopljen u TissueTek otopinu, smrznut u tekućem dušiku i pohranjen na - 80°C. Uzorke sam zatim rezala na kriostatu (Leica SM 2010R, Wetzlar, Njemačka) na prereze debljine od 16 µm i položila na predmetna stakalca za imunohistokemijsko bojanje. Stakalca se najprije ostave 24h na 37°C na sušenju, a zatim ispiru 3 puta po 5 minuta u fosfatnom puferu (PBS). Nespecifična vezna mjesta blokiraju se 10% NGS-om (eng. *normal goat serum*) u PBST-u (0.25% Triton X-100 u PBS-u) 1 sat na sobnoj temperaturi. Kao i kod Westernske metode otiska, nakon blokiranja i bez ispiranja, stakalca se inkubiraju preko noći na 4°C s primarnim antitijelom na TH razrijeđenim u 1% NGS-u u PBST-u u koncentraciji od 1:1000. Sljedeći dan prerezi se ispiru u PBS-u (3 × 5min) i inkubiraju s odgovarajućim sekundarnim fluorescentnim antitijelom 2 sata u mraku (anti-rabbit AlexaFluor 555) u koncentraciji 1:500. Nakon inkubacije prerezi se isperu i cijeli postupak se ponovi ali ovog puta s primarnim antitijelom NeuN (1:1000) i sljedeći dan s odgovarajućim sekundarnim fluorescentnim antitijelom (anti-mouse AlexaFluor 488; 1:600). Uzorci su zatim ponovno isprani u PBS-u 3 puta i ostavljeni kratko vrijeme da se osuše. Stakalca se potom pokriju pokrovnim stakalcem s medijem za pokrivanje s DAPI-em (fluorescentna boja koja se veže za DNA). Za vizualizaciju prereza korišteni su Olympus BX51 mikroskop i CellSense Dimension program.

### 3.5.5. Mjerenje koncentracije glutamata i inzulina

Koncentracije inzulina i glutamata u mozgu određene su komercijalno dostupnim enzimskim imunotestovima i analizirane kolorimetrijskom analizom pomoću multimodalnog čitača mikropločica Infinite F200 PRO (Tecan, Švicarska). Za mjerenje inzulina u odgovarajuće jažice dodani su uzorci mozga štakora (10 µL). Apsorbancija je izmjerena na 450 nm, oduzeta za apsorbciju na 590 nm pomoću čitača mikropločica. Koncentracija inzulina je izračunata preko apsorbancijske krivulje standarda i izražena je u ng/mL. Za mjerenje glutamata u odgovarajuće jažice dodani su uzorci mozga štakora (100 µL, razrijeđeni u PBS-u 1:5). Koncentracija glutamata je izračunata preko apsorbancijske krivulje standarda i izražena je u ng/mL.

### 3.6. Statistička analiza

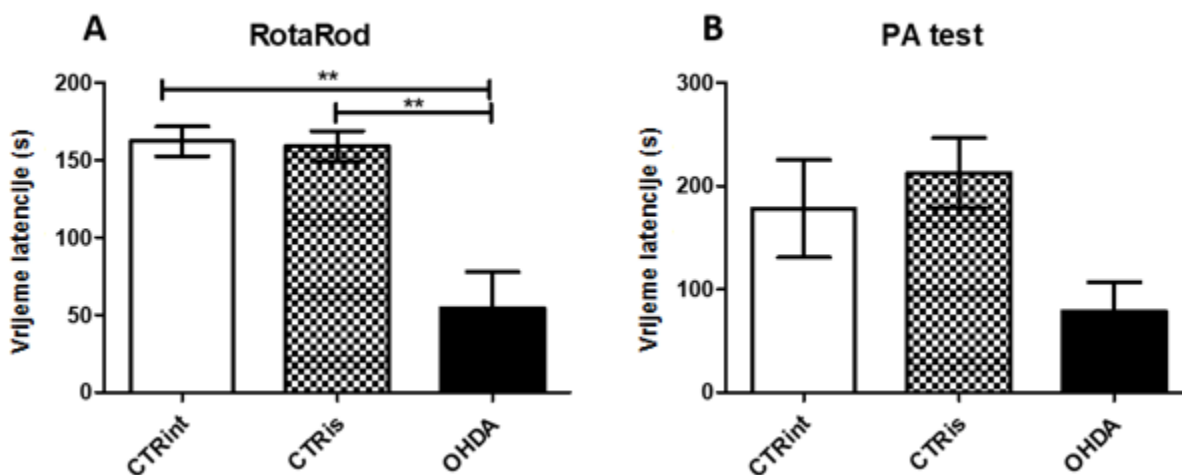
Statistička analiza provedena je Kruskal-Wallis ANOVA median testom za istovremenu usporedbu više od dvije grupe te Mann-Whitney U-testom za usporedbu dvije grupe. Statistička analiza vremena i broja grešaka u MWM testu tijekom faze učenja provedena je Two-way ANOVA median testom s Bonferonni post testom za usporedbu između grupa. Za analizu je korišten program GraphPad Prism 5. Svi podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM, a značajnosti su prikazane \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

## 4. REZULTATI

### 4.1. Motoričke i kognitivne promjene

#### 4.1.1. Test rotirajućeg cilindra (*RotaRod*) i test pasivnog izbjegavanja (*Passive avoidance test*)

Testom rotirajućeg cilindra (*RotaRod*) utvrđen je motorički poremećaj prisutan kod skupine kojoj je intrastrijatalno apliciran 6-OHDA. Primijećeno je statistički značajno smanjenje sposobnosti OHDA grupe naspram i intaktne (CTRint) kontrole (-66,4%,  $p=0,0042$ ) i kontrole (CTRis) koja je intrastrijatalno dobila samo otapalo (-65,8%;  $p=0,0026$ ) (Slika 2A). Iako ne postoji statistički značajna razlika vremena latencije između grupa u testu pasivnog izbjegavanja (PAT), primjećuje se tendencija smanjenog vremena ulaska životinja iz OHDA grupe u tamni odjeljak što nam sugerira poremećaj pamćenja uvjetovan strahom prisutan u toj skupini štakora (Slika 2B). Statistička razlika nije postojala vjerojatno zbog velikog rasapa rezultata u kontrolnim skupinama.

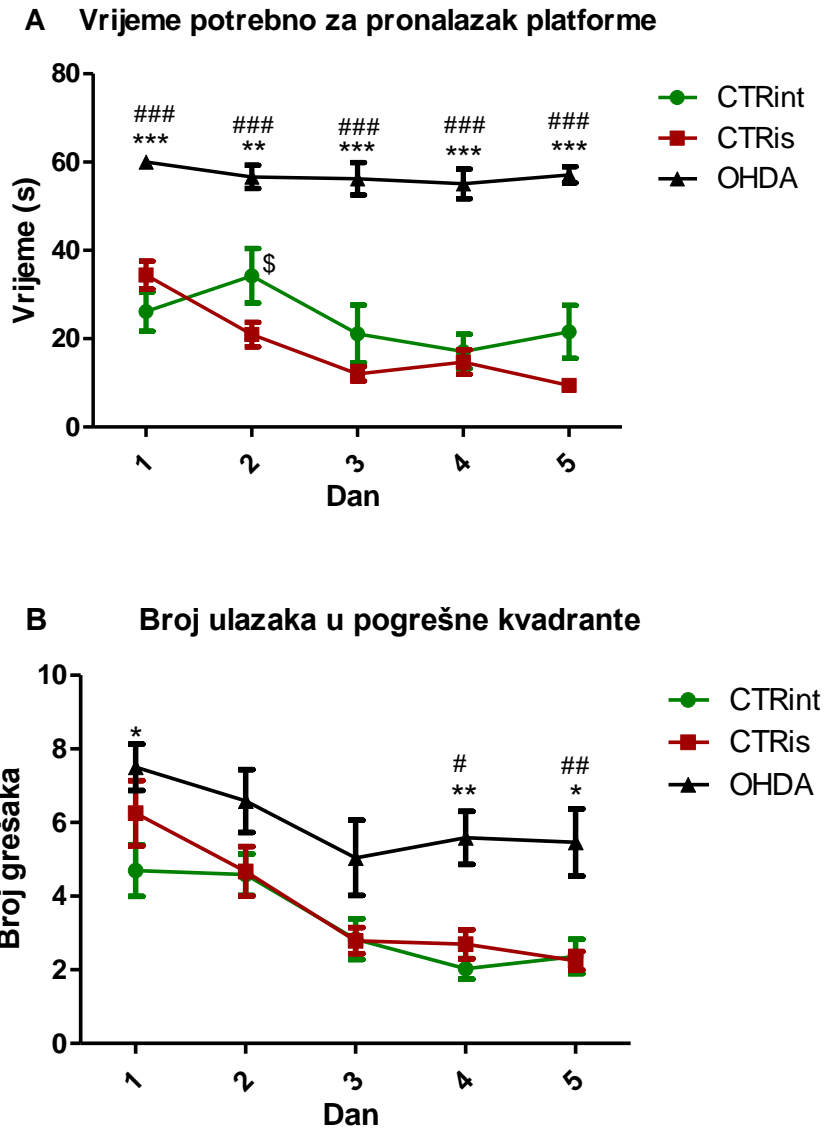


**Slika 2. Motoričke i kognitivne promjene mjerene testom rotirajućeg cilindra (*RotaRod*) i testom pasivnog izbjegavanja (*Passive Avoidance*).** Životinje su testirane motoričkim *RotaRod* testom (A) i kognitivnim PA testom (B) 3 mjeseca nakon intrastrijatalne primjene 6-OHDA (OHDA) ili otapala (CTRis), dok je jedna grupa životinja ostala netretirana (CTRint). Mjereno je vrijeme latencije, te su dobiveni rezultati uspoređeni među grupama. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ukupnog vremena latencije po grupi  $\pm$  SEM. Podaci su analizirani neparametrijskim Kruskal-Walis i Mann Whitney U – testovima. Statistička značajnost je prikazana kao  $**p<0,01$ .

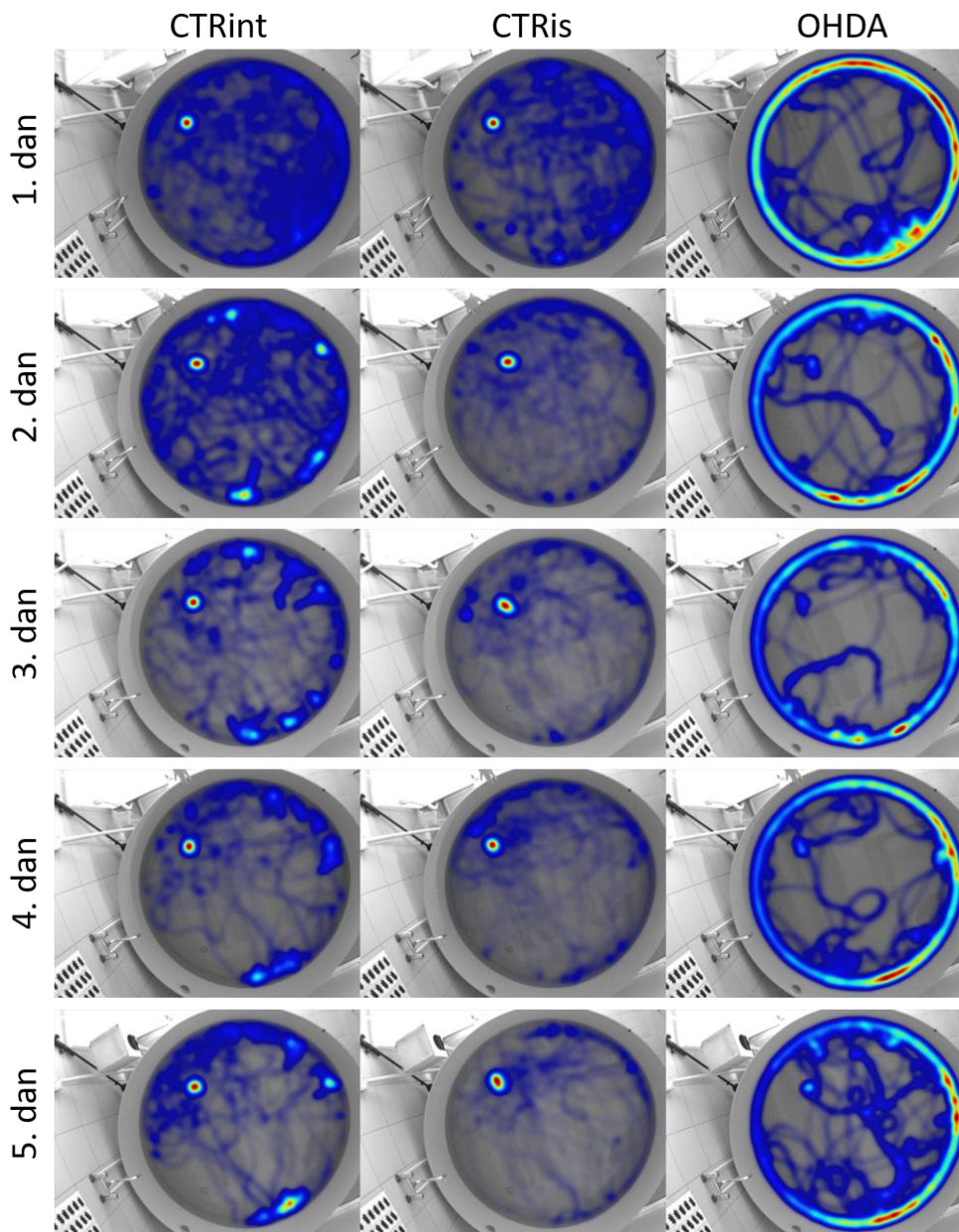


#### 4.1.2. Morrisov test plivanja u labirintu (*Morris Water Maze test - MWM*)

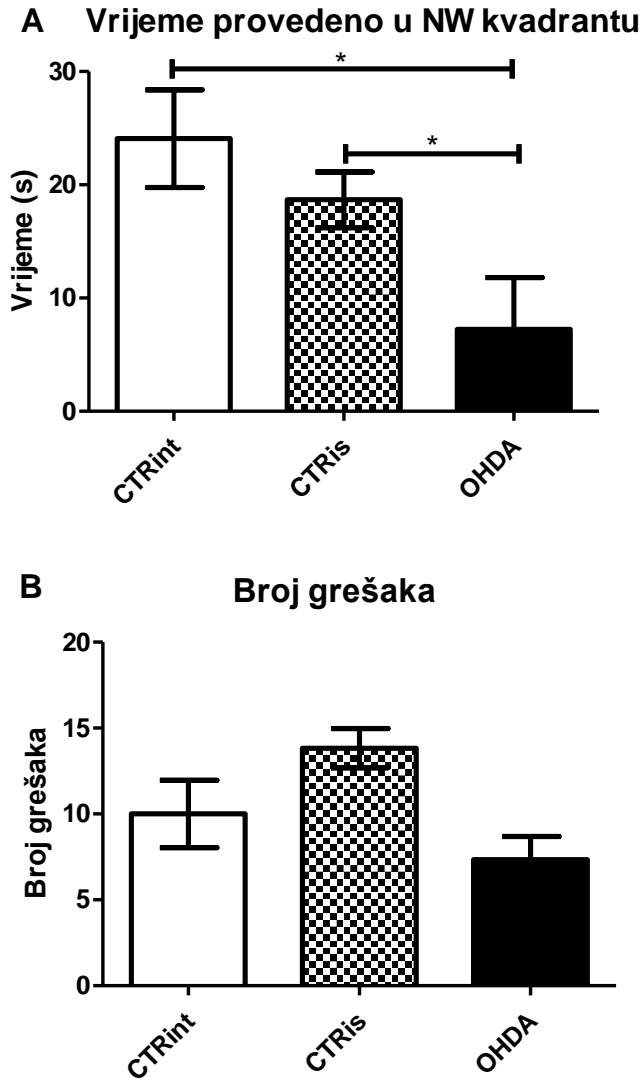
MWM testom utvrđen je statistički značajni deficit u učenju i pamćenju ( $p < 0.001$ ) u obliku duljeg vremena provedenog u pronalaženju platforme kod OHDA grupe naspram i intaktne (CTRint) kontrole i kontrole (CTRis) koja je intrastrijatalno dobila samo otapalo (+65,4% - +503,6%), kroz 5 dana testiranja (Slika 3A). Usporedbom vremena provedenog u pronalaženju platforme između dviju kontrolnih grupa (CTRint i CTRis), statistički značajna razlika uočena je samo 2. dan testiranja ( $p < 0.05$ ) (Slika 3A). Promatranjem broja grešaka tj. broja ulazaka životinja u pogrešne kvadrante, statistički značajna promjena u kognitivnom deficitu učenja i pamćenja uočena je kod OHDA grupe naspram intaktne (CTRint) i kontrolne grupe koja je intrastrijatalno dobila samo otapalo, ali samo prvi (+59,8% vs CTRint;  $p < 0,05$ ), četvrti (+107,4% vs CTRis;  $p < 0,05$ , +175,3% vs CTRint;  $p < 0,01$ ) i peti dan testiranja (+131,2% vs CTRint;  $p < 0,05$ , +142,8% vs CTRis;  $p < 0,01$ ) (Slika 3B). Promjene učenja i pamćenja mjerene zadnji dan MWM testa, pokazuju značajnu promjenu u kognitivnom deficitu kod OHDA grupe naspram intaktne (CTRint) kontrole (-69,9%,  $p = 0.0221$ ) i kontrolne skupine (CTRis) koja je intrastrijatalno dobila otapalo (-61,2%,  $p = 0.0352$ ) (Slika 5A). Statistički značajna razlika broja ulazaka u pogrešne kvadrante u zadnjem danu testiranja nije uočena, što je vjerojatno posljedica velikog rasapa rezultata u kontrolnim skupinama (Slika 5B). Pomoću EthoVision XT programa dobili smo toplinske mape (eng. *Heatplots*) kojima smo zabilježili razlike u kumulativnom vremenu svih životinja po grupama i uočili da je najveće kumulativno vrijeme imala OHDA skupina u usporedbi s kontrolnim CTRint i CTRis skupinama. Takav rezultat očituje se u broju piksela na mapi, toplije boje predstavljaju veće kumulativno vrijeme na određenoj lokaciji, a hladnije boje, kraće kumulativno vrijeme (Slika 4).



**Slika 3. Promjene učenja i pamćenja u OHDA štakorskom modelu Parkinsonove bolesti mjereno Morrisovim testom plivanja u labirintu (MWM).** Prostorno učenje i pamćenje životinja testirano je MWM testom 3 mjeseca nakon intrastrijatalne primjene 6-OHDA (OHDA) ili otapala (CTRis), dok je jedna grupa životinja ostala netretirana (CTRint). Provedena su uzastopna mjerenja kroz 5 dana, a u svakom danu mjerenje je ponovljeno 4 puta, te svaka točka prikazuje srednju vrijednost mjerenja određene grupe. Slika prikazuje vrijeme koje je bilo potrebno da životinje pronađu platformu (**A**), te broj pogrešaka (ulasci u pogrešni odjeljak) (**B**) koje su životinje napravile prilikom traženja platforme kroz 5 uzastopnih dana, 3 mjeseca nakon OHDA primjene. Kraće vrijeme za pronalazak postolja i manji broj pogrešaka upućuje na očuvanje funkcije učenja i pamćenja. Podaci su analizirani Two-way ANOVA testom i Bonferroni post-testom. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (\*CTRint vs OHDA, #CTRis vs OHDA, \$CTRint vs CTRis).



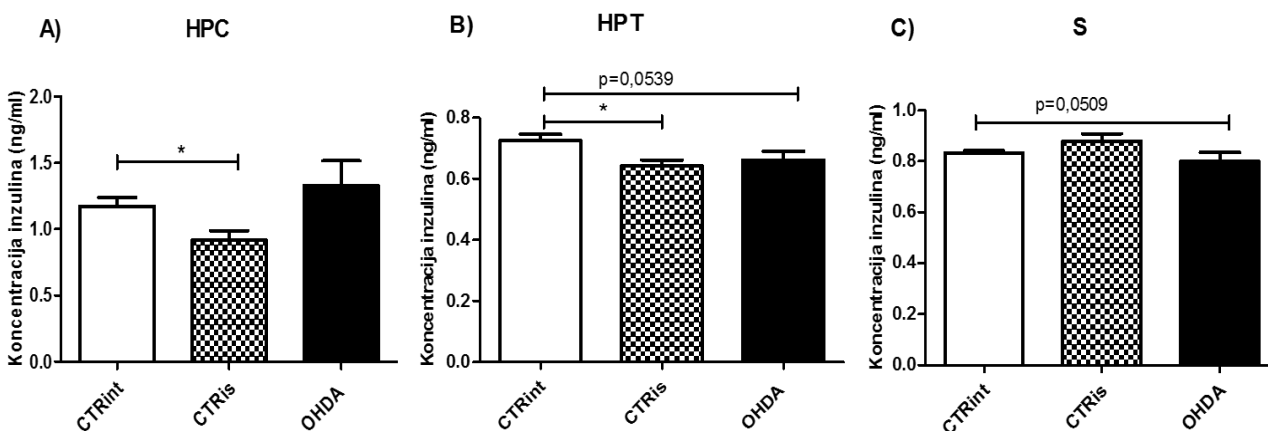
**Slika 4. Toplinske mape (eng. *Heatplots*) grupa životinja u Morrisovom testu plivanja u labirintu (MWM). Prostorno učenje i pamćenje životinja testirano je MWM testom 3 mjeseca nakon intrastrijatalne primjene 6-OHDA (OHDA) ili otapala (CTRis), dok je jedna grupa životinja ostala netretirana (CTRint). Provedena su uzastopna mjerenja kroz 5 dana, a u svakom danu mjerenje je ponovljeno 4 puta. Pomoću EthoVision XT programa napravljene su toplinske mape za pojedinu grupu i dan testiranja. Boja piksela na mapi prikazuje kumulativno vrijeme svih životinja po pojedinoj grupi koje su provele na određenoj lokaciji.**



**Slika 5. Promjene učenja i pamćenja u OHDA štakorskom modelu Parkinsonove bolesti mjereno zadnji dan Morrisovog testa plivanja u labirintu (MWM).** Prostorno učenje i pamćenje životinja testirano je MWM testom 3 mjeseca nakon intrastrijatalne primjene 6-OHDA (OHDA) ili otapala (CTRis), dok je jedna grupa životinja ostala netretirana (CTRint). Provedena su uzastopna mjerenja kroz 5 dana, a u svakom danu mjerenje je ponovljeno 4 puta. Zadnji dan platforma je uklonjena i životinja je stavljena u bazen na 1 minutu. Mjereno je vrijeme provedeno tražeći platformu u kvadrantu (NW) u kojem je ona bila i broj ulazaka u druge kvadrante. Na slici je prikazana srednja vrijednost vremena (A) i grešaka (B) svake grupe  $\pm$  SEM. Podaci su analizirani neparametrijskim Kruskal-Walis i Mann Whitney U - testovima. Statistička značajnost je prikazana kao  $*p < 0,05$ .

## 4.2. Koncentracija inzulina u hipokampusu, hipotalamusu i strijatumu

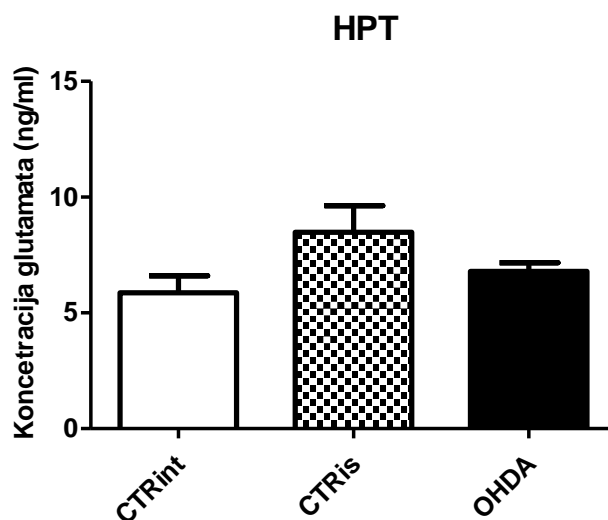
Koncentracije inzulina mjerene ELISA metodom ne pokazuju značajne razlike između intaktne (CTRint) skupine i tretirane OHDA skupine, kao ni između kontrolne skupine koja je intrastrijatalno dobila samo otapalo (CTRis) i OHDA skupine u HPC-u (Slika 6A). Postoji tendencija ka smanjenju koncentracije inzulina 3 mjeseca nakon intrastrijatalne primjene OHDA u HPT-u (-9% vs CTRint,  $p=0,0593$ ; Slika 6B) i S (-9% vs CTRis,  $p=0,0509$ ; Slika 6C). Statistički značajna promjena koncentracije inzulina uočena je između dvije kontrolne grupe, intaktne (CTRint) i kontrole (CTRis) koja je dobila instastrijatalno samo otapalo, u homogenatima regija mozga HPC (-21,8%,  $p=0,0244$ ) i HPT (-11,5%,  $p=0,0206$ ) (Slika 6A-B).



**Slika 6. Koncentracija inzulina u mozgu štakorskoga modela Parkinsonove bolesti.** Koncentracije inzulina u hipokampusu (HPC; **A**), hipotalamusu (HPT; **B**) i strijatumu (S; **C**) mjerene su ELISA metodom 3 mjeseca nakon intrastrijatalne primjene 6-OHDA (OHDA) ili otapala (CTRis), dok je jedna grupa životinja ostala netretirana (CTRint). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost koncentracije inzulina (ng/ml) po grupi  $\pm$  SEM. Podaci su analizirani neparametrijskim Kruskal-Walis i Mann Whitney U – testovima. Statistička značajnost je prikazana kao  $*p<0,05$ .

### 4.3. Koncentracija glutamata u hipotalamusu

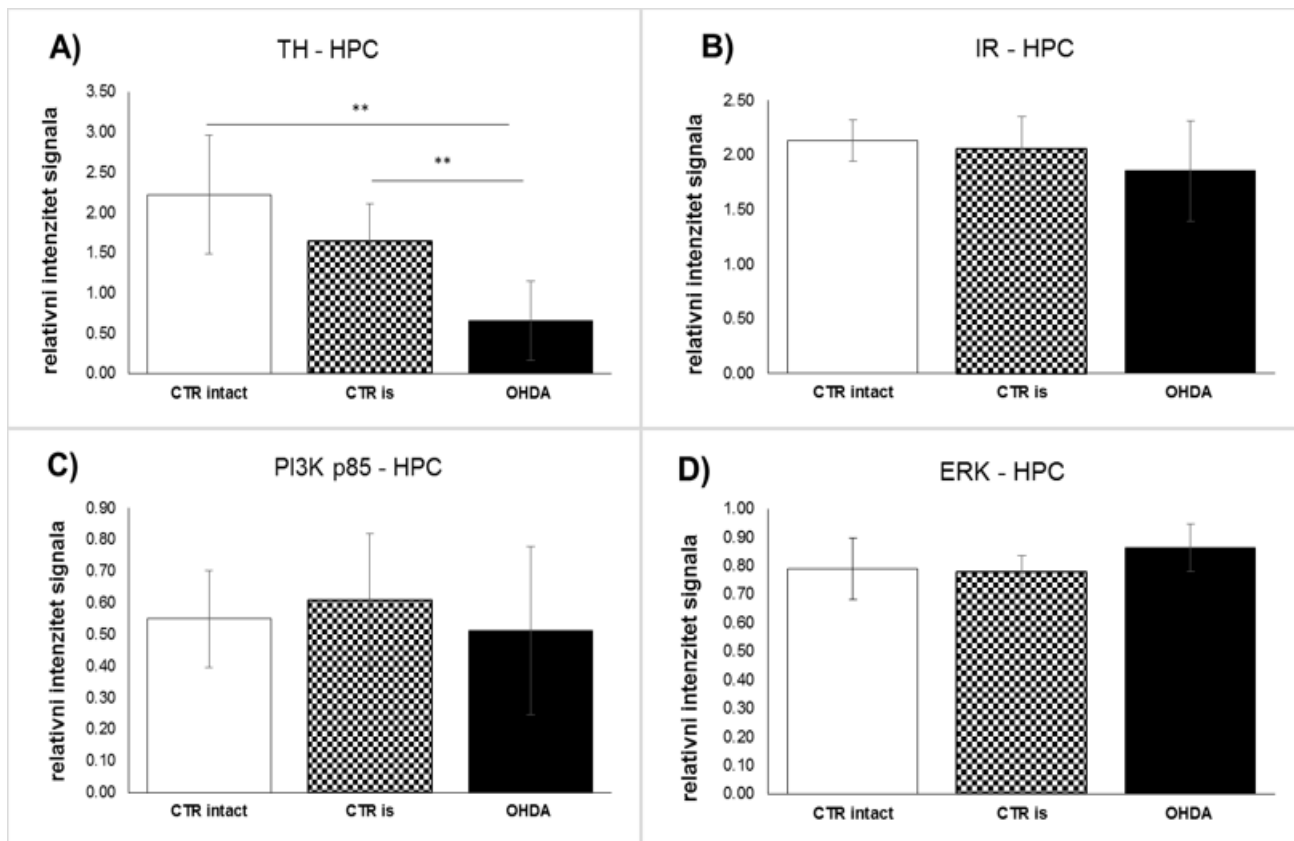
Koncentraciju glutamata uspješno smo izmjerili ELISA metodom samo u hipotalamusu (pozitivne vrijednosti). Kontrolna skupina (CTR<sub>is</sub>) koja je intrastrijatalno dobila samo otapalo, imala je u prosjeku najviše koncentracije glutamata, dok je intaktna kontrolna grupa (CTR<sub>int</sub>) imala najniže prosječne izmjerene koncentracije glutamata (Slika 7). Usporedba rezultata mjerenja među grupama nije pokazala statističku značajnost.



**Slika 7. Koncentracija glutamata u hipotalamusu štakorskoga modela Parkinsonove bolesti.** Koncentracija glutamata u hipotalamusu mjerena je ELISA metodom 3 mjeseca nakon intrastrijatalne primjene 6-OHDA (OHDA) ili otapala (CTR<sub>is</sub>), dok je jedna grupa životinja ostala netretirana (CTR<sub>int</sub>). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost koncentracije glutamata (ng/ml) po grupi  $\pm$  SEM. Podaci su analizirani neparametrijskim Kruskal-Walis i Mann Whitney U – testovima.

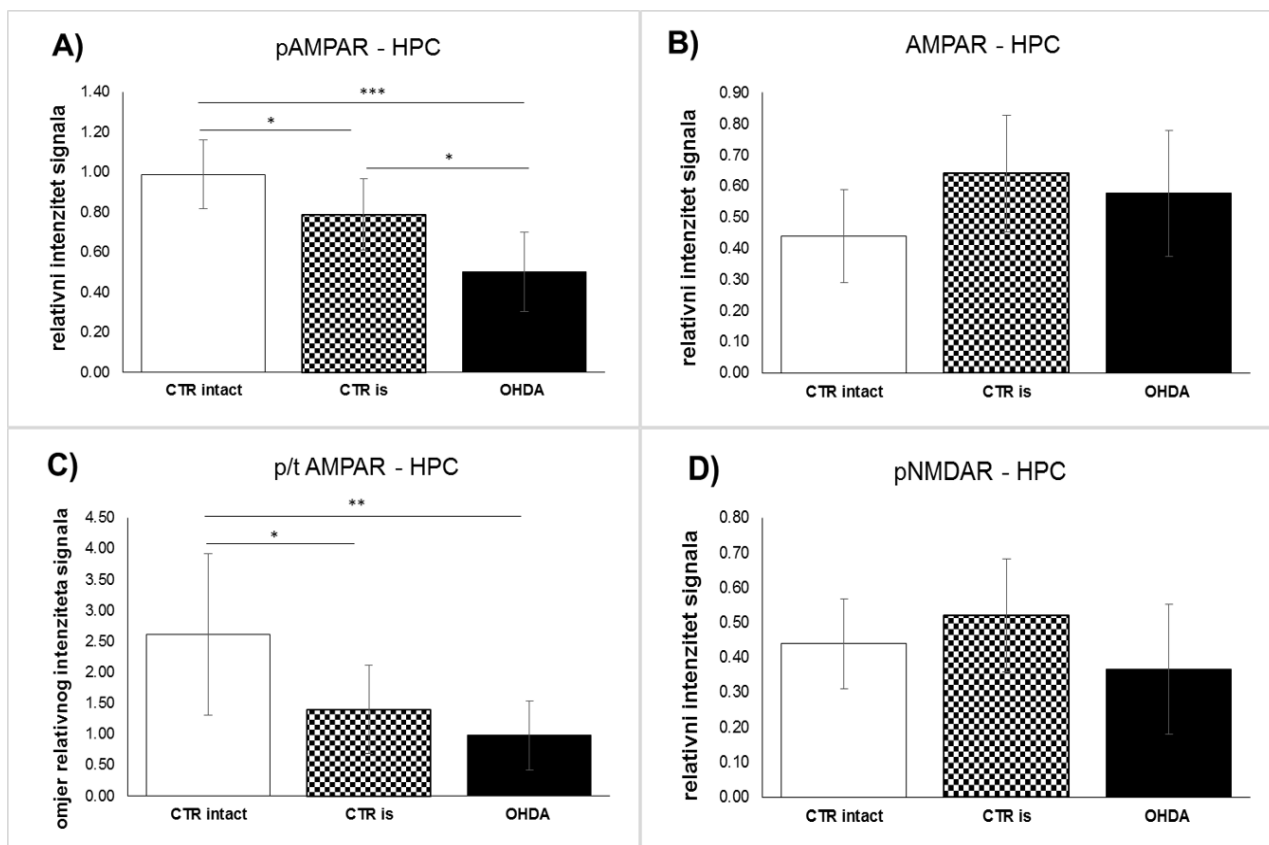
#### **4.4. Ekspresije proteina inzulinskoga i glutamatnoga signalnoga puta, te tirozin hidroksilaze u hipokampusu**

Analizom ukupne promjene proteinske ekspresije u hipokampusu dobivene westernskom metodom otiska (eng. *Western blot*), utvrđeno je statistički značajno smanjenje ekspresije tirozin hidroksilaze (TH) kod tretirane skupine (OHDA) naspram kontrolne (CTRint) intaktne skupine (-70,4%,  $p=0,0016$ ) i kontrolne skupine (CTRis) koja je intrastrijatalno dobila samo otapalo (-59,8%,  $p=0,0028$ ) (Slika 8A). Analiza ekspresije proteina koji sudjeluju u inzulinskom signalizacijskom sustavu (PI3K p85, IR, ERK) nije pokazala statistički značajne promjene u HPC-u (Slika 8B, C i D). Analizom ekspresije ukupnog glutamatnog AMPA receptora (AMPA) nije uočena statistički značajna promjena (Slika 9B), dok analiza njegovog fosforiliranog oblika (pAMPA) pokazuje statistički značajno smanjenje ekspresije kod tretirane (OHDA) skupine naspram kontrolne (CTRint) intaktne skupine (-49,2%,  $p=0,008$ ) i kontrolne skupine (CTRis) koja je intrastrijatalno dobila samo pufer (-36,3%,  $p=0,0176$ ). Statistički značajno smanjenje u ekspresiji pAMPA-a postoji i kod CTRis grupe naspram intaktnoj (CTRint) kontroli (-20,3%,  $p=0,0188$ ) (Slika 9A). Kao i kod fosforiliranog oblika, aktivacija AMPA receptora (prikazana kao omjer fosforiliranog i ukupnog AMPA) bila je statistički značajno niža u HPC-u OHDA skupine životinja naspram intaktne kontrole (-62,6%,  $p=0,0048$ ). Statistički značajno smanjenje u aktivaciji AMPA-a postoji i kod CTRis grupe naspram intaktnoj (CTRint) kontroli (-46,4%,  $p=0,0188$ ) (Slika 9C). Analizom ekspresije fosforiliranog oblika glutamatnog NMDAR receptora (pNMDAR) nije uočena statistički značajna promjena (Slika 9D).



**Slika 8. Ekspresija proteina inzulinskog signalnog puta i tirozin hidroksilaze u hipokampusu štakorskoga modela Parkinsonove bolesti.** Proteinska ekspresija u hipokampusu (HPC) tirozin hidroksilaze (TH/ **A**), inzulinskog receptora (IR/ **B**), fosfoinozid 3-kinaze p85 (PI3K p85/ **C**) i kinaze regulirane izvanstaničnim signalom (ERK/ **D**) mjerena je Westernskom metodom otiska 3 mjeseca nakon intrastrijatalne primjene 6-OHDA (OHDA) ili otapala (CTR is), dok je jedna grupa životinja ostala netretirana (CTR intact). Rezultati po skupinama (**A**, **B**, **C**, **D**) su prikazani kao srednje vrijednosti omjera signalnog intenziteta traženog proteina/ukupnih proteina na gelu  $\pm$  SEM pojedine skupine. Podaci su analizirani neparametrijskim Kruskal-Wallis i Mann-Whitney U testovima (\*\* $p < 0,01$ ).



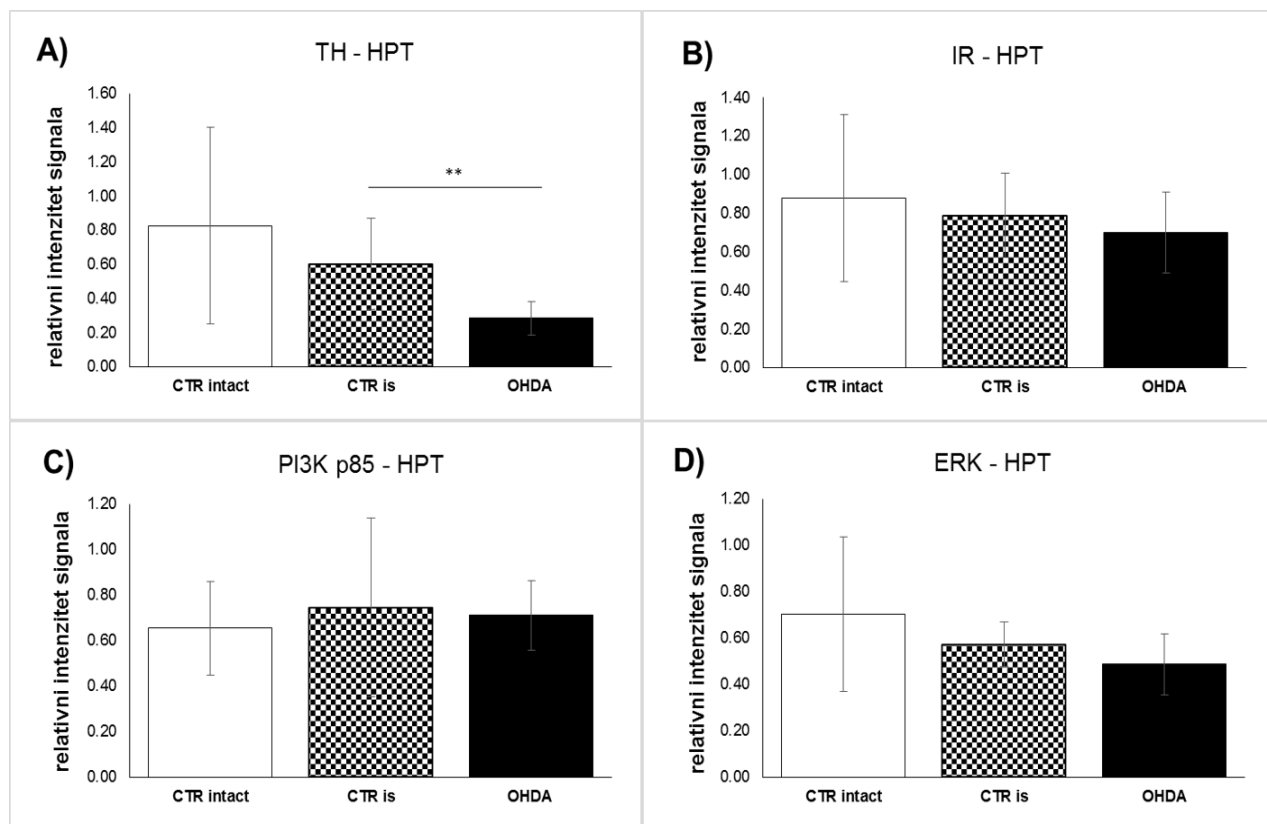


**Slika 9. Ekspresija glutamatnih receptora u hipokampusu štakorskoga modela Parkinsonove bolesti.**

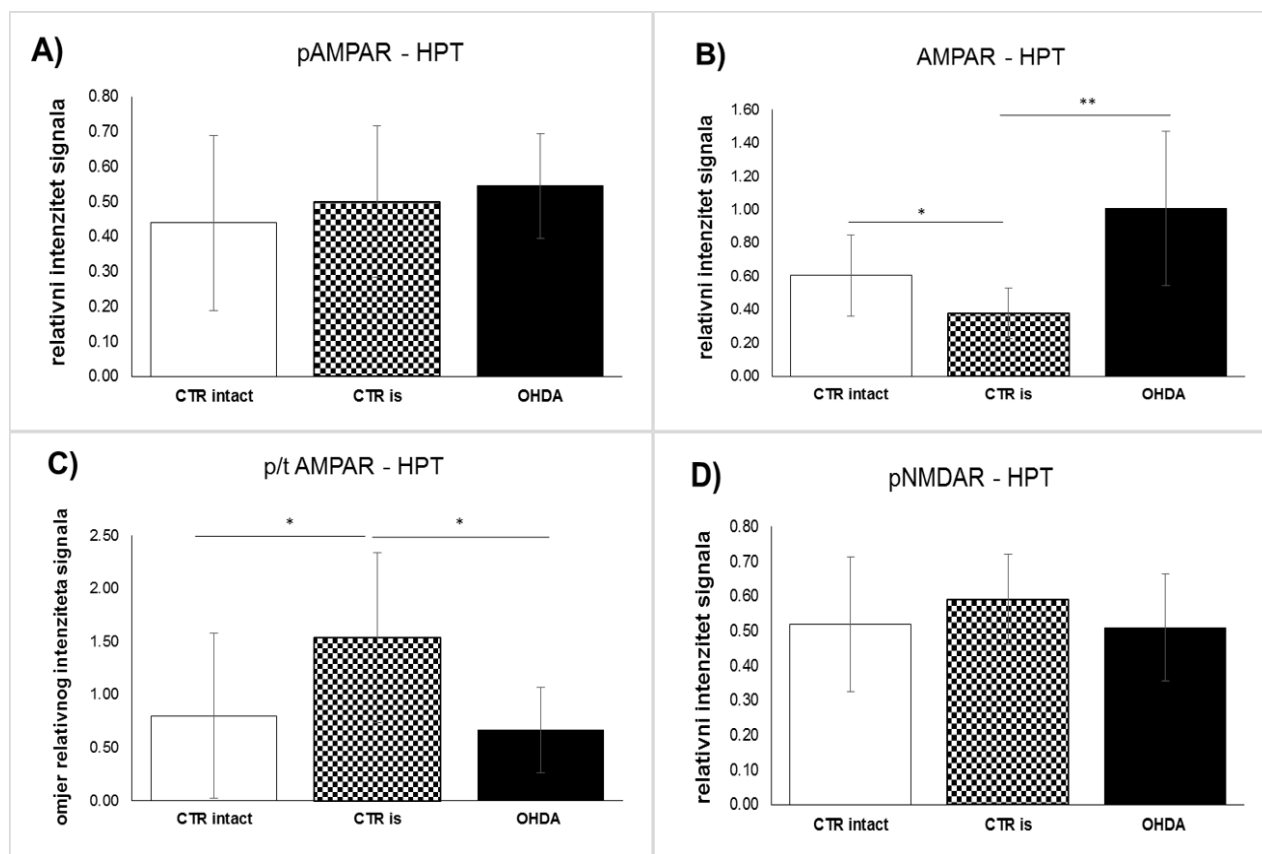
Proteinska ekspresija u hipokampusu (HPC) fosforiliranog AMPA receptora (pAMPAR/ **A**), AMPA receptora (AMPAR/ **B**) i fosforiliranog NMDA receptora (pNMDAR/ **D**) mjerena je Westernskom metodom otiska 3 mjeseca nakon intrastrijatalne primjene 6-OHDA (OHDA) ili otapala (CTRis), dok je jedna grupa životinja ostala netretirana (CTRint). Omjer fosforiliranog i ukupnog AMPAR proteina predstavlja aktivaciju AMPAR-a (**C**). Rezultati po skupinama (**A**, **B**, **E**) su prikazani kao srednje vrijednosti omjera signalnog intenziteta traženog proteina/ukupnih proteina na gelu  $\pm$  SEM pojedine skupine. Podaci su analizirani neparametrijskim Kruskal-Wallis i Mann-Whitney U - testovima (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

#### **4.5. Ekspresije proteina inzulinskoga i glutamatnoga signalnoga puta, te tirozin hidroksilaze u hipotalamusu**

Analizom ukupne promjene proteinske ekspresije u hipotalamusu dobivene westernskom metodom otiska (eng. *Western blot*) kontrolnih i štakora tretiranih s 6-OHDA nije pokazala statistički značajne promjene kod proteina koji sudjeluju u inzulinskom signalizacijskom sustavu (PI3K p85, IR, ERK) (Slika 10B-D), dok je u ekspresiji tirozin hidroksilaze (TH) vidljiva statistički značajna smanjena ekspresija kod tretirane (OHDA) skupine naspram kontrole koja je intrastrijatalno (CTR<sub>is</sub>) dobila samo otapalo (-52,7%, p=0,0076) (Slika 10A). Analizom fosforiliranog glutamatnog AMPA receptora (pAMPA) također nije uočena statistički značajna promjena (Slika 11A), dok analiza ukupnog AMPA receptora (AMPA) pokazuje statistički značajno povećanje ekspresije u OHDA skupini životinja naspram CTR<sub>is</sub> (+166,3% , p=0,0048) i smanjenje ekspresije kod skupine koja je intrastrijatalno (CTR<sub>is</sub>) dobila samo otapalo naspram intaktne (CTR<sub>int</sub>) kontrole (-48,6%, p=0,0244) (Slika 11B). Aktivacija AMPA receptora (prikazana kao omjer fosforiliranog i ukupnog AMPA) bila je statistički značajno viša u HPT-u kontrolne skupine koja je intrastrijatalno (CTR<sub>is</sub>) dobila samo otapalo, naspram intaktne (CTR<sub>int</sub>) i OHDA (+92,3% vs CTR<sub>int</sub>, p=0,0315; +131,3% vs OHDA, p=0.0360) skupine životinja (Slika 11C). Analizom ekspresije fosforiliranog oblika glutamatnog NMDAR receptora (pNMDAR) nije uočena statistički značajna promjena (Slika 11D).



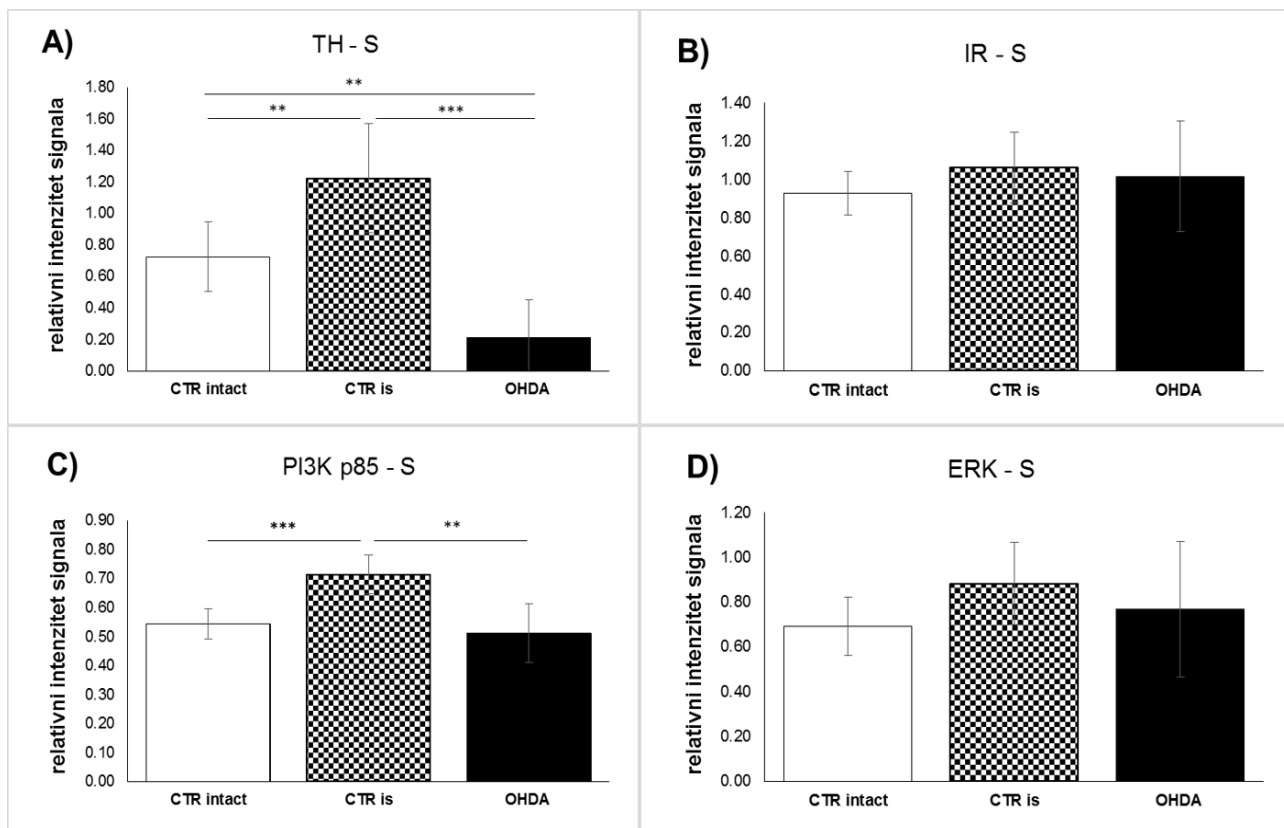
**Slika 10. Ekspresija proteina inzulinskog signalnog puta i tirozin hidroksilaze u hipotalamusu štakorskoga modela Parkinsonove bolesti.** Proteinska ekspresija u hipotalamusu (HPT) tirozin hidroksilaze (TH/ **A**), inzulinskog receptora (IR/ **B**), fosfoinozimid 3-kinaze p85(PI3K p85/ **C**) i kinaze regulirane izvanstaničnim signalom (ERK/ **D**) mjerena je Westernskom metodom otiska 3 mjeseca nakon intrastrijatalne primjene 6-OHDA (OHDA) ili otapala (CTR<sub>is</sub>), dok je jedna grupa životinja ostala netretirana (CTR<sub>int</sub>). Rezultati po skupinama (**A**, **B**, **C**, **D**) su prikazani kao srednje vrijednosti omjera signalnog intenziteta traženog proteina/ukupnih proteina na gelu ± SEM pojedine skupine. Podaci su analizirani neparametrijskim Kruskal-Wallis i Mann-Whitney U testovima (\*\* $p < 0,01$ ).



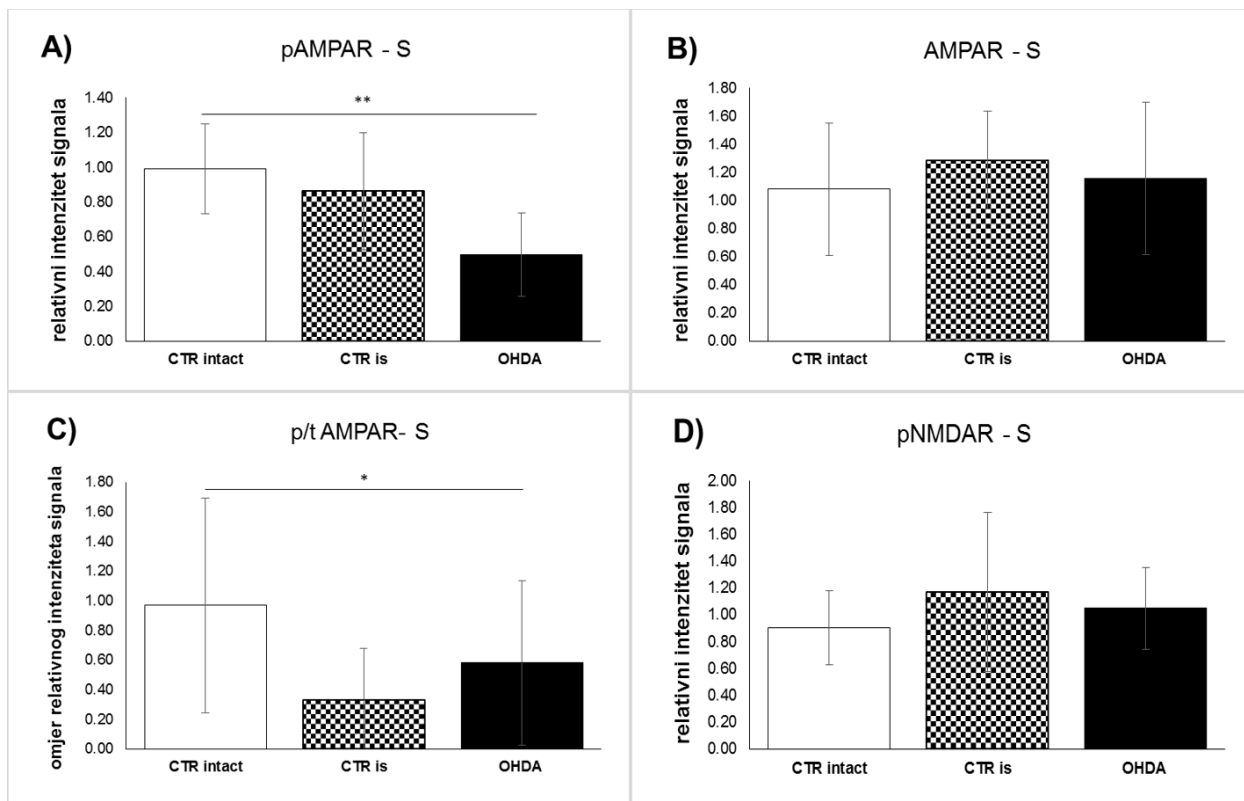
**Slika 11. Ekspresija glutamatnih receptora u hipotalamusu štakorskoga modela Parkinsonove bolesti.** Proteinska ekspresija u hipotalamusu (HPT) fosforiliranog AMPA receptora (pAMPA/ **A**), AMPA receptora (AMPA/ **B**) i fosforiliranog NMDA receptora (pNMDAR/ **D**) mjerena je Westernskom metodom otiska 3 mjeseca nakon intrastrijatalne primjene 6-OHDA (OHDA) ili otapala (CTRis), dok je jedna grupa životinja ostala netretirana (CTRint). Omjer fosforiliranog i ukupnog AMPAR proteina predstavlja aktivaciju AMPAR-a (**C**) Rezultati po skupinama (**A**, **B**, **D**) su prikazani kao srednje vrijednosti omjera signalnog intenziteta traženog proteina/ukupnih proteina na gelu  $\pm$  SEM pojedine skupine. Podaci su analizirani neparametrijskim Kruskal-Wallis i Mann-Whitney U testovima (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ).

#### **4.6. Ekspresije proteina inzulinskoga i glutamatnoga signalnoga puta, te tirozin hidroksilaze u strijatumu**

Analiza proteinske ekspresije dobivene westernskom metodom otiska (eng. *Western blot*) u strijatumu kontrolnih i štakora tretiranih s 6-OHDA pokazuje statistički značajne promjene u ekspresiji tirozin hidroksilaze (TH) (Slika 12A). Nakon intrastrijatalne primjene otapala (CTRis) primijećena je povećana ekspresija TH naspram intaktne kontrole (CTRint) (+68,8%,  $p=0,0040$ ), dok je primjena OHDA dovela do smanjenja TH ekspresije naspram obje kontrolne skupine (-70,9% vs CTRint,  $p=0,0048$ ; -82,1% vs CTRis,  $p=0,0004$ ) (Slika 12A). Promjena ekspresije proteina koji sudjeluju u inzulinskom signalizacijskom sustavu primijećena je samo u CTRis grupi; povećanje PI3K p85 proteinske ekspresije (+31,5% vs CTRint,  $p<0,0001$ ; +39,9% vs OHDA,  $p=0,0028$ ) naspram oba dvije grupe (Slika 12C). Uočena je smanjena ekspresija fosforilirane forme AMPAR receptora (pAMPAR) i aktivacije AMPAR receptora (prikazano kao omjer fosforiliranog i ukupnog AMPAR) nakon OHDA primjene u usporedbi s CTRint skupinom (pAMPAR: -49,9%,  $p=0,0047$ ; AMPAR omjer: -67%,  $p=0,0062$ ) (Slika 13) Analizom ekspresije fosforiliranog oblika glutamatnog NMDAR receptora (pNMDAR) nije uočena statistički značajna promjena (Slika 13D).



**Slika 12. Ekspresija proteina inzulinskog signalnog puta i tirozin hidroksilaze u strijatumu štakorskoga modela Parkinsonove bolesti.** Proteinska ekspresija u strijatumu (S) tirozin hidroksilaze (TH/ **A**), inzulinskog receptora (IR/ **B**), fosfoinozimid 3-kinaze p85(PI3K p85/ **C**) i kinaze regulirane izvanstaničnim signalom (ERK/ **D**) mjerena Westernskom metodom otiska 3 mjeseca nakon intrastrijatalne primjene 6-OHDA (OHDA) ili otapala (CTRis), dok je jedna grupa životinja ostala netretirana (CTRint). Rezultati po skupinama (**A**, **B**, **C**, **D**) su prikazani kao srednje vrijednosti omjera signalnog intenziteta traženog proteina/ukupnih proteina na gelu  $\pm$  SEM pojedine skupine. Podaci su analizirani neparametrijskim Kruskal-Wallis i Mann-Whitney U testovima (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).



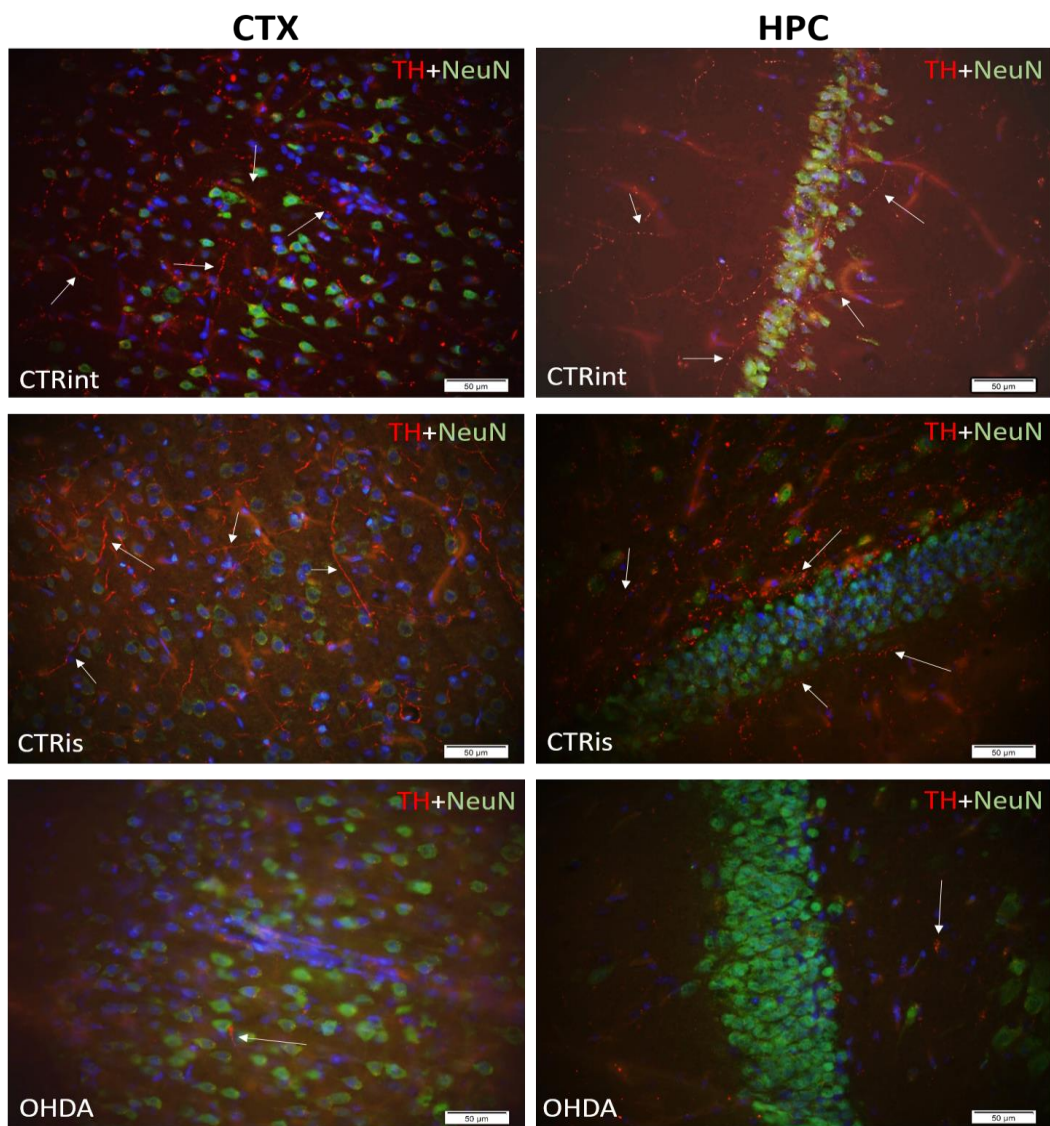
**Slika 13. Ekspresija glutamatnih receptora u strijatumu štakorskoga modela Parkinsonove bolesti.** Proteinska ekspresija u strijatumu (S) fosforiliranog AMPA receptora (pAMPAR/ **A**) i AMPA receptora (AMPAR/ **B**) i fosforiliranog NMDA receptora (pNMDAR/ **D**) mjerena je Westernskom metodom otiska 3 mjeseca nakon intrastrijatalne primjene 6-OHDA (OHDA) ili otapala (CTRis), dok je jedna grupa životinja ostala netretirana (CTRint). Omjer fosforiliranog i ukupnog AMPAR proteina predstavlja aktivaciju AMPAR-a (**C**) Rezultati po skupinama (**A**, **B**, **D**) su prikazani kao srednje vrijednosti omjera signalnog intenziteta traženog proteina/ukupnih proteina na gelu  $\pm$  SEM pojedine skupine. Podaci su analizirani neparametrijskim Kruskal-Wallis i Mann-Whitney U testovima (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

## **4.7. Imunofluorescencija tirozin hidroksilaze (TH) u mozgu štakorskog modela Parkinsonove bolesti**

### **4.7.1. Ekspresija tirozin hidroksilaze u parijetalnom korteksu i hipokampusu**

Imunofluorescencijska analiza ekspresije tirozin hidroksilaze i neuronalnog markera pokazuje da intrastrijatalna primjena 6-OHDA smanjuje ekspresiju tirozin hidroksilaze u obe promatrane regije mozga, parijetalnom korteksu (CTX) i u hipokampusu (HPC) u usporedbi s kontrolnim skupinama, gdje je ekspresija jasno vidljiva (označeno bijelim strjelicama) (Slika 14).

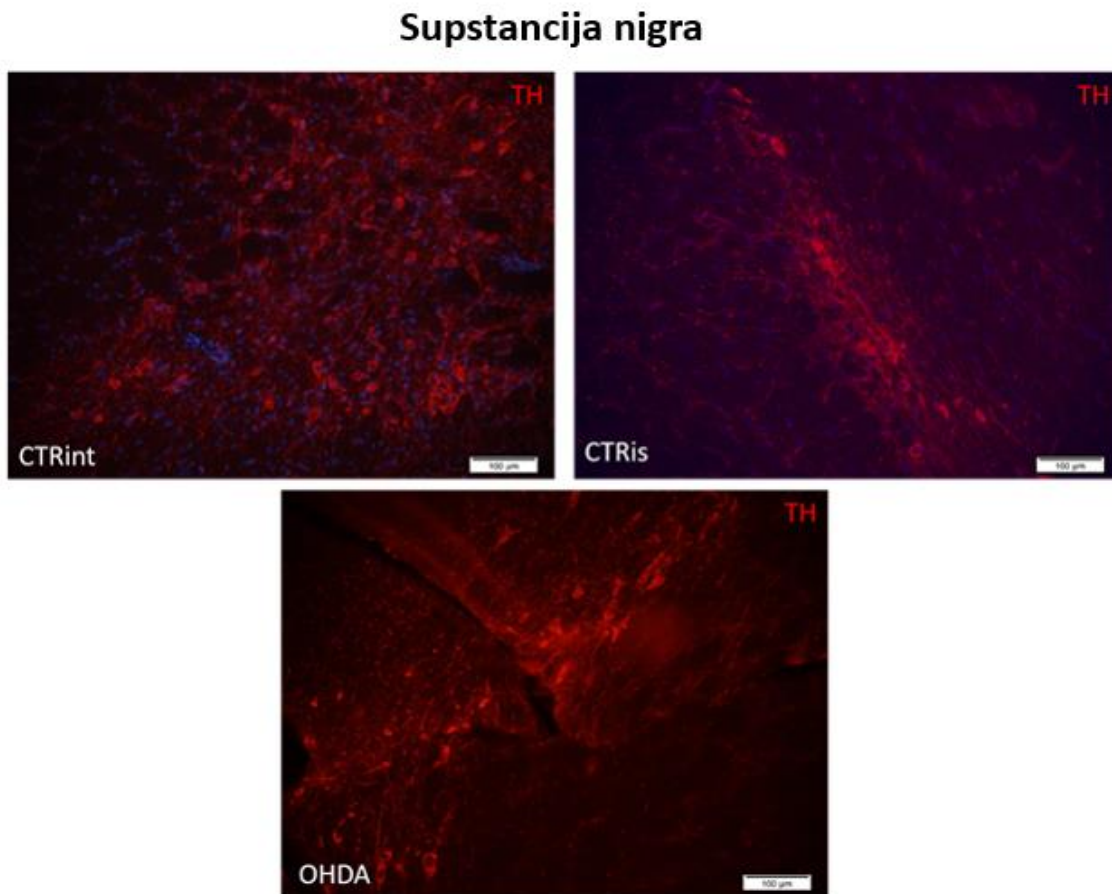




**Slika 14. Ekspresija tirozin hidroksilaze u hipokampusu i parijetalnom korteksu.** Imunofluorescentni prikaz ekspresije tirozin hidroksilaze (TH; crveno obojenje), markera neurora (NeuN; zeleno obojenje) + DAPI (plavo obojenje) u reprezentativnim prerezima parijetalnog korteksa (CTX) i hipokampusa (HPC) intaktnih kontrolnih životinja (CTRint), kontrolnih životinja intrastrijatalno tretiranih otapalom (CTRis) i 6-OHDA-intrastrijatalno tretiranih životinja (OHDA) 3 mjeseca nakon 6-OHDA primjene.

#### 4.7.2. Ekspresija tirozin hidroksilaze u supstanciji nigri

Imunofluorescencijska analiza ekspresije tirozin hidroksilaze (TH) i neuronalnog markera pokazuje da intrastrijatalna primjena 6-OHDA ne smanjuje ekspresiju tirozin hidroksilaze u bazalnoj jezgri supstanciji nigri u usporedbi s kontrolnim skupinama (Slika 15), a za razliku od smanjene ekspresije primijećene u drugim promatranim regijama mozga.



**Slika 15. Ekspresija tirozin hidroksilaze supstanciji nigri.** Imunofluorescentni prikaz ekspresije tirozin hidroksilaze (TH; crveno obojenje) u reprezentativnim prerezima supstancije nigre intaktnih kontrolnih životinja (CTRint), kontrolnih životinja intrastrijatalno tretiranih otapalom (CTRis) i 6-OHDA-intrastrijatalno tretiranih životinja (OHDA) 3 mjeseca nakon 6-OHDA primjene.

## 5. RASPRAVA

Bilateralnom intrastrijatalnom primjenom 6-OHDA, dolazi do degeneracije dopaminergičkih neurona, što uzrokuje kognitivne i motoričke deficite u štakorskom modelu bolesti. S obzirom da je dopamin ključan neurotransmiter u prepoznavanju novih stimulansa i očuvanja neuronske plastičnosti jer regulira ekspresiju esencijalnih proteina za stvaranje iste (Madadi Asl i sur, 2019), pojava poremećaja u pamćenju i učenju očekivana je kod životinja tretiranih 6-OHDA toksinom. U ovom istraživanju, 6-OHDA skupina pokazuje disfunkcije prostorno-vizualnog pamćenja i učenja te motoričkih sposobnosti 3 mjeseca nakon intrastrijatalne primjene 6-OHDA (Slika 2-5). Važno je istaknuti da je u ovom istraživanju korišten životinjski model koji pokreće dopaminergičku degeneraciju u obje hemisfere (bilateralna primjena), što je važno za pojavu cijelog spektra bihevioralnih simptoma bolesti (Hernandez-Baltazar i sur, 2017). Neki autori smatraju da je lošija izvedba na kognitivnim testovima, kao i testovima motorike, često rezultat neuropsihijatrijskih poremećaja poput anksioznosti i depresije (Campos i sur, 2013). Rezultati potvrđuju da štakorski 6-OHDA model PB-a izaziva karakteristične motoričke simptome bolesti, kao i promjene u kognitivnoj sposobnosti, a mnogi autori opisane promjene povezuju sa smanjenjem broja TH-pozitivnih neurona u SNpc i strijatumu (Su i sur, 2018). Naime supstancija nigra kao komponenta bazalnog ganglija, uz ventralno tegmentalno područje (VTA), najvažniji je izvor dopamina (većina dopaminergičkih neurona koncentrirana je u SNpc). Dopamin se u nigrostrijatalnom putu projicira iz SNpc do dorzalnog strijatuma, a u područje hipokampusa i hipotalamusa iz VTA i SNpc (Bourdy i sur, 2014). Kako je tirozin hidroksilaza ključna u sintezi dopamina u mozgu, očekivano je da će deplecijom dopaminergičkih neurona doći do smanjenja TH pozitivnih neurona u promatranim dijelovima mozga (Daubner i sur, 2011). Istraživanja u kojima je primijenjena intrastrijatalna injekcija 6-OHDA, potvrdila su polagano, ali progresivno smanjenje gustoće TH pozitivnih vlakana u strijatumu štakorskog modela PB-a, te oštećenje strijatalnog terminala unutar jednog dana od injekcije, a gubitak neurona u SNpc dosegao je maksimum unutar 2-3 tjedna (Tadaiesky i sur, 2008). Rezultati ovog istraživanja potvrđuju smanjenje ekspresije TH u promatranim regijama, pogotovo u strijatumu, dok su dopaminergičke jezgre u supstanciji nigri ostale očuvane.

Važnost inzulina u metabolizmu glukoze u mozgu dobila je na značaju u posljednjih nekoliko desetljeća istraživanjem patogeneze neurodegenerativnih bolesti poput Alzheimerove i Parkinsonove bolesti. Eksperimentalni dokazi podupiru hipotezu o biosintezi inzulina u neuronima izvedenim iz hipokampusa i olfaktornog bulbusa (Kuwabara i sur, 2011) te piramidalnim neuronima u parijetalnoj kori (Dorn i sur, 1982).

Imunoreaktivni inzulin i C-peptid pronađeni su u ljudskom mozgu *post mortem*, a hibridizacija *in situ* pokazala je prisutnost inzulinske mRNA u periventrikularnoj jezgri hipotalamusa štakora (Blázquez i sur, 2014). Druge studije nisu potvrdile ove rezultate, a nedostaju uvjerljivi dokazi o značajnim količinama sintetiziranog inzulina u mozgu. Velika gustoća IR-a pronađena je u hipokampusu, korteksu i amigdali, gdje sudjeluju u kognitivnim funkcijama (Gerozissis, 2003). Učinci inzulina na kogniciju uključuju signalizacijsku kaskadu PI3K/Akt (McNay i Recknagel, 2011) jer aktivacija PI3K/Akt puta je bitna za očuvanje memorije (Goldin i Segal, 2003). Ključni inzulinski efektor u PI3K/Akt kaskadi, uključen u očuvanje kognitivne funkcije je glikogen-sintaza-kinaza  $\beta$  (GSK3 $\beta$ ). Inzulin povećava inhibitornu fosforilaciju GSK3 $\beta$  putem PI3K/Akt signalizacijskog puta, a fosforilacija GSK3 $\beta$  ključna je za poboljšanje dugoročne memorije kod zadataka povezanih s hipokampusom, smanjuje nakupljanje alfa-sinukleina i neurotoksičnost te smanjuje neuroinflamaciju i apoptozu. Zaključno, inzulin ublažava kognitivno oštećenje kod PB-a inaktivacijom GSK3 $\beta$  posredovanom PI3K/Akt kaskadom, a narušavanjem inzulinske signalizacije u mozgu, dolazi do pogoršanja kognitivnog oštećenja (Yang i sur, 2018). Studijom provedenom 2015. godine, otkriveno je da  $\alpha$ -sinuklein povećava inhibitornu fosforilaciju IRS-a u ostacima serina, negativno regulirajući signalizaciju inzulina (Gao i sur, 2015). S obzirom na činjenicu da 6-OHDA model ne reproducira prisutnost Lewyjevih tjelešaca čija je ključna komponenta protein  $\alpha$ -sinuklein, modeli koji uključuju intracerebralne injekcije  $\alpha$ -sinukleina mogli bi biti ključni za razumijevanje degeneracije nigrostrijatalnog puta i njegovog utjecaja na druge jezgre mozga i u konačnici, na inzulinsku signalizaciju. Iako se povezanost inzulinske rezistencije sve više povezuje s Parkinsonovom bolesti, ovaj mehanizam nije još uvijek do kraja jasno istražen. Zanimljivo je da pacijenti s PB-om pokazuju povećanu autoimunu reaktivnost na inzulin (Wilhelm i sur, 2007). Štoviše, u pacijenata s PB-om, smrt dopaminergičkih neurona u SNpc često se povezuje s izrazitim gubitkom IR mRNA i povećanom razinom fosforilacije IRS-a u ostacima serina, s inhibitornim djelovanjem na signalizaciju inzulina i kasnije povećanom rezistencijom na inzulin (Morris i sur, 2014). Za razliku od literaturnih podataka (Wilhelm i sur, 2007; Morris i sur, 2014), naši rezultati ne pokazuju značajne promjene u signalizaciji inzulinskog kaskadnog puta u životinja tretiranih s 6-OHDA, ali tendencija smanjenja koncentracije inzulina postoji u hipotalamusu i strijatumu (Slika 6). Ovakav rezultat mogao bi biti povezan sa saznanjem da su mjerenja inzulinske rezistencije pokazala ovisnost učinka poremećaja inzulinske signalizacije u mozgu o primijenjenoj dozi toksina, pri čemu skupine s izrazitom deplecijom dopaminergičkih neurona pokazuju veće učinke poremećaja u inzulinskoj signalizaciji od skupine s djelomičnom deplecijom (Morris i sur, 2008). Postoji mogućnost da bi promjene u ekspresiji proteina inzulinskog signalizacijskog puta bile primijećene u ranijim i/ili kasnijim vremenskim točkama nakon 6-OHDA primjene od onih korištenih u ovom istraživanju.

Promjene u glutamatoj signalizaciji kod PB-a često se povezuju s pojavom glutamatne ekscitotoksičnosti za koju se smatra da može predstavljati jedan od glavnih faktora pri razvoju demencije u kasnijim stadijima PB-a. Dokazano je da glutamatni AMPA receptori sudjeluju u modulaciji neuronske ekscitabilnosti i dugoročne sinaptičke plastičnosti, te su povezani s promijenjenom neurotransmisijom kod Parkinsonove bolesti (Chater i Goda, 2014). Analizom proteinske ekspresije AMPA receptora i njegovog fosforiliranog oblika te promjene u aktivaciji AMPA receptora, uočili smo značajne promjene u sve 3 regije mozga. Primijećeno je smanjenje aktivacije AMPA receptora u HPC-u i S-u 3 mjeseca nakon bilateralne intrastrijatalne primjene 6-OHDA, što upućuje na smanjenu glutamatnu signalizaciju u tim regijama mozga, te postoji mogućnost da takvo smanjenje u HPC-u ima utjecaj na pojavu kognitivnog deficita. Prethodnim studijama uočeno je da dolazi do redukcije AMPA receptora u SNpc u mozgu pacijenata s PB-om i miševa tretiranih MPTP toksinom kao npr. u transgeničnom mišjem modelu mutiranog  $\alpha$ -sinukleina, gdje je uočeno da nakupljanje  $\alpha$ -sinukleina u astrocitima utječe na transport glutamata, izazivajući porast izvanstanične koncentracije glutamata i pojave ekscitotoksičnosti, što je dodatno pogoršalo oštećenje dopaminergičkih neurona (Gu i sur, 2010). Osim toga, neke su studije otkrile da  $\alpha$ -sinuklein također može povećati ekscitotoksičnost glutamata ubrzavajući AMPAR signaliziranje, što dovodi do prenakupljanja  $\text{Na}^+$  i rezultira povećanjem međustanične propusnosti i akutnim oticanjem stanica (Hüls i sur, 2011.). Abnormalna agregacija  $\alpha$ -sinukleina u PB-u usko je povezana s ekscitacijskom toksičnošću glutamata, a kao što je već navedeno, u 6-OHDA modelu ne dolazi do stvaranja staničnih inkluzija koje sadrže  $\alpha$ -sinuklein, stoga se promjena u ekspresiji glutamatnih receptora u ovom modelu, pogotovo AMPA receptora, povezuje s redukcijom TH pozitivnih neurona. He i suradnici u svom radu (He i sur, 1998) su pokazali kako direktna primjena 6-OHDA u SNpc, smanjuje ekspresiju AMPA receptora, uključujući i njegove podjedinice GluR1, GluR2 i GluR3, ali ne i GluR4. Rezultat navedene publikacije (He i sur, 1998) mogao bi sugerirati da podjedinice AMPA receptora mogu imati različite uloge u patogenezi Parkinsonove bolesti i razvoja simptoma te drugačiji način primjene samog toksina mogao bi dovesti do različite ekspresije i aktivacije AMPA receptora u mozgu, čije promjene u ekspresiji i aktivaciji su primijećene i u ovom istraživanju u ovisnosti o regiji. Također, smanjenje ekspresije AMPAR-a moglo bi biti povezano sa redukcijom TH pozitivnih neurona, s obzirom da je u istraživanju ekspresija AMPA receptora, GluR1 podjedinice, bila snižena zajedno s pojavom lezija i smanjenjem TH pozitivnih neurona nakon primjene 6-OHDA (He i sur, 1998). Za razliku od našeg istraživanja u radu autora He i sur. (1998) ekspresija je promatrana samo u regiji supstanciji nigri. Naši rezultati sugeriraju na sniženje aktivacije AMPAR-a i ekspresije TH u HPC-u i S-u, dok u hipotalamusu sniženje ekspresije TH nije slijedila promjena u AMPAR aktivaciji 3 mjeseca nakon 6-OHDA primjene. Sama intrastrijatalna primjena je dovoljno invazivna da uzrokuje promjene u ekspresiji promatranih proteina, koje su bile mnogo izraženije nakon 6-OHDA primjene.

Promatranjem ekspresije proteina uključenih u inzulinsku signalizaciju u štakorskom 6-OHDA modelu nisu nađene značajne promjene koje bi mogle ukazati na povezanost inzulinskog signalizacijskog puta s kognitivnim deficitom, iako je dokazano da inzulin, inzulinski receptori i inzulinske signalne kaskade imaju značajnu ulogu u neuroprotekciji i sinaptičkoj plastičnosti mozga (Duarte i sur, 2012).

Uz motorički i kognitivni deficit uočeno je smanjenje ekspresije TH i snižena aktivacija AMPAR-a u hipokampusu i strijatumu, upućujući na moguću povezanost disfunkcije glutamatne signalizacije i kognitivnog deficita u štakorskom modelu Parkinsonove bolesti. Kako bismo razjasnili točnu ulogu i povezanost dopaminergičkog i glutamatnog sustava s razvojem kognitivnog deficita u štakorskom modelu PB-a potrebna su dodatna istraživanja.

## 6. ZAKLJUČCI

- 1) Motorički i kognitivni deficit uočen je 3 mjeseca nakon bilateralne intrastrijatalne primjene 6-OHDA u usporedbi s intaktnom kontrolom i kontrolom kojoj je intrastrijatalno aplicirano otapalo.
- 2) Koncentracija inzulina u hipotalamusu i strijatumu pokazuje tendenciju smanjenja nakon bilateralne intrastrijatalne primjene 6-OHDA.
- 3) Bilateralna intrastrijatalna primjena 6-OHDA ne dovodi do promjene ekspresije proteina uključenih u inzulinsku signalizaciju niti u jednoj promatranoj regiji.
- 4) Aktivacija AMPA receptora nađena je snižena u hipokampusu i strijatumu 3 mjeseca nakon bilateralne intrastrijatalne primjene 6-OHDA, dok u hipotalamusu nije primijećena promjena u aktivaciji.
- 5) Nije uočena statistički značajna promjena ekspresije fosforiliranog oblika glutamatnog NMDAR receptora.
- 6) Ekspresija tirozin hidroksilaze snižena je u svim promatranim regijama 3 mjeseca nakon bilateralne intrastrijatalne primjene 6-OHDA, dok su jezgre u supstanciji nigri ostale očuvane.
- 7) Sama intrastrijatalna primjena otapala dovodi do promjene u ekspresiji promatranih proteina u usporedbi s intaktnom kontrolom, ali je promjena izraženija nakon primjene 6-OHDA.

## 7. LITERATURA

Amalric M., Moukhles H., Nieoullon A., Daszuta A. (1995): Complex Deficits on Reaction Time Performance following Bilateral Intrastratial 6-OHDA Infusion in the Rat. *European Journal of Neuroscience* 7: 972-980.

Athauda D., Foltynie T. (2016): Insulin resistance and Parkinson's disease: A new target for disease modification? *Progress in Neurobiology* 145–146: 98-120.

Ayala A., Triviño-Juárez J. M., Forjaz M. J., Rodríguez-Blázquez C., Rojo-Abuin J. M., Martínez-Martín P. (2017): Parkinson's Disease Severity at 3 Years Can Be Predicted from Non-Motor Symptoms at Baseline. *Frontiers in neurology* 8: 551.

Barcia C. (2013): Glial-mediated inflammation underlying parkinsonism. *Scientifica* 357805.

Bergman H., Wichmann T., Karmon B., DeLong M. R. (1994): The primate subthalamic nucleus. II. Neuronal activity in the MPTP model of parkinsonism. *Journal of neurophysiology* 72(2): 507–520.

Blázquez E., Velázquez E., Hurtado-Carneiro V., Ruiz-Albusac J. M. (2014): Insulin in the brain: its pathophysiological implications for States related with central insulin resistance, type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Frontiers in endocrinology* 5:161.

Blum D., Torch S., Lambeng N., Nissou M., Benabid A. L., Sadoul R., Verna, J. M. (2001): Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Progress in neurobiology* 65(2): 135–172.

Bonnet, A. M., Jutras, M. F., Czernecki, V., Corvol, J. C., Vidailhet, M. (2012): Nonmotor symptoms in Parkinson's disease in 2012: relevant clinical aspects. *Parkinson's disease* 198316.

Bourdy R., Sánchez-Catalán M. J., Kaufling J., Balcita-Pedicino J. J., Freund-Mercier M. J., Veinante P., Sesack S. R., Georges F., Barrot M. (2014): Control of the nigrostriatal dopamine neuron activity and motor function by the tail of the ventral tegmental area. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 39(12): 2788–2798.

Branchi I., D'Andrea I., Armida M., Cassano T., Pèzzola A., Potenza R. L., Morgese M. G., Popoli P., Alleva E. (2008): Nonmotor symptoms in Parkinson's disease: investigating early-phase onset of behavioral dysfunction in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat model. *Journal of neuroscience research* 86(9): 2050–2061.



Buckley T.A., Pitsikoulis C., Hass C.J. (2008): Dynamic postural stability during sit-to-walk transitions in Parkinson disease patients. *Movement Disorders* 23: 1274-1280.

Campos F.L., Carvalho M.M., Cristovão A.C., Je G., Baltazar G., Salgado A.J., Kim Y.S., Sousa N. (2013): Rodent models of Parkinson's disease: beyond the motor symptomatology. *Frontiers in behavioral neuroscience* 7: 175.

Chater T.E., Goda Y. (2014): The role of AMPA receptors in postsynaptic mechanisms of synaptic plasticity. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8:401

Cookson M.R. (2009): Alpha-Synuclein and neuronal cell death. *Molecular neurodegeneration* 4: 9.

Daubner S.C., Le T., Wang S. (2011): Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Archives of biochemistry and biophysics* 508(1): 1–12.

De Pablo-Fernández E., Breen D.P., Bouloux P.M., Barker R.A., Foltynie T., Warner T.T. (2017): Neuroendocrine abnormalities in Parkinson's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 88(2): 176–185

Deumens R., Blokland A., Prickaerts J. (2002): Modeling Parkinson's Disease in Rats: An Evaluation of 6-OHDA Lesions of the Nigrostriatal Pathway. *Experimental Neurology* 175 (2): 303-317.

Dorn A., Rinne A., Hahn H.J., Bernstein H.G., Ziegler M. (1982): C-peptide immunoreactive neurons in human brain. *Acta histochemica* 70(2): 326–330.

Dovzhenok A., Rubchinsky, L.L. (2012): On the origin of tremor in Parkinson's disease. *PloS one* 7(7): e41598.

Duarte, A.I., Moreira, P.I., & Oliveira, C.R. (2012): Insulin in central nervous system: more than just a peripheral hormone. *Journal of aging research* 384017.

Fahn, S., Brin, M.F., Dwork, A.J., Weiner, W.J., Goetz, C.G., Rajput, A.H. (1996): Case 1, 1996: rapidly progressive parkinsonism, incontinence, impotency, and levodopa-induced moaning in a patient with multiple myeloma. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society* 11(3): 298–310.

Fahn S. (2008): *Clinical Aspects of Parkinson Disease*. Academic Press (1): 1-8

Featherstone D.E. (2010): Intercellular glutamate signaling in the nervous system and beyond. *ACS chemical neuroscience* 1(1): 4–12.

Fiory F., Perruolo G., Cimmino I., Cabaro S., Pignalosa F.C., Miele C., Beguinot F., Formisano P., Oriente F. (2019): The Relevance of Insulin Action in the Dopaminergic System. *Frontiers in neuroscience* 13: 868.

Galvan A., Wichmann T. (2008): Pathophysiology of Parkinsonism. *Clinical Neurophysiology* 119 (7): 1459-1474

Gerozissis K. (2003): Brain insulin: regulation, mechanisms of action and functions. *Cellular and molecular neurobiology* 23(1): 1–25.

Goldin M., Segal M. (2003): Protein kinase C and ERK involvement in dendritic spine plasticity in cultured rodent hippocampal neurons. *The European journal of neuroscience* 17(12): 2529–2539.

Gao S., Duan C., Gao G., Wang X., Yang H. (2015): Alpha-synuclein overexpression negatively regulates insulin receptor substrate 1 by activating mTORC1/S6K1 signaling. *The international journal of biochemistry & cell biology* 64: 25–33.

Gu X.L., Long C.X., Sun L., Xie C., Lin X., Cai H. (2010): Astrocytic expression of Parkinson's disease-related A53T alpha-synuclein causes neurodegeneration in mice. *Molecular brain* 3: 12.

Hernandez-Baltazar D., Zavala-Flores L.M., Villanueva-Oliv A. (2017): The 6-hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: Novel findings in an older model. *Neurología (English Edition)* 32(8): 533-539.

Hüls S., Högen T., Vassallo N., Danzer K. M., Hengerer B., Giese A., Herms, J. (2011): AMPA-receptor-mediated excitatory synaptic transmission is enhanced by iron-induced  $\alpha$ -synuclein oligomers. *Journal of neurochemistry* 117(5): 868–878.

He Y., Lee T., Leong S.K. (1998): Effect of 6-OHDA injection on the AMPA glutamate receptor subunits in the substantia nigra of Sprague–Dawley rats. *Neuroscience Letters* 241(1): 1-4

Hritcu L., Ciobica A. & Artenie V. (2008): Effects of right-unilateral 6-hydroxydopamine infusion-induced memory impairment and oxidative stress: relevance for Parkinson's disease. *Open Life Sciences* 3: 250–257.

Iancu R., Mohapel P., Brundin P., Paul G. (2005): Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. *Behavioural brain research* 162(1): 1–10.

Iovino L., Tremblay M. E., & Civiero L. (2020): Glutamate-induced excitotoxicity in Parkinson's disease: The role of glial cells. *Journal of pharmacological sciences* 144(3): 151–164.

Karakas E., Regan M. C., Furukawa H. (2015): Emerging structural insights into the function of ionotropic glutamate receptors. *Trends in biochemical sciences* 40(6): 328–337.

Kimmell K., Pulusu VK, Bharucha KJ, Ross ED. (2015.) Postural instability in Parkinson Disease: To step or not to step. *Journal of the Neurological Sciences* 357(1–2): 146-151.

Kumar H., Lim H.W., More S.V., Kim B.W., Koppula S., Kim I.S., Choi D.K. (2012): The role of free radicals in the aging brain and Parkinson's Disease: convergence and parallelism. *International journal of molecular sciences* 13(8): 10478–10504.

Kuwabara T., Kagalwala M.N., Onuma Y., Ito Y., Warashina M., Terashima K., Sanosaka T., Nakashima K., Gage F.H., Asashima M. (2011): Insulin biosynthesis in neuronal progenitors derived from adult hippocampus and the olfactory bulb. *EMBO molecular medicine* 3(12): 742–754.

Lanciego J.L., Luquin N., Obeso J.A. (2012): Functional neuroanatomy of the basal ganglia. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2(12): a009621.

Langston W.J. (1985): MPTP and parkinson's disease. *Trends in Neurosciences* 8: 79-83.

Leroi I., Pantula H., McDonald K., Harbishettar V. (2012): Neuropsychiatric symptoms in Parkinson's disease with mild cognitive impairment and dementia. *Parkinson's disease* 308097.

Madadi Asl M., Vahabie A. H., Valizadeh A. (2019): Dopaminergic modulation of synaptic plasticity, its role in neuropsychiatric disorders, and its computational modeling. *Basic and clinical neuroscience* 10(1): 1–12.

McNay E.C., Recknagel A.K. (2011): Brain insulin signaling: a key component of cognitive processes and a potential basis for cognitive impairment in type 2 diabetes. *Neurobiology of learning and memory* 96(3): 432–442.

Meredith G.E., Totterdell S., Beales M., Meshul C.K. (2009): Impaired glutamate homeostasis and programmed cell death in a chronic MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Experimental neurology* 219(1): 334–340.

Metz G.A., Tse A., Ballermann M., Smith L.K., Fouad K. (2005): The unilateral 6-OHDA rat model of Parkinson's disease revisited: an electromyographic and behavioural analysis. *European Journal of Neuroscience* 22: 735-744.

Morris J. K., Zhang H., Gupte A. A., Bomhoff G. L., Stanford J.A., Geiger, P.C. (2008). Measures of striatal insulin resistance in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Brain research* 1240: 185–195.

Morris J.K., Vidoni E.D., Perea R.D., Rada R., Johnson D.K., Lyons K., Pahwa R., Burns J.M., Honea R.A. (2014): Insulin resistance and gray matter volume in neurodegenerative disease. *Neuroscience* 270: 139–147.

Olsson M., Nikkhah G., Bentlage C., Björklund A. (1995): Forelimb akinesia in the rat Parkinson model: differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 15(5 Pt 2): 3863–3875.

Porter C.C., Totaro J.A., Stone C.A. (1963): Effect of 6-hydroxydopamine and some other compounds on the concentration of norepinephrine in the hearts of mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 140: 308–316

Przedborski S., Vila M. (2003): The 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model: a tool to explore the pathogenesis of Parkinson's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 991: 189–198.

Ramsden D.B., Parsons R.B., Ho S.L., Waring R.H. (2001): The aetiology of idiopathic Parkinson's disease. *Molecular pathology* 54(6): 369–380.

Schapira A.H., Jenner P. (2011): Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Movement Disorders* 26: 1049-1055.

Schober A. (2004): Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell and tissue research* 318(1): 215–224.

Schubert M., Gautam D., Surjo D., Ueki K., Baudler S., Schubert D., Kondo T., Albe, J., Galldiks N., Küstermann E., Arndt S., Jacobs A.H., Krone W., Kahn C.R., Brüning J. C. (2004): Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(9): 3100–3105.

Senoh S., Witkop B. (1959): Nonenzymatic conversions of dopamine to norepinephrine and trihydroxyphenethylamine. *Journal of the American Chemical Society* 81: 6222–6231

Shiner T., Seymour B., Symmonds M., Dayan P., Bhatia KP.(2012): The Effect of Motivation on Movement: A Study of Bradykinesia in Parkinson's Disease. *PloS one* 7(10): e47138.

Simola N., Morelli M., Carta A.R. (2007): The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity research* 11(3-4): 151–167.

Solari N., Bonito-Oliva A., Fisone G., Brambilla R. (2013). Understanding cognitive deficits in Parkinson's disease: lessons from preclinical animal models. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 20(10): 592–600.

Su R., Zhen J., Wang W., Zhang J., Zheng Y., & Wang X. (2018): Time-course behavioral features are correlated with Parkinson's disease-associated pathology in a 6-hydroxydopamine hemiparkinsonian rat model. *Molecular Medicine Reports* 17: 3356-3363.

Tadaiesky M.T., Dombrowski P.A., Figueiredo C.P., Cargnin-Ferreira E., Da Cunha C., Takahashi, R.N. (2008). Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 156(4): 830–840.

Wang J., Wang F., Mai D., Qu S. (2020): Molecular Mechanisms of Glutamate Toxicity in Parkinson's Disease. *Frontiers in neuroscience* 14: 585584.

Wilhelm K. R., Yanamandra K., Gruden, M. A., Zamotin V., Malisauskas M., Casaitė V., Darinskas A., Forsgren L., Morozova-Roche L.A. (2007): Immune reactivity towards insulin, its amyloid and protein S100B in blood sera of Parkinson's disease patients. *European journal of neurology* 14(3): 327–334.

Yang L., Wang H., Liu L., & Xie A. (2018): The Role of Insulin/IGF-1/PI3K/Akt/GSK3 $\beta$  Signaling in Parkinson's Disease Dementia. *Frontiers in neuroscience* 12: 73.

## 8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 19. kolovoza 1996. godine u Zadru gdje sam završila gimnaziju Vladimira Nazora 2015. godine, te iste godine upisala preddiplomski sveučilišni studij Biologije i ekologije mora na Sveučilišnom odjelu za studije mora, Sveučilišta u Splitu. Preddiplomski studij sam završila 2018. godine te stekla akademsko zvanje sveučilišnog prvostupnika (univ.bacc.), a nakon završetka preddiplomskog studija iste godine upisujem diplomski sveučilišni studij Eksperimentalne biologije (modul Zoologija) na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, od kojeg se opraštam s vrlo dobrim uspjehom.

Tokom studija svoje interese usmjerila sam na više znanstvenih disciplina u biologiji, ali moju zanimaciju i pozornost zadržala je neuroznanost i rad s laboratorijskim životinjama za kojeg posjedujem certifikat A kategorije. To je rezultiralo mojim radom u Laboratoriju za molekularnu neurofarmakologiju pod mentorstvom dr.sc. Ane Knezović, gdje sam stekla većinu praktičnog i teorijskog znanja u ovoj znanstvenoj disciplini te se bolje upoznala s modelima neurodegenerativnih bolesti i metodama molekularne biologije. Uz studij, aktivna sam članica studentske udruge „Put znanosti“, gdje zajedno s mojim kolegama i kolegicama radim na popularizaciji STEM znanosti, poboljšanju kvalitete nastave te edukaciji nastavnog i drugog stručnog osoblja u nastavi STEM znanosti u osnovnim i srednjim školama Republike Hrvatske.

Veliki sam ljubitelj filmske, književne i glazbene umjetnosti te jako volim životinje i dokumentarne filmove o istima. Volim čitati znanstveno-popularne knjige i krimiće, posjedujem pozamašnu kućnu kolekciju naslova koju svako malo nadopunjujem. Ljubav prema glazbi prisutna je od malih nogu te sam u više navrata tokom školskog i fakultetskog obrazovanja pjevala u zborovima, a završila sam i osnovnu glazbenu školu.