

Sveučilište u Zagrebu

Medicinski fakultet

Diana Kovač

**UTJECAJ PERORALNO PRIMIJENJENE GALAKTOZE NA METABOLIČKE
PROMJENE U HIPOKAMPUSU I HIPOTALAMUSU TRANSGENIČNOG MIŠJEG
MODELA ALZHEIMEROVE BOLESTI**

Zagreb, 2022.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za molekularnu neurofarmakologiju na Zavodu za farmakologiju i Hrvatskom institutu za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorskim vodstvom izv.prof.dr.sc. Jelene Osmanović-Barilar u sklopu znanstvenog projekta **„Terapijski potencijal oralne galaktoze u eksperimentalnoj Alzheimerovoj bolesti“**, voditeljice prof.dr.sc. Melite Šalković-Petrišić -šifra projekta HRZZ-IP-2014-09-4639 i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2021./2022.

POPIS KRATICA

AD	Alzheimerova bolest (engl. <i>Alzheimer's disease</i>)
AKT/PKB	protein kinaza B (engl. <i>protein kinase B</i>)
AMPK	adenozin monofosfat aktivirana protein kinaza (engl. <i>adenosine monophosphate- activated protein kinase</i>)
COX IV	četvrta podjedinica citokrom C oksidaze (engl. <i>cytochrome C oxidase subunit IV</i>)
ELISA	imunoenzimski test (engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
fAD	obiteljski oblik Alzheimerove bolesti (engl. <i>familial Alzheimer's disease</i>)
GAL	galaktoza (engl. <i>galactose</i>)
GLUT4	transporter za glukozu 4 (engl. <i>glucose transporter 4</i>)
GSK3 α/β	glikogen sintaza kinaza α/β (engl. <i>glycogen synthase kinase α/β</i>)
HPC	hipokampus (engl. <i>hippocampus</i>)
HPT	hipotalamus (engl. <i>hypothalamus</i>)
IR	inzulinski receptor (engl. <i>insulin receptor</i>)
NRP	nitrocelulozna redoks permanganometrija
ORP	oksidacijsko-redukcijski potencijal
P70SK6	ribosomalna protein S6 kinaza beta-1 (engl. <i>ribosomal protein S6 kinase beta-1</i>)
pAMPK	fosforilirani oblik adenozin monofosfat aktivirane protein kinaze (engl. <i>phosphorylated adenosine monophosphate-activated protein kinase</i>)
pGSK3 β	fosforilirani oblik glikogen sintaza kinaze β (engl. <i>phosphorylated glycogen synthase kinase β</i>)
p-P70SK6	fosforilirani oblik ribosomalnog proteina S6 kinaze beta-1 (engl. <i>phosphorylated ribosomal protein S6 kinase beta-1</i>)
PSEN 1	presenilin 1 (engl. <i>presenilin 1</i>)
PSEN 2	presenilin 2 (engl. <i>presenilin 2</i>)
sAD	sporadični oblik Alzheimerove bolesti (engl. <i>sporadic Alzheimer's disease, sAD</i>)
SOD	superoksid dismutaza
TBARS	reaktivne tvari tiobarbiturne kiseline (engl. <i>thiobarbituric acid reactive substance</i>)
TG	transgenične životinje (engl. <i>transgenic animals</i>)
WT	divlji tip (engl. <i>wild type</i>)

1.UVOD	1
1.1 Alzheimerova bolest	1
1.2 Patofiziologija Alzheimerove bolesti	1
1.3 Transgenični mišji model Tg2576	2
1.4 Primjena galaktoze u istraživanjima	3
2.HIPOTEZA	3
3.OPĆI CILJ I SPECIFIČNI CILJEVI	3
4.MATERIJALI I METODE	4
4.1 Materijali	4
4.1.1. Životinje	4
4.1.2. Korištena protutijela i reagensi	4
4.2 Metode	4
4.2.1. Protokol eksperimenta za evaluaciju kroničnog učinka peroralno primijenjene galaktoze	4
4.2.2 Protokol žrtvovanja i pohrane bioloških uzoraka	5
4.2.3. Homogeniziranje tkiva	6
4.2.4. Mjerenje koncentracije proteina	6
4.2.5 Mjerenje koncentracije kortikosterona u plazmi	6
4.2.6. Western blot protokol	6
4.2.7. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze	7
4.2.8. Lipidna peroksidacija	8
4.2.9. Ukupni oksidacijsko-redukcijski potencijal	8
4.2.10. Nitrocelulozna redoks permanganometrija	8
4.3 Statistička analiza	8
5.REZULTATI	8
5.1 Ekspresija proteina povezanih s inzulinskom signalizacijom u hipotalamusu i hipokampusu transgeničnog mišjeg modela familijarnog oblika Alzheimerove bolesti	8
5.1.1 Učinak transgeničnosti i galaktoze na ekspresiju proteina inzulinske signalizacije u 7-mjesečnih miševa	10
5.1.1.1 Hipokampus	10
5.1.1.2 Hipotalamus	12
5.1.2 Učinak transgeničnosti i galaktoze na ekspresiju proteina inzulinske signalizacije u 12-mjesečnih miševa	13
5.1.2.1 Hipokampus	13
5.1.2.2 Hipotalamus	15

5.2. Učinak transgeničnosti i galaktoze na koncentraciju kortikosterona u plazmi 7-mjesečnih i 12-mjesečnih miševa.....	17
5.3. Učinak transgeničnosti i galaktoze na pokazatelje oksidativnog stresa kod 7-mjesečnih miševa u regiji hipokampusa.....	18
5.4. Učinak transgeničnosti i galaktoze na pokazatelje oksidativnog stresa kod 12-mjesečnih miševa u regiji hipokampusa.....	20
6. DISKUSIJA.....	22
7. ZAKLJUČCI	25
8. ZAHVALE	25
9. POPIS LITERATURE.....	26
10. SAŽETAK.....	29
11. SUMMARY.....	30
12. ŽIVOTOPIS.....	30

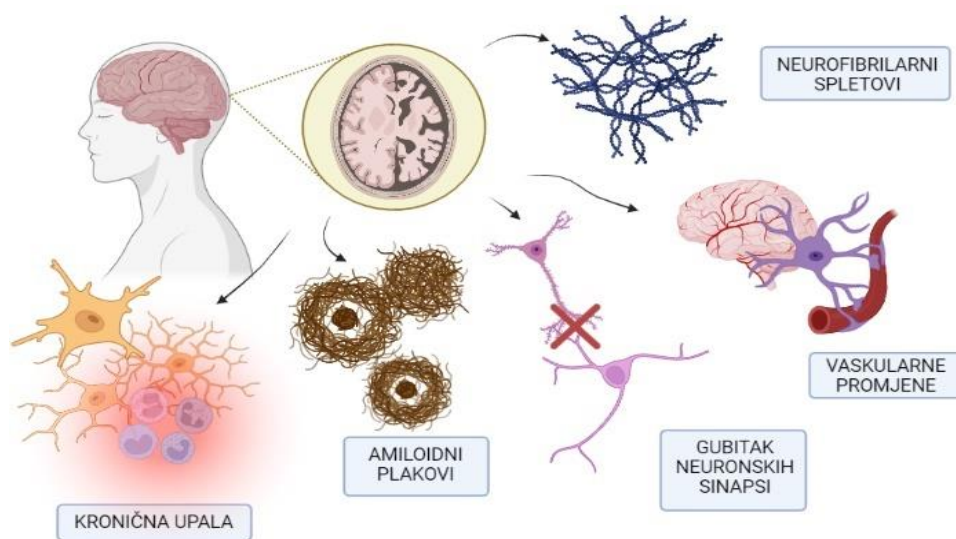
1.UVOD

1.1 Alzheimerova bolest

Alzheimerova bolest (engl. *Alzheimer's disease; AD*) je neurodegenerativni poremećaj koji se očituje progresivnim deficitom u pamćenju, kognitivnim i bihevioralnim poremećajima koji naposljetku dovode do razvoja demencije (Savonenko i sur.,2015.). Alzheimerova bolest vodeći je uzrok demencije, a 50-70% oboljelih pati od blažeg oblika. Bolest je prvi opisao dr. Alois Alzheimer kod 51-godišnje Auguste Deter 1907. godine, a prvi simptom koji je naveo jest promjena u ponašanju koja se kod pacijentice očitovala kao ekscesivni ispadi ljubomore prema mužu. Postmortem, uočene su na uzorcima mozga nakupine proteinskih plakova i neurofibrilarna vretena kao glavni patološki nalaz (Maurer i sur,1997.). Od ostalih tipičnih promjena koje nalazimo u oboljelih od Alzheimerove bolesti ubrajamo gubitak neuronskih sinapsi, vaskularne promjene te kroničnu upalu (SLIKA 1.). Trenutno u svijetu ima 55 milijuna oboljelih od demencije, a predviđa se da će do polovine 21.stoljeća broj oboljelih doseći brojku od 152 milijuna s najvećom prevalencijom u zemljama u razvoju (World Alzheimer report, 2018.).

1.2 Patofiziologija Alzheimerove bolesti

Razlikujemo dva oblika Alzheimerove bolesti: familijarni oblik (engl. *familial Alzheimer's disease, fAD*) te sporadični oblik bolesti (engl. *sporadic Alzheimer's disease, sAD*). Familijarni oblik bolesti je rjeđi, javlja se u 1-5% oboljelih te je povezan sa ranim nastupom simptoma (Blennow i sur.,2006.). Poremećaj u genima: protein amiloidnog prekursora (engl. amyloid precursor protein, APP), presenilin 1 (PSEN1) i presenilin 2 (PSEN2) dovode do nastanka ovog oblika bolesti (Scheltens i sur.,2016). Ostatak oboljelih ima takozvani sporadični oblik, kod kojeg se simptomi javljaju kasnije, a etiologija je još nepoznata. Postoji više različitih hipoteza koje nastoje objasniti patofiziološku pozadinu Alzheimerove bolesti od kojih su najpoznatije: amiloidna kaskadna hipoteza, tau hipoteza, hipoteza kolinergičnog deficita, oksidativnog stresa te hipoteza moždane deprivacije glukoze odnosno inzulinska hipoteza (An i sur.,2018.). Amiloidna hipoteza je najzastupljenija i u njoj se kao glavni uzrok nastanka AB navodi ekstracelularno nakupljanje abnormalnog amiloida $\beta(1-42)$ te razvitak upalnog odgovora i posljedično neuralnog oštećenja (Hardy i sur.,1992.). Tau hipoteza kao glavni patološki događaj naglašava hiperfosforilaciju tau proteina koji postaje netopljiv te se taloži unutar samih neurona tvoreći neurofibrilarne snopiće i dovodi do poremećaja sinaptičke funkcije i neurodegeneracije (Price i sur.,2009). Kod oboljelih od Alzheimerova nađena su oštećenja kolinergičkih neurona te smanjena koncentracija acetilkolina što je dovelo do nastanka hipoteze koja u središte patološkog događanja smješta oštećenje kolinergičkog sustava (Davies i sur.,1976). Mitohondrijska kaskadna hipoteza kao uzrok bolesti navodi poremećaj u respiracijskom lancu te povećanu proizvodnju slobodnih kisikovih radikala što dovodi do stvaranja netopivih β konformacija koje ugradnjom u mitohondrijsku membranu dovode do stvaranja pora i uništavanja samog mitohondrija (Anandatheerthavarada i sur.,2003.). Naposljetku, inzulinska hipoteza temelji se na poremećaju metabolizma glukoze u mozgu kao ranog znaka bolesti te objašnjava nastanak inzulinske rezistencije u mozgu (engl. *insulin resistant brain state, IRBS*). Inzulin regulira homeostazu glukoze, neurotrofiju, sinaptogenezu i ima važnu ulogu u regulaciji metabolizma hiperfosforiliranog tau proteina i amiloida β čime se nastoje objasniti karakteristične promjene u mozgu oboljelih (Kleinridders i sur.,2014.)



SLIKA 1. Promjene u mozgu oboljelih od Alzheimerove bolesti prema bazi nia.nih.gov. Slika je izrađena na BioRender.com

1.3 Transgenični mišji model Tg2576

Transgenični miševi Tg2576 predstavljaju model familijarnog oblika Alzheimerove bolesti, a razvili su ga Hsiao i suradnici, 1996. Promjene koje su uočljive u ovom modelu rezultat su "švedske" mutacije, koja svoje ime duguje tome da su u Švedskoj kod velikog broja obitelji oboljelih od AB sa ranim nastupom simptoma nađene dvije ponavljajuće mutacije: 1.) lizin je na 670. mjestu bio zamjenjen asparaginom, 2.) metionin je na 671. mjestu zamjenjen leucinom. Mutirana forma APP-a, koja je rezultat dvije navedene mutacije umetnuta je u kozmidni vektor prionskog proteina hrčka na način da su otvoreni okvir čitanja ORF (engl. open reading frame) PrP-a, zamijenili varijantom APP ORF i to su umetnuli u genom hibridnog B6;SJL miša. Ovako dobiven model prezentirao se pretjeranom ekspresijom APP-a što dovodi do prijevremene smrtnosti te razvitka patoloških promjena karakterističnih za Alzheimerovu bolest (Hsiao i sur.,1996.). Prema hipotezi moždane deprivacije glukoze, važnu ulogu u regulaciji metabolizma amiloidnih plakova ima inzulin, a budući da kod Tg2576 miševa dolazi do povećane koncentracije amiloida β te ubrzanog stvaranja plakova u mozgu, čest predmet istraživanja su bile promjene u inzulinskoj signalizaciji kod ovoga modela. Prije provedena istraživanja utvrdila su disregulaciju cijelog niza različitih komponenti središnjeg inzulinskog signalnog puta, mjerenih prije nastanka periferne inzulinske rezistencije, a opisane su detaljnije u diskusiji. (Valesquez i sur.,2018.). Nadalje, oštećenja u pamćenju i prostornom snalaženju nisu zabilježena u dobi od tri mjeseca, ali postaju vidljiva u razdoblju od 9 do 11 mjeseci u ovih životinja. U dobi od 6 mjeseci dolazi do ubrzanog porasta amiloida β , dok formiranje amiloidnih plakova postaje intenzivnije tek oko 9-12 mjeseci što odgovara rezultatima kognitivnih promjena (Kawarabayashi i sur., 2001.). Na histološkim preparatima mozga miševa starosti 11 mjeseci nađeni su depoziti amiloidnih plakova, značajnija astroglioza i mikroglia te povećana ekspresija hiperfosforiliranog tau proteina u zahvaćenim područjima (Tomidokoro i sur.,2001). Oprečno tome, istraživanje koje su provodili Takeuchi i sur. je pak pokazalo da u području neokorteksa i hipokampusa ne dolazi do značajnijeg gubitka neurona (Takeuchi i sur.,2000.). Ovisno o istraživanju, poremećaji pamćenja su zabilježeni i u ranijoj dobi od 6 mjeseci (Westerman i sur.,2002.). Osim

toga zabilježene su i promjene uzrokovane oksidacijskim stresom, ali bez prisustva neurofibrilarnih vretena ili gubitka neurona u dobi od 11 do 13 mjeseci (Irizarry i sur.,1997.).

1.4 Primjena galaktoze u istraživanjima

Terapijski učinak galaktoze je bio predmet brojnih istraživanja, gdje se većinom ispitivao učinak parenteralno primjenjene galaktoze, a tek manji broj istraživača proučavao je unos per os. Nadalje, bitno je naglasiti da se dominantno u tim eksperimentima vršila bolusna administracija, dok se u ovom radu opisuje njeno uzimanje ad libitum. Isključivo parenteralna administracija galaktoze dovodi do oštećenja pamćenja i koristi se za dobivanje modela starenja kao posljedice oksidativnog oštećenja (Ho i sur.,2003.), dok kontinuirana primjena galaktoze ad libitum dovodi do sprječavanja razvitka kognitivnih oštećenja u streptozotocinskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti, upućujući na njen potencijalno protektivni učinak (Šalković-Petrišić i sur.,2014.). Nadalje, peroralna i supkutana primjena galaktoze dovela je do kognitivnog poboljšanja, ali je efekt bio ovisan o trajanju njene primjene (Chogtu i sur.,2018.). Nasuprot tome, Budni i sur. davali su jednokratne bolus doze galaktoze (100 mg/kg/dan) što je dovelo do razvoja kognitivnih oštećenja udruženih sa povećanjem oksidativnog stresa nakon 6-8 tjedana (Budni i sur.,2016.). Slične rezultate dobili su i Krzysztoforska i sur. nakon administriranja 100 mg/kg bolus doza galaktoze per os kroz 38 dana što je rezultiralo značajnim kognitivnim deficitom (Krzysztoforska i sur., 2019.). Čini se da učinak galaktoze na metaboličke promjene u mozgu štakora ili miševa ovisi o primijenjenoj dozi, vremenu izloženosti tretmanu, starosnoj dobi životinja, ali i samom načinu administriranja galaktoze.

2.HIPOTEZA

Dvomjesečna primjena galaktoze ad libitum dovodi do metaboličkih promjena u hipokampusu i hipotalamusu transgeničnog mišjeg modela, starosti 7 i 12 mjeseci, koji predstavljaju pre-simptomatski i blagi oblik Alzheimerove bolesti.

3.OPĆI CILJ I SPECIFIČNI CILJEVI

Opći cilj:

Opći cilj rada je ispitati kronični učinak peroralno primijenjene galaktoze na metaboličke i oksidativne parametre kod transgenične i kontrolne skupine miševa, starosti 7 i 12 mjeseci.

Specifični ciljevi:

1. Ispitati metaboličke promjene u transgeničnih i kontrolnih miševa, starosti 7 i 12 mjeseci, mjerenjem ekspresije proteina u dvije regije mozga- hipokampusu i hipotalamusu.
2. Ispitati kronični učinak peroralno primijenjene galaktoze ad libitum na parametre oksidativnog stresa u transgeničnog modela i kontrolne skupine, starosti 7 i 12 mjeseci.
3. Ispitati kronični učinak galaktoze, primijenjivane tijekom dva mjeseca, ad libitum, na koncentraciju kortikosterona u plazmi mišjeg modela familijarnog oblika Alzheimerove bolesti i kontrolne skupine, starosti 7 i 12 mjeseci.
4. Usporediti kronični učinak galaktoze te efekt transgeničnosti na oksidativne parametre i ekspresiju proteina u hipotalamusu i hipokampusu obje starosne skupine miševa te odrediti korelaciju između dobivenih rezultata i stadija bolesti.

4.MATERIJALI I METODE

4.1 Materijali

4.1.1. Životinje

Svi pokusi su provedeni na mužjacima transgeničnih heterozigotnih miševa B6;SJL-Tg(APP^{SWE})2576Kha i kontrolnoj skupini homozigotnih miševa (Taconic Biosciences Inc.Hudson, SAD) koji su u dobi od 3 mjeseca držani u nastambi za laboratorijske životinje na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga (HR-POK-006). Sva in vivo istraživanja slijedila su zakone i propise o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe. Provedeni postupci odobreni su od strane Ministarstva poljoprivrede (klasa: UP/I-322-02/15-01/156, ur. broj: 525-10/0255-15-5) te Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Sa životinjama su rukovale osobe osposobljene za rad sa životinjama.

4.1.2. Korištena protutijela i reagensi

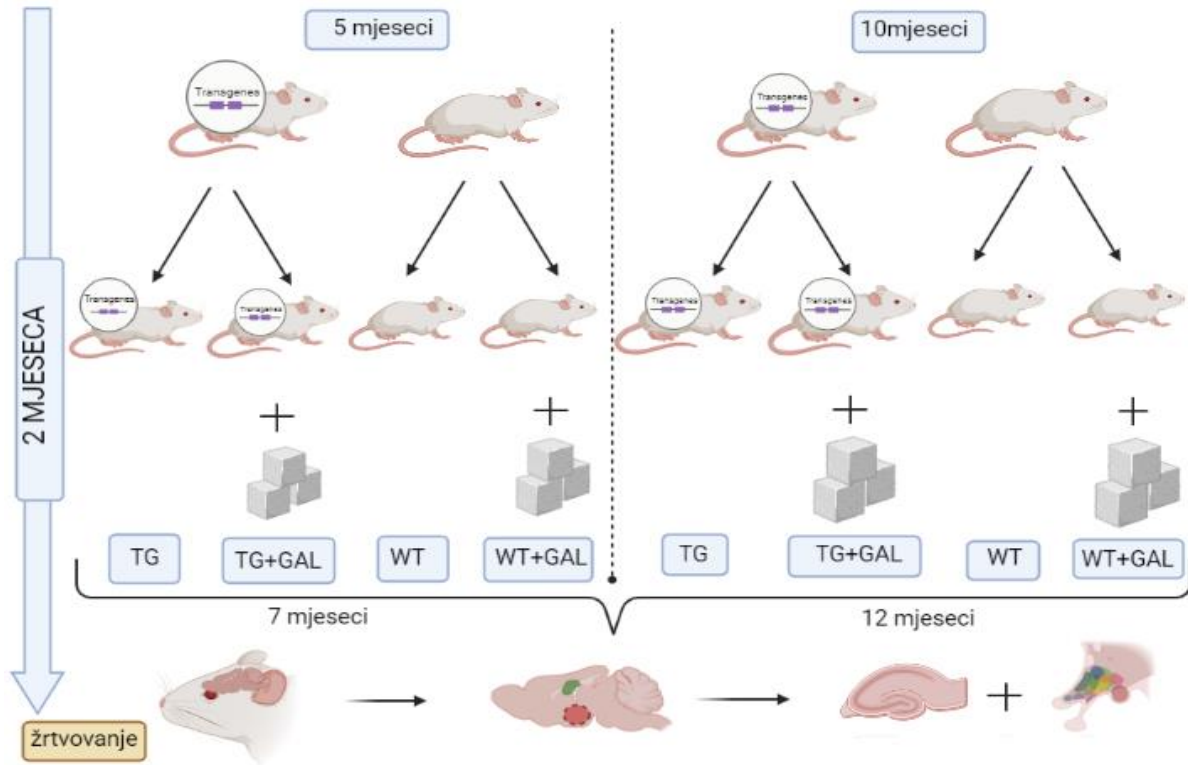
U istraživanju su korištena primarna protutijela na: AMPK (Cell Signaling, SAD), IR (Merck Millipore, SAD), pAMPK (Cell Signaling, SAD), AKT, P70SK6 (Cell Signaling, SAD), p-P70SK6 (Cell Signaling, SAD), GLUT4 (Merck Millipore, SAD), tGSK3 (Cell Signaling, SAD), pGSK3 (Cell Signaling, SAD), COX4 (Cell Signaling, SAD). Sekundarna antitijela korištena u istraživanju su s HRP (engl. *horseradish peroxidase*) povezana protutijela na IgG miša (anti-Ms) i s HRP povezana protutijela na IgG zeca (anti-Rb) (Cell Signaling, SAD). Također, korišten je ELISA kit za određivanje koncentracije kortikosterona (Tecan, SAD) u plazmi. Korištena je D-galaktoza (D-Galactose, Sigma Aldrich, SAD).

4.2 Metode

4.2.1. Protokol eksperimenta za evaluaciju kroničnog učinka peroralno primijenjene galaktoze

U eksperimentu su korištene dvije starosne skupine miševa (7 i 12 mjeseci) koji predstavljaju dva različita stadija bolesti: pre-simptomatski i blagi stadij. Životinje su bile raspoređene u četiri skupine: kontrolna skupina (WT),

kontrolna skupina na galaktozi (WT+G), transgenična skupina (TG), transgenična skupina na galaktozi (TG+G). Skupine WT i TG dobivale su običnu vodu, dok su druge dvije skupine dobivale D-galaktozu otopljenu u vodi za piće (200mg/kg dnevno) dostupne bez ograničenja. Nakon dva mjeseca terapije i provedenih testiranja in vivo, životinje su žrtvovane.



SLIKA 2. Plan izvođenja pokusa. Na slici je prikazan vremenski tijek primjene tretmana kod odgovarajućih ispitivanih skupina. Na slici je naznačena dob miševa na početku eksperimenta te prilikom žrtvovanja. **WT- divlji tip (eng. wild type), TG- transgenična skupina, GAL- galaktoza.** Slika je izrađena na BioRender.com

4.2.2 Protokol žrtvovanja i pohrane bioloških uzoraka

Životinje su prije žrtvovanja anestetizirane kombinacijom ketamina (50 mg/kg) i ksilazina (5 mg/kg). Iz retro-orbitalnog sinusa izvađeno je 500 µl po mišu te su izvađenim uzorcima dodani heparin (Belupo, Hrvatska) i inhibitor dipeptidil peptidaze-IV (Sigma Aldrich, SAD). Uzorci pune krvi su centrifugirani na 3600 okretaja u minuti kroz 10 min. Uzet je supernatant te je smrznut na -80°C za kasniju upotrebu. Kod četiri životinje po skupini učinjena je transkardijalna perfuzija, gdje se nakon ispiranja fiziološkom otopinom, provodi perfundiranje 4% paraformaldehidom. Nakon toga, životinjama se odstranjuje mozak koji se dehidrira serijskim otopinama saharoze. Uzorci se zatim spremaju na -80°C. Ostalih šest životinja po skupini žrtvovano je cervikalnom dislokacijom, izvađen im je mozak koji je disekcijom podijeljen na dvije hemisfere, smrznut u tekućem dušiku i pohranjen na -80°C.

4.2.3. Homogeniziranje tkiva

Tkivo je homogenizirano u otopini pufera za lizu stanica (engl. *lysis buffer*): 50 mM Trizma baza, pH 8,0 (Sigma Aldrich, SAD) 150 mM NaCl (T.T.T., Hrvatska) 0,5 mM EDTA (Kemika, Hrvatska) 1 mM DTT (Fluka, SAD) 0,01 M Na₃VO₄ (Sigma Aldrich, SAD) 0,5% natrij deoksikolat (AppliChem, Njemačka) 1% NP-40 (Sigma Aldrich, SAD) 0,1% SDS (Sigma Aldrich, SAD) te su u otopinu dodani i proteaza inhibitori (1:100; Sigma Aldrich, Njemačka) i fosfataza inhibitori (1 tableta na 10mL pufera, Roche, Švicarska). Tkivo je na ledu homogenizirano pomoću sonikatora (Microson Ultrasonic Cell Disruptor XL, Manassas, SAD) te je potom centrifugirano na 12000 rpm kroz 10 min. Supernatant je izdvojen u triplikatu i pohranjen na -80 °C.

4.2.4. Mjerenje koncentracije proteina

Koncentracija proteina u homogenatima određena je metodom po Lowryju (Lowry i sur.,1951). Za mjerenje korišteno je 10 µL homogenata pomiješano s 2 mL reagensa bakrova sulfata (49 mL otopine 2% Na₂CO₃ u 0,1 M NaOH i 1 mL otopine dobivene miješanjem 500 µL 1% CuSO₄·5H₂O i 500 µL 2% NaK tartarata). Nakon 10 minuta dodaje se 200 µL folin reagensa. Nakon pola sata, mjeri se apsorbancija na 750 nm na spektrofotometru (Camspec, Velika Britanija; Iskra, Slovenija).

4.2.5 Mjerenje koncentracije kortikosterona u plazmi

Koncentraciju kortikosterona u plazmi odredili smo komercijalno dostupnim enzimskim imunotestom i analizirali kolorimetrijskom analizom pomoću multimodalnog čitača mikropločica. Reverzna ELISA izvedena je prema uputama proizvođača (Tecan, SAD). Apsorbancija je mjerena na 450 nm i 620nm.

4.2.6. Western blot protokol

Western blot metoda korištena je za detekciju specifičnih proteina te mjerenje njihove ekspresije. Korišten je TGX Stain-Free FastCast 12% poliakrilamidni gel (Bio-Rad, USA) koji se dobije miješanjem otopina resolver A (6ml x n (MIDI) ; 2,5ml x n (MINI)) i resolver B (6ml x n (MIDI) ; 2,5ml x n (MINI)) za donji, odnosno stacker A (1,5ml x n (MIDI) ; 1ml x n (MINI)) i stacker B (1,5ml x n (MIDI) ; 1ml x n (MINI)) za gornji gel u količinama ovisnima o veličini gela koji je priređivan. Zatim se doda N,N,N',N'- tetrametiletildiamin (TEMED) i amonijev persulfat (APS) prema uputama proizvođača. Gel se nanese između stakalaca i ostavi se 45-60 min.

U međuvremenu, pripremaju se uzorci na način da se pomiješa jednaki volumen homogenata i loading buffera (sample buffer (2 mL glicerola; 6 mL 10% SDS; 2,5 mL 1 M trisa pH 6,7; 2-4 mg bromfenol plavila] i 15% β-merkaptetanola). Homogenati se prethodno vorteksiraju, a nakon dodavanja loading buffera, centrifugiraju te slijedi kuhanje na 95°C tijekom 5 minuta. U slučaju transmembranskih proteina kuhanje se provodilo pri nižoj temperaturi od 60°C tijekom 5 minuta ili uzorci nisu uopće bili kuhani. Nakon kuhanja, uzorci se ponovno centrifugiraju te se potom nanose u jažice u volumenima koji su izračunati preko koncentracije po Lowryju tako da u svakoj jažici bude po 25 µg uzorka. U prvu jažicu nanosimo referentni standard (Precision Plus Protein™ Standard; Bio-Rad Laboratories, Inc., SAD). Elektroforeza se provodi u running puferu (10g SDS-a u 100 mL

H₂O; 30g TRISA i 115m² glicina u 1 L H₂O) pri 150V tijekom 45-60 minuta. Nakon toga gelovi su slikani pomoću ChemiDoc MP Imaging System UV transilluminator (Bio-Rad, USA) te su analizom slika gelova dobiveni podaci koji su korišteni za izračunavanje relativnog inteziteta signala, normalizirani za ukupan sadržaj proteina. Zatim se vrši prijenos proteina na nitroceluloznu membranu tako što se na celulozne filtere koji su prethodno natopljeni transfer puferom (TRISbase 1,164g; glicin 0,586g; dH₂O 100ml; methanol 40ml; SDS 0,75 μL) postavi nitrocelulozna membrana i gel te se to sve pokrije sa još jednim setom celuloznih filtera. Postavi se u sustav za polusuhi prijenos Trans-Blot Turbo (Bio-Rad, 11 USA) tijekom 7 minuta pri 25V i 2,5mA. Membrana se potom ispire u otopini 1% Ponceau S u 4% octenoj kiselini radi provjere uspješnosti transfera. Zatim membrane ispiremo u puferu za ispiranje s niskom koncentracijom soli (LSWB - prema eng. low-salt washing buffer; (pH 7,5; 1,211 g Trisa i 8,766 g NaCl u 1 L H₂O) tijekom 5 minuta 3 puta. Nakon toga membrane stavimo u pufer za blokiranje (1 g nemasnog mlijeka u prahu; 20 mL LSBW; 100 μL Tween 20) tijekom 1 sata na sobnoj temperaturi. Zatim se membrane inkubiraju preko noći na 4 °C sa primarnim protutijelima otopljenima u otopini za blokiranje u omjeru 1:1000. Idući dan slijedi ispiranje 3x5 minuta u LSBW-u, nakon čega slijedi inkubacija sa sekundarnim protutijelom u omjeru 1:2000 tijekom 1h pri sobnoj temperaturi. Membrane se ponovno ispiru 3x5 minuta u LSBW-u nakon čega slijedi inkubacija u priređenom kemiluminiscentnom reagensu (0,1M TRIS pH 8,6 10ml; luminol 50 μL; p-kumarinska kiselina 22 μL; H₂O₂ 3 μL) ili u komercijalno dostupnom reagensu SuperSignal™ West Femto (Thermo Fisher Scientific Inc., SAD) te se snimaju MicroChemiDoc kamerom (DNR BioImaging Systems Ltd., Israel). U slučaju izostanka vizualizacije specifičnih proteina rađen je postupak pojačavanja signala uz pomoć biotina i abc kita. Ovisno o vrsti sekundarnog protutijela korišten je biotin Ms/Rb razrijeđen u 1x PBS puferu u omjeru 1:1000. Membrana se položi na PVC foliju te se na nju nanese biotin u području proteina čiji signal želimo pojačati. Membrana se zatim preklopi PVC folijom te se inkubira u mraku tijekom 1h pri sobnoj temperaturi. Nakon toga slijedi ispiranje 3x5 minuta u LSBW puferu. U međuvremenu, pripremi se otopina iz abc kita tako što pomiješamo 2,5 mL PBS pufera te jednu kap otopine A i jednu kap otopine B. Otopina se nanese na membranu te se inkubira tijekom 30 minuta. Nakon toga slijedi ispiranje membrane 3x5 minuta i upotreba kemiluminiscenta te vizualizacija na kameri. Slike membrana i gelova analizirane su u programu FIJI (NIH, USA) korištenjem Gel Analyzer protokola.

4.2.7. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze

Za određivanje aktivnosti superoksid dismutaze korišten je pirogalol (1,2,3-trihidroksibenzen) koji se u alkalnim uvjetima autooksidira, stvarajući superoksidne radikale $\cdot\text{O}_2^-$ i semikinone, a oni pak u reakciji sa kinonom daju purpurogallin kojeg detektiramo spektrofotometrom. (Marklund i sur.,1974.) Superoksid dismutaza katalizira dismutaciju superoksidnog radikala u vodikov peroksid. Dakle, aktivnost SOD mjerena je indirektno na način da smo autooksidaciju pirogalola blokirali dodavanjem homogenata koji sadrži SOD. Smanjena apsorbancija upućuje na veći postotak inhibicije, to jest homogenati u tom slučaju imaju veću aktivnost SOD-a. U reagens (60mM pirogalola otopljenog u 1 mM HCl sa 1000 μL TRIS-HCl i 1 mM Na₂EDTA (pH = 8.2)) dodano je 8 μL homogenata , te se mjerila apsorbancija na 450 nm tijekom 200 s. Izmjerena je i apsorbancija reagensa bez uzorka kako bi dobili maksimalnu autooksidaciju pirogalola te omjerom apsorbancije pirogalola sa i bez uzorka je izračunata aktivnost SOD-a. Dodavanjem 2mM KCN koji je inhibitor Cu/Zn SOD-a, izmjerena je aktivnost manganove superoksid dismutaze Mn SOD.

4.2.8. Lipidna peroksidacija

Lipidnu peroksidaciju procijenjujemo mjerenjem koncentracije malondialdehida i drugih aldehida nastalih peroksidacijom nezasićenih masnih kiselina, koji u reakciji sa tiobarbiturnom kiselinom daju produkte čiju apsorbanciju mjerimo. (Prabhakar i sur.,2012.) 120 μL TBA-TCA (0,375% tiobarbiturne kiseline otopi se u 15% trikloroetene kiseline) pomiješa se sa 12 μL homogenata i 70 μL ddH₂O i to kuhamo na 95 °C kroz 20 minuta. Zatim se doda 202 μL n-butanola u kojem je izdvojen TBA-MDA adukt čiju apsorbanciju mjerimo na 540 nm korištenjem molarnog ekstinkcijskog koeficijenta od $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.2.9. Ukupni oksidacijsko-redukcijski potencijal

Prije mjerenja kalibriraju se mikroprocesorski mjerač (Jenco Instruments, San Diego, USA) i mikrosenzor ORP-146S (Shelf Scientific, Lazar Research Laboratories, USA) uz pomoć otopina kvinhidrona različitih pH vrijednosti (pH=7; pH=4) (Cao i sur. 2016). Ukupni oksidacijsko-redukcijski potencijal (ORP) izmjerimo na način da 5 μL homogenata inkubiramo u 5 μL otopine za elektrodu (0,1 M I₂ i 0,4 M KI) u mraku, tijekom sat vremena, pri sobnoj temperaturi. Mjerenje se ponavlja tri puta, nasumičnim uranjanjem platinaste elektrode u otopine te se iz toga izračuna srednja vrijednost ORP-a uzorka.

4.2.10. Nitrocelulozna redoks permanganometrija

Ukupni redukcijski kapacitet uzorka izmjeren je uz pomoć nitrocelulozne redoks permanganometrije koja se temelji na redukciji kalijeva permanganata u manganov dioksid u neutralnom okruženju na nitroceluloznoj membrani, ovisno o samom redukcijskom kapacitetu homogenata. Tijekom reakcije dolazi do nakupljanja smeđeg precipitata manganova dioksida na nitroceluloznoj membrani kojeg kasnije koristimo u kvantifikaciji te to predstavlja glavnu prednost metode (Homolak i sur.,2020.). 1 μL uzorka nanese se na nitroceluloznu membranu (Amersham Protran 0.45, GE Healthcare Life Sciences, USA) i ostavi se da se osuši. Membranu potom uronimo u otopinu 0,3 mg KMnO₄ u 30 mL ddH₂O tijekom pola minute. Zatim slijedi ispiranje membrane u destiliranoj vodi te analiza slike u programu FIJI (NIH, USA).

4.3 Statistička analiza

U analizi podataka korišten je generalni linearni model gdje su izmjerene vrijednosti predstavljale zavisne varijable, a skupina je nezavisna kategorijska varijabla sa četiri razine (WT+H₂O, TG+H₂O, WT+GAL, TG+GAL). Logaritamska transformacija učinjena je za podatke koji nisu slijedili normalnu distribuciju. Rezultati su prikazani kao razlike srednjih vrijednosti između dvije skupine. Razina greške tipa 1 je 0,05. Statistička analiza rađena je u programskom jeziku i programskom okruženju R (verzija 4.2.0).

5.REZULTATI

5.1 Ekspresija proteina povezanih s inzulinskom signalizacijom u hipotalamusu i hipokampusu transgeničnog mišjeg modela familijarnog oblika Alzheimerove bolesti

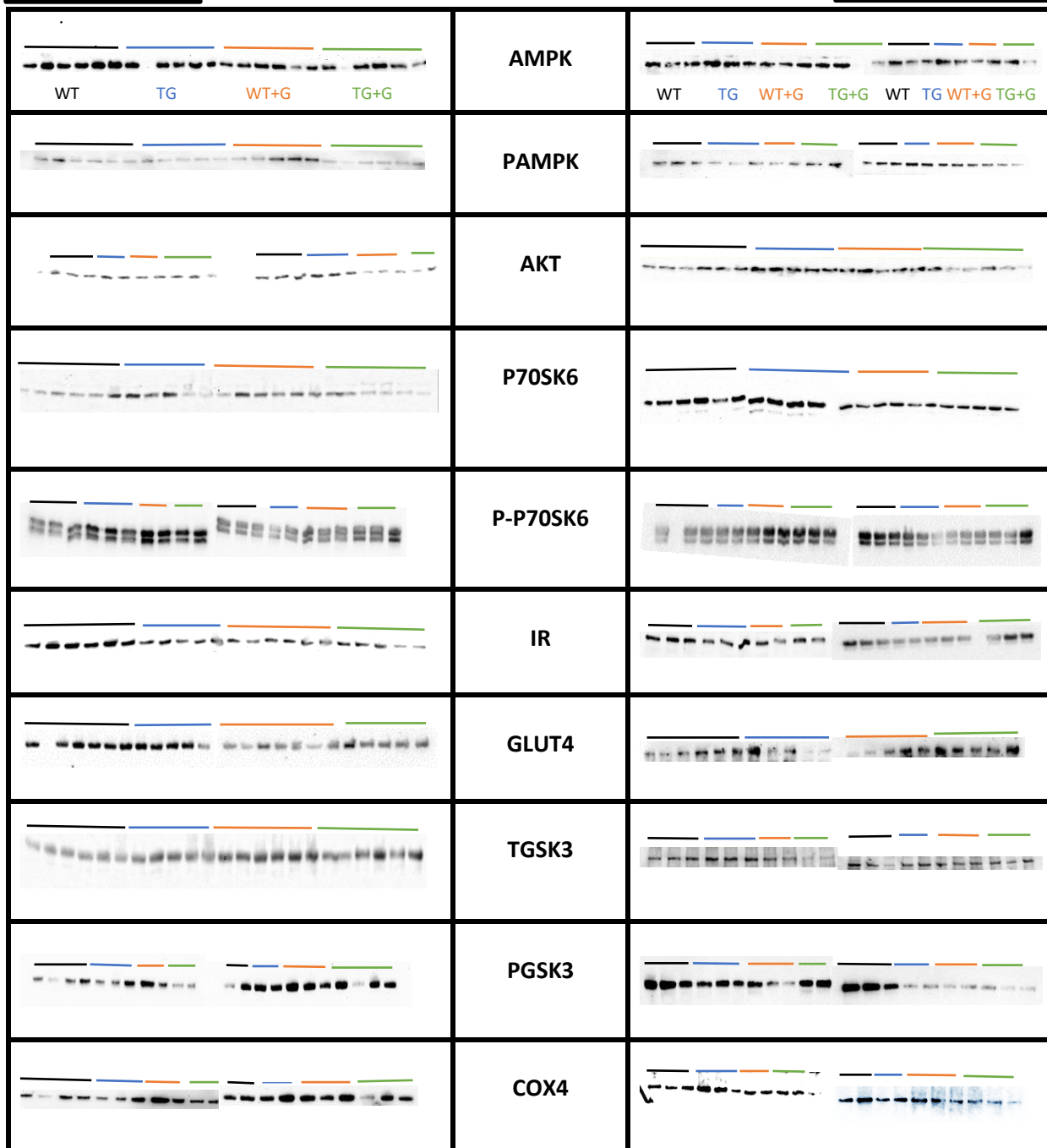
TABLICA 1. Prikaz izabranih proteina (AMPK, pAMPK, AKT, P70SK6, p-p70SK6, IR, GLUT4, tGSK3, pGSK3-beta, COX4) uzorka na nitroceluloznim membranama nakon elektroforetskog razdvajanja proteina obilježenih odgovarajućim protutijelima kod 7-mjesečnih i 12-mjesečnih miševa u regiji hipotalamusa.

WT (-) kontrolna skupina, TG (-) transgenična skupina, WT+G (-) kontrolna skupina na galaktozi, TG+G(-) transgenična skupina na galaktozi

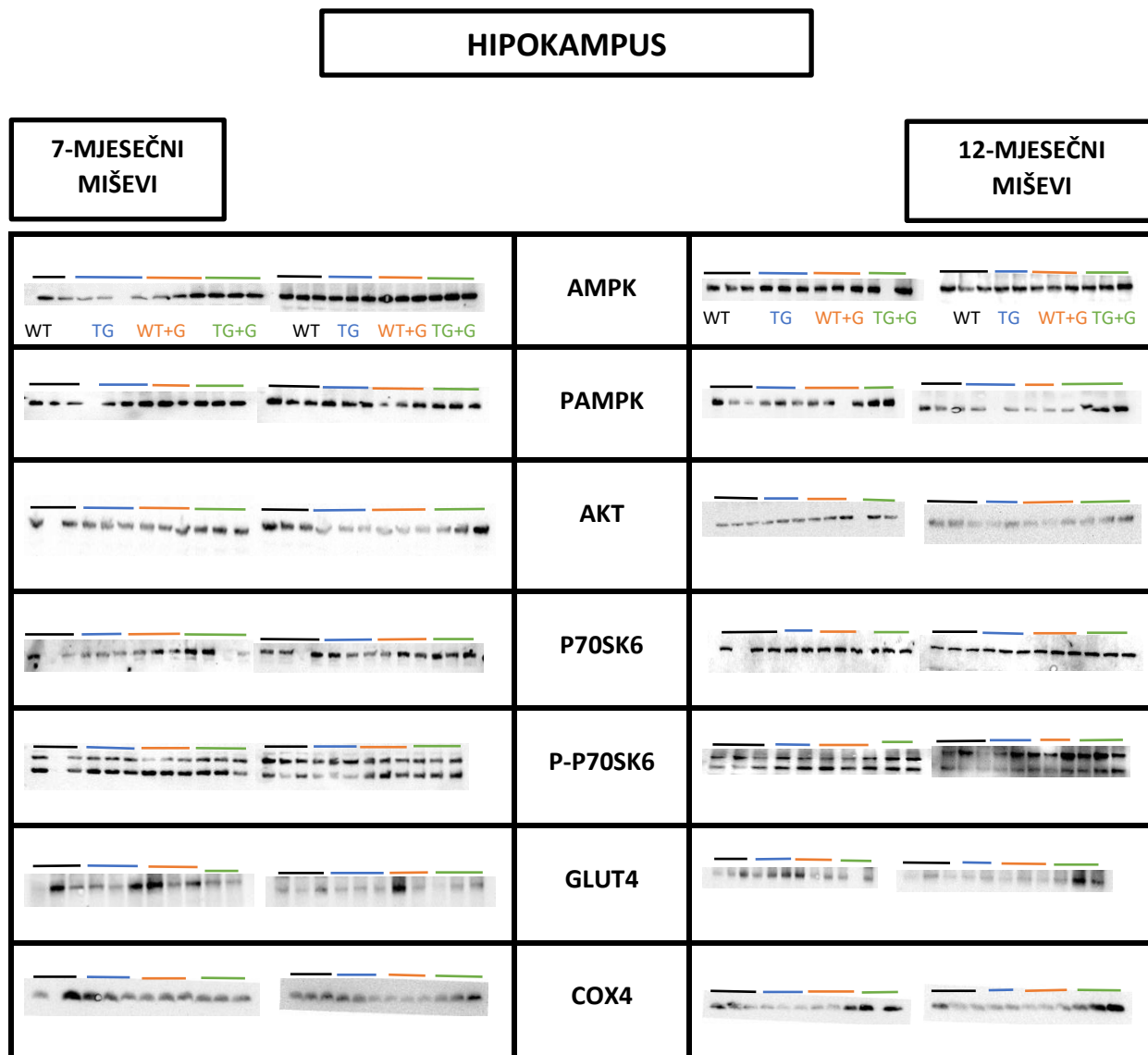
HIPOTALAMUS

7-MJESEČNI
MIŠEVI

12-MJESEČNI
MIŠEVI

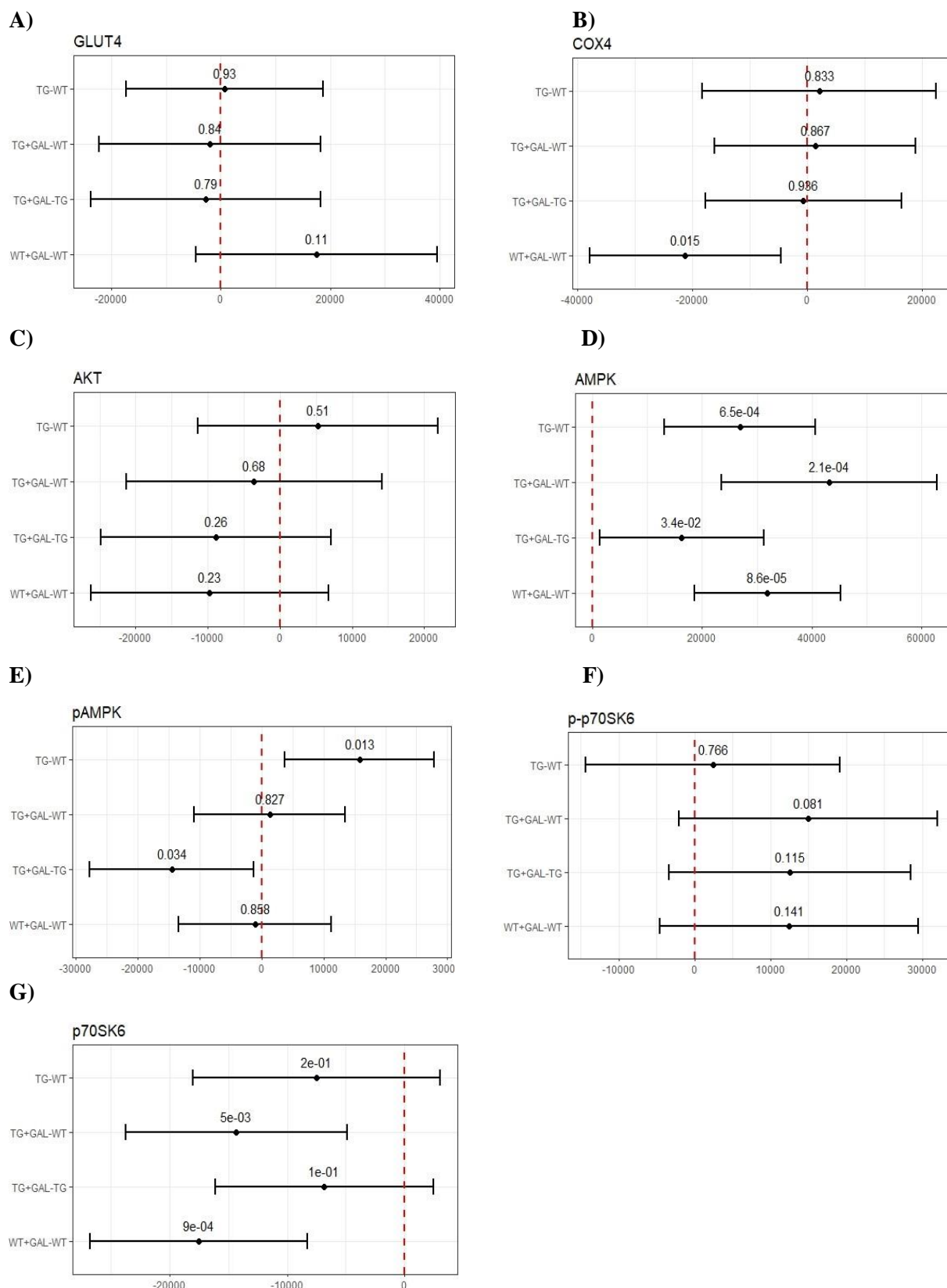


TABLICA 2. Prikaz izabranih proteina (AMPK, pAMPK, AKT, P70SK6, p-p70SK6, GLUT4, COX4) uzorka na nitroceluloznim membranama nakon elektroforetskog razdvajanja proteina obilježenih odgovarajućim protutijelima kod 7-mjesečnih i 12-mjesečnih miševa u regiji hipokampusa. **WT** (—) kontrolna skupina, **TG** (—) transgenična skupina, **WT+G** (—) kontrolna skupina na galaktozi, **TG+G** (—) transgenična skupina na galaktozi



5.1.1 Učinak transgeničnosti i galaktoze na ekspresiju proteina inzulinske signalizacije u 7-mjesečnih miševa

5.1.1.1 Hipokampus

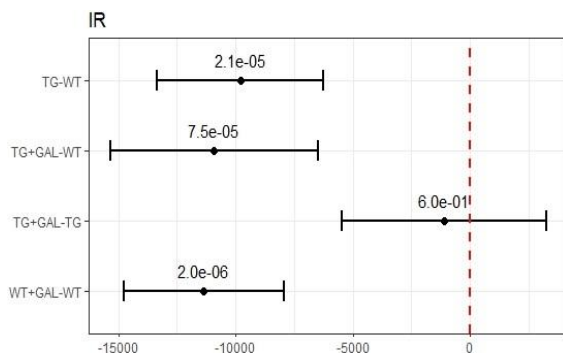


SLIKA 3. Učinak transgeničnosti i galaktoze na ekspresiju proteina inzulinske signalizacije kod 7-mjesečnih miševa u regiji hipokampusa. Rezultati su prikazani grafovima učinka (eng. effect plot) za svaki pojedini protein (A-G). Na grafovima je prikazan učinak transgeničnosti (TG - WT) te učinak galaktoze (WT+GAL - WT), (TG+GAL - TG) i (TG+GAL - WT) na ekspresiju odabranih proteina. Na y-osi označena je kategorijska varijabla

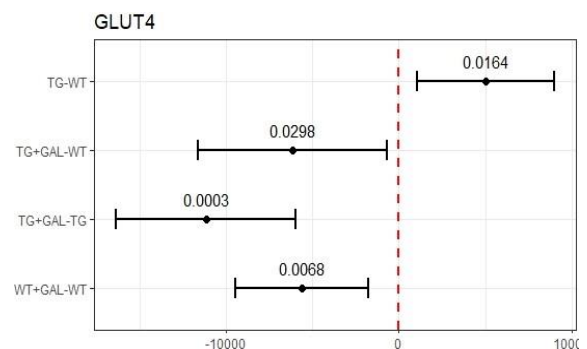
(kontrast između odabranih grupa) i smjer razlike, a na x-osi kontinuirana varijabla dobivena oduzimanjem srednjih vrijednosti između odabranih grupa označenih na y-osi. Kada točka (eng.point estimate) sa 95% intervalom pouzdanosti siječe vertikalnu crvenu liniju tada učinak tretmana smatramo neznačajnim, u suprotnom, ukoliko ne dolazi do njihova preklapanja, učinak tretmana se smatra značajnim. Iznad intervala pouzdanosti označene su p vrijednosti učinka. **GLUT4**- transporter glukoze tip 4, **COX4**- citokrom c oksidaza podjedinica 4, **AKT**-protein kinaza B, **AMPK**- AMP-aktivirana protein kinaza, **pAMPK**- fosforilirana AMP-aktivirana kinaza, **p-p70SK6**-fosforilirani ribosomalni protein S6 kinaza beta-1, **P70SK6**- ribosomalni protein S6 kinaza beta-1, **WT**- kontrolna skupina, **TG**- transgenična skupina, **WT+GAL**- kontrolna skupina na galaktozi, **TG+GAL**- transgenična skupina na galaktozi

5.1.1.2 Hipotalamus

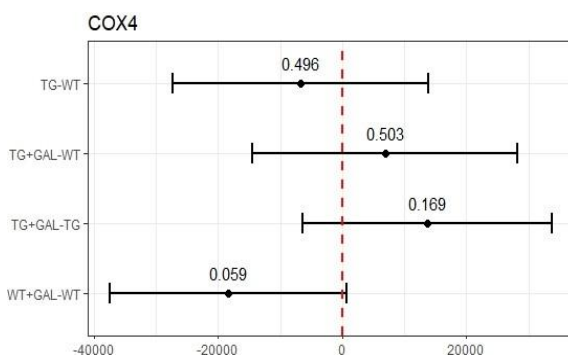
A)



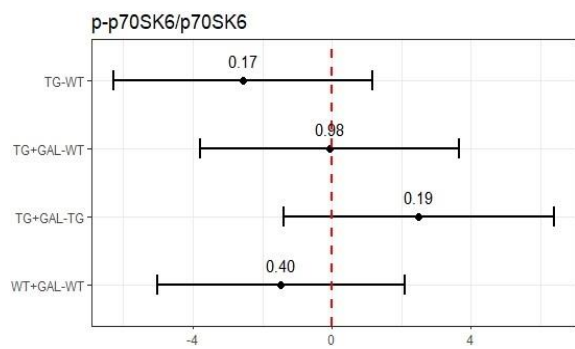
B)



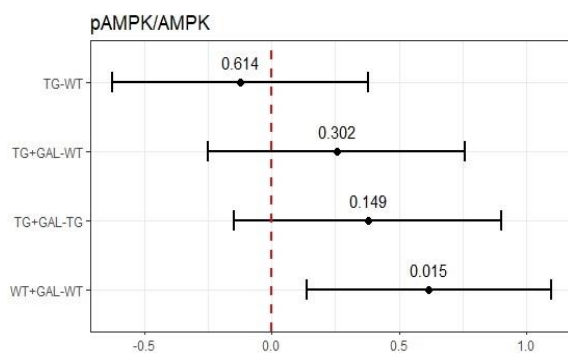
C)



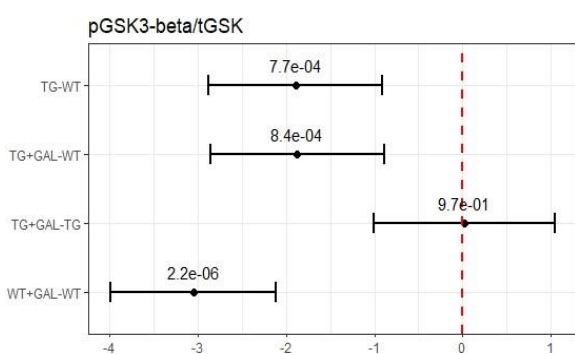
D)



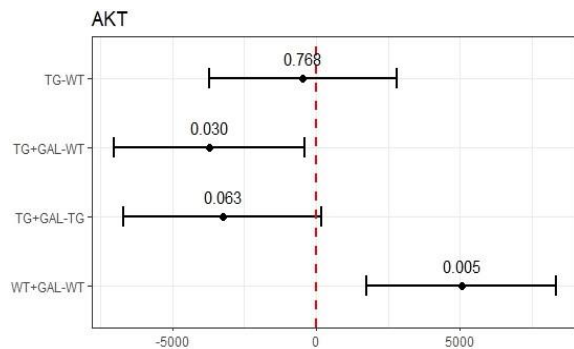
E)



F)



G)

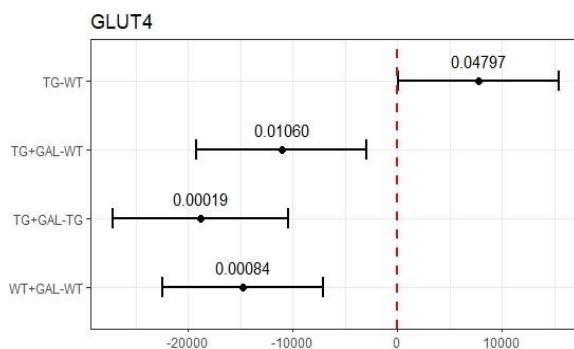


SLIKA 4. Učinak transgeničnosti i galaktoze na ekspresiju proteina inzulinske signalizacije kod 7-mjesečnih miševa u regiji hipotalamusa. Rezultati su prikazani grafovima učinka (eng. effect plot) za pojedini protein ili za omjer fosforiliranog i nefosforiliranog oblika odabranog proteina. (A-G). Na grafovima je prikazan učinak transgeničnosti (TG - WT) te učinak galaktoze (WT+GAL - GAL),(TG+GAL - TG) i (TG+GAL - WT) na ekspresiju odabranih proteina. Na y-osi označena je kategorijska varijabla (kontrast između odabranih grupa) i smjer razlike, a na x-osi kontinuirana varijabla dobivena oduzimanjem srednjih vrijednosti između odabranih grupa označenih na y-osi. Kada točka (engl. point estimate) sa 95% intervalom pouzdanosti siječe vertikalnu crvenu liniju tada učinak tretmana smatramo neznačajnim, u suprotnom, ukoliko ne dolazi do njihova preklapanja, učinak tretmana se smatra značajnim. Iznad intervala pouzdanosti označene su p vrijednosti učinka. **IR**- inzulinski receptor, **tGSK3**-glikogen sintaza kinaze α/β , **pGSK3 β** -fosforilirani oblik glikogen sintaza kinaze β **GLUT4**-transporter glukoze tip 4, **COX4**- citokrom c oksidaza podjedinica 4, **AKT**-protein kinaza B, **AMPK**- AMP-aktivirana protein kinaza, **pAMPK**- fosforilirana AMP-aktivirana kinaza, **p-p70SK6**-fosforilirani ribosomalni protein S6 kinaza beta-1, **P70SK6**- ribosomalni protein S6 kinaza beta-1, **WT**- kontrolna skupina, **TG**-transgenična skupina, **WT+GAL**- kontrolna skupina na galaktozi, **TG+GAL**- transgenična skupina na galaktozi

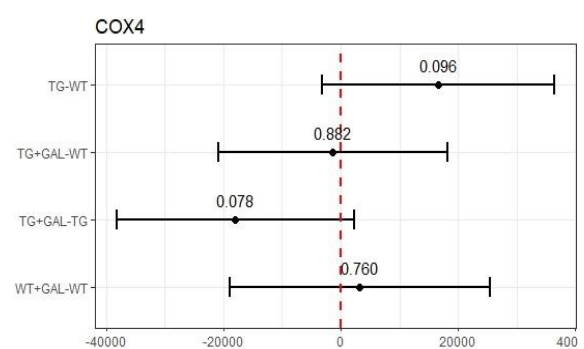
5.1.2 Učinak transgeničnosti i galaktoze na ekspresiju proteina inzulinske signalizacije u 12-mjesečnih miševa

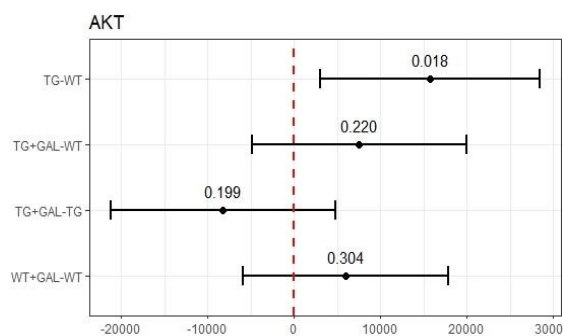
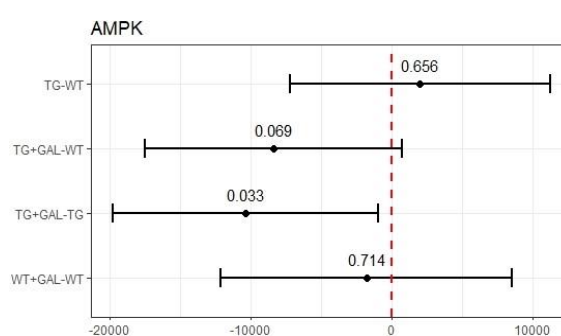
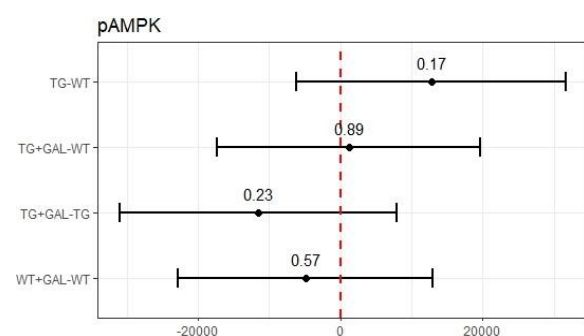
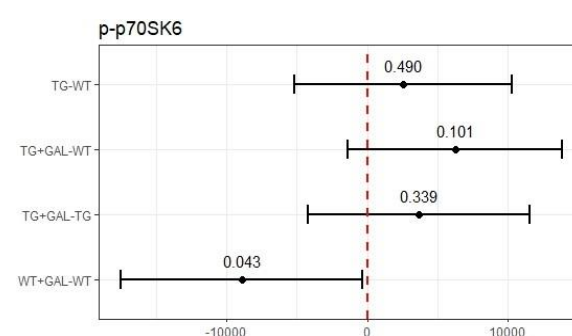
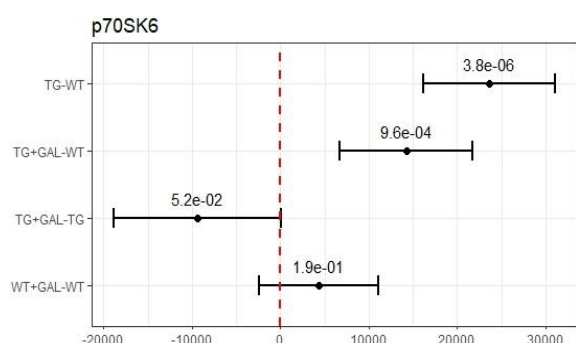
5.1.2.1 Hipokampus

A)



B)

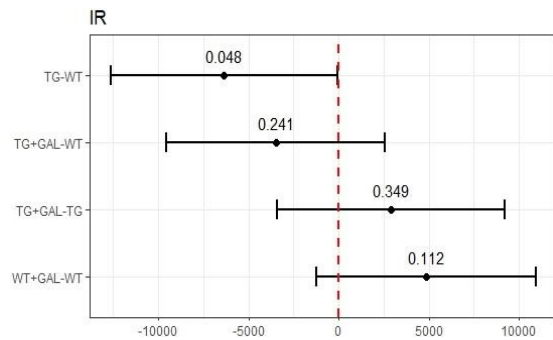


C)**D)****E)****F)****G)**

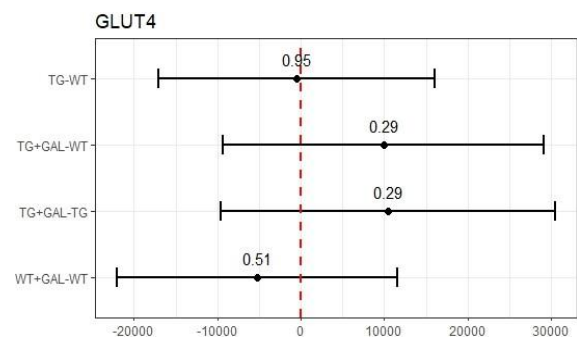
SLIKA 5. Učinak transgeničnosti i galaktoze na ekspresiju proteina inzulinske signalizacije kod 12-mjesečnih miševa u regiji hipokampusa. Rezultati su prikazani grafovima učinka (eng. effect plot) za svaki pojedini protein (A-G). Na grafovima je prikazan učinak transgeničnosti (TG - WT) te učinak galaktoze (WT+GAL - GAL), (TG+GAL - TG) i (TG+GAL - WT) na ekspresiju odabranih proteina. Na y-osi označena je kategorijska varijabla (kontrast između odabranih grupa) i smjer razlike, a na x-osi kontinuirana varijabla dobivena oduzimanjem srednjih vrijednosti između odabranih grupa označenih na y-osi. Kada točka (eng. point estimate) sa 95% intervalom pouzdanosti siječe vertikalnu crvenu liniju tada učinak tretmana smatramo neznačajnim, u suprotnom, ukoliko ne dolazi do njihova preklapanja, učinak tretmana se smatra značajnim. Iznad intervala pouzdanosti označene su p vrijednosti učinka. **GLUT4**- transporter glukoze tip 4, **COX4**- citokrom c oksidaza podjedinica 4, **AKT**-protein kinaza B, **AMPK**- AMP-aktivirana protein kinaza, **pAMPK**- fosforilirana AMP-aktivirana kinaza, **p-p70SK6**-fosforilirani ribosomalni protein S6 kinaza beta-1, **P70SK6**- ribosomalni protein S6 kinaza beta-1, **WT**- kontrolna skupina, **TG**- transgenična skupina, **WT+GAL**- kontrolna skupina na galaktozi, **TG+GAL**- transgenična skupina na galaktozi

5.1.2.2 Hipotalamus

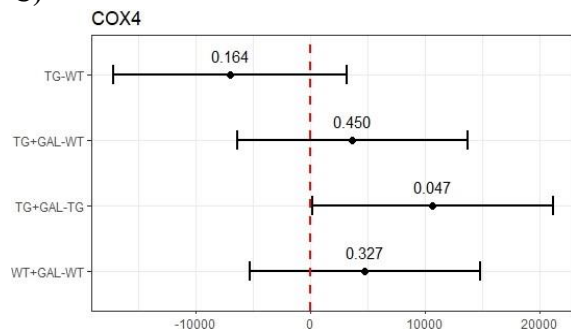
A)



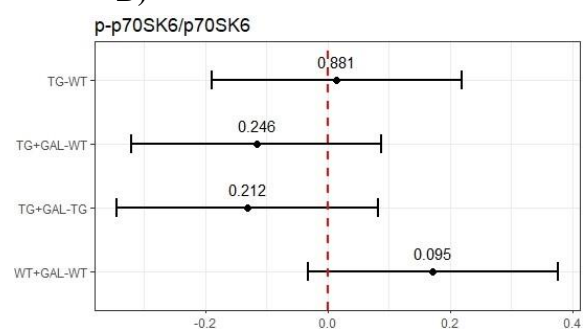
B)



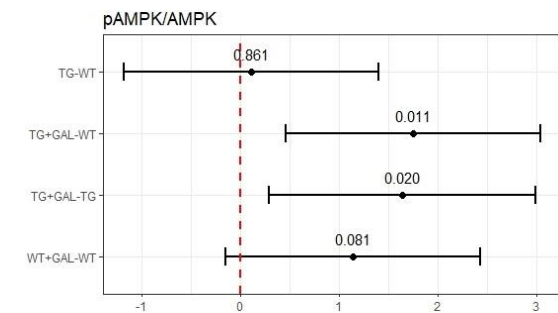
C)



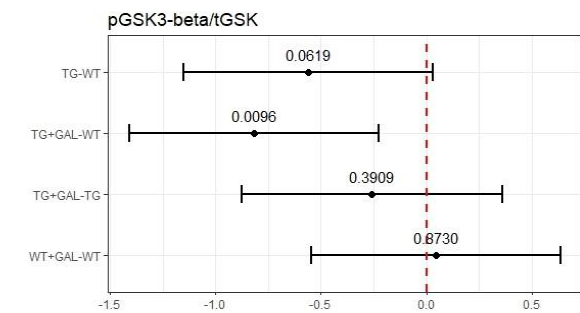
D)



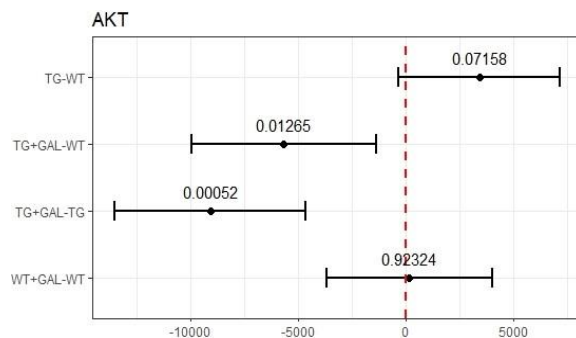
E)



F)



G)



SLIKA 6. Učinak transgeničnosti i galaktoze na ekspresiju proteina inzulinske signalizacije kod 12-mjesečnih miševa u regiji hipotalamusa. Rezultati su prikazani grafovima učinka (eng. effect plot) za svaki pojedini protein (A-G). Na grafovima je prikazan učinak transgeničnosti (TG - WT) te učinak galaktoze (WT+GAL - GAL), (TG+GAL - TG) i (TG+GAL - WT) na ekspresiju odabranih proteina. Na y-osi označena je kategorijska varijabla (kontrast između odabranih grupa) i smjer razlike, a na x-osi kontinuirana varijabla dobivena oduzimanjem srednjih vrijednosti između odabranih grupa označenih na y-osi. Kada točka (eng. point estimate) sa

95% intervalom pouzdanosti siječe vertikalnu crvenu liniju tada učinak tretmana smatramo neznačajnim, u suprotnom, ukoliko ne dolazi do njihova preklapanja, učinak tretmana se smatra značajnim. Iznad intervala pouzdanosti označene su p vrijednosti učinka. **IR**- inzulinski receptor, **tGSK3**-glikogen sintaza kinaze α/β , **pGSK3 β** -fosforilirani oblik glikogen sintaza kinaze β , **GLUT4**- transporter glukoze tip 4, **COX4**- citokrom c oksidaza podjedinica 4, **AKT**-protein kinaza B, **AMPK**- AMP-aktivirana protein kinaza, **pAMPK**- fosforilirana AMP-aktivirana kinaza, **p-p70SK6**-fosforilirani ribosomalni protein S6 kinaza beta-1, **P70SK6**- ribosomalni protein S6 kinaza beta-1, **WT**- kontrolna skupina, **TG**- transgenična skupina, **WT+GAL**- kontrolna skupina na galaktozi, **TG+GAL**- transgenična skupina na galaktozi.

Relativnu ekspresiju odabranih proteina smo odredili denzitometrijskom analizom western blotova te smo dobivene rezultate prikazali grafički (slika 3-6). Odabrani proteini inzulinske signalizacije navedeni su u tablicama 1 i 2, gdje su i prikazani na pripadajućim nitroceluloznim membranama. Budući da smo analizirali ekspresiju proteina kod dviju dobnih skupina miševa te u dvije različite regije mozga, a i zbog same brojnosti proteina, učinci transgeničnosti i galaktoze na ekspresiju odabranih proteina prikazani su sažeto u tablicama ispod (tablica 3 i 4).

TABLICA 3. Sažeti prikaz učinka transgeničnosti i galaktoze na ekspresiju odabranih proteina inzulinske signalizacije u regiji hipokampusa

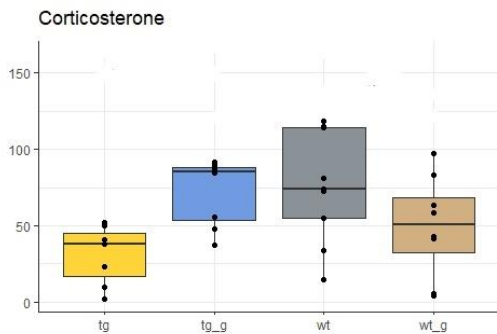
HIPOKAMPUS								
	7 MJESECI				12 MJESECI			
	TG-WT	TG+GAL-WT	TG+GAL-TG	WT+GAL-WT	TG-WT	TG+GAL-WT	TG+GAL-TG	WT+GAL-WT
GLUT4	=	=	=	=	↑	↓	↓	↓
COX4	=	=	=	↓	=	=	=	=
AKT	=	=	=	=	↑	=	=	=
AMPK	↑	↑	↑	↑	=	=	↓	=
pAMPK	↑	=	↓	=	=	=	=	=
p-P70SK6	=	=	=	=	=	=	=	↓
P70SK6	=	↓	=	↓	↑	↑	↓	=

TABLICA 4. Sažeti prikaz učinka transgeničnosti i galaktoze na ekspresiju odabranih proteina inzulinske signalizacije u regiji hipotalamusa

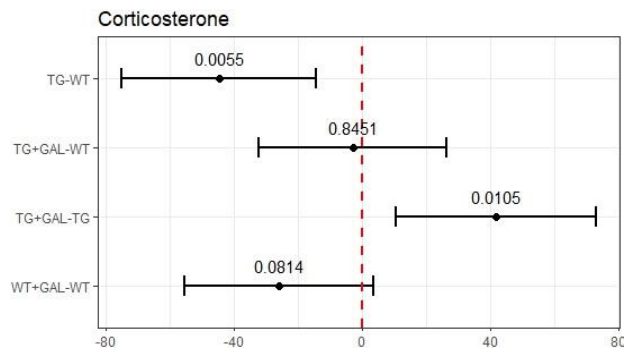
HIPOTALAMUS								
	7 MJESECI				12 MJESECI			
	TG-WT	TG+GAL-WT	TG+GAL-TG	WT+GAL-WT	TG-WT	TG+GAL-WT	TG+GAL-TG	WT+GAL-WT
GLUT4	↑	↓	↓	↓	=	=	=	=
COX4	=	=	=	=	=	=	↑	=
AKT	=	↓	=	↑	=	↓	↓	=
IR	↓	↓	=	↓	↓	=	=	=
$\frac{pAMPK}{AMPK}$	=	=	=	↑	=	↑	↑	=
$\frac{pP70SK6}{P70SK6}$	=	=	=	=	=	=	=	=
$\frac{pGSK3}{tGSK3}$	↓	↓	=	↓	=	↓	=	=

5.2. Učinak transgeničnosti i galaktoze na koncentraciju kortikosterona u plazmi 7-mjesečnih i 12-mjesečnih miševa

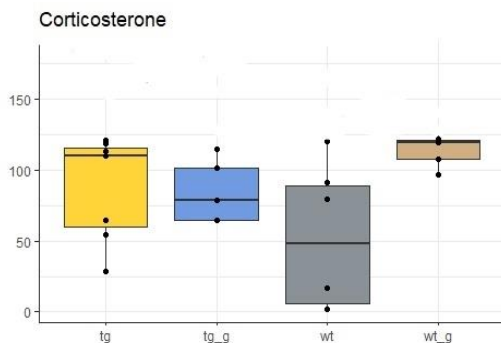
A)



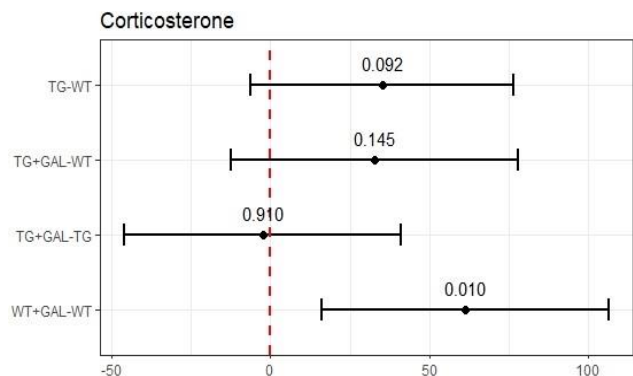
B)



C)



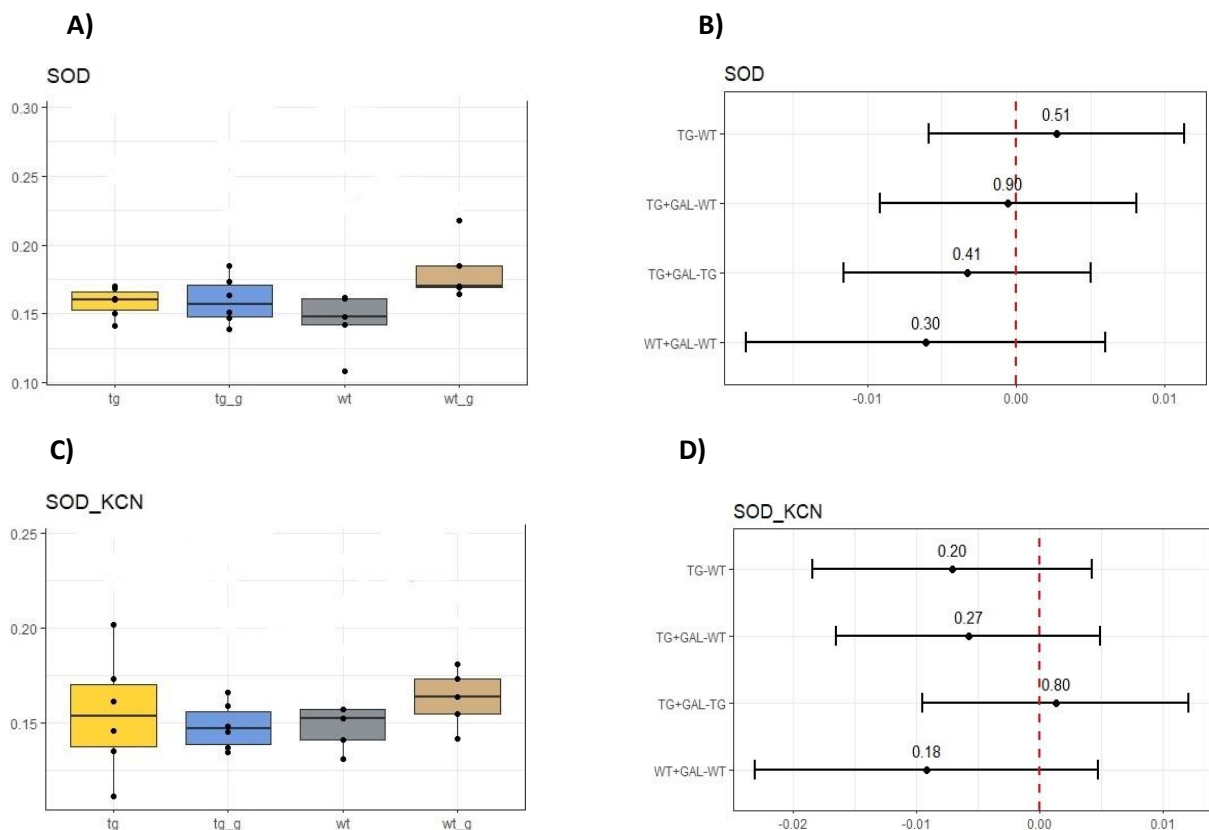
D)

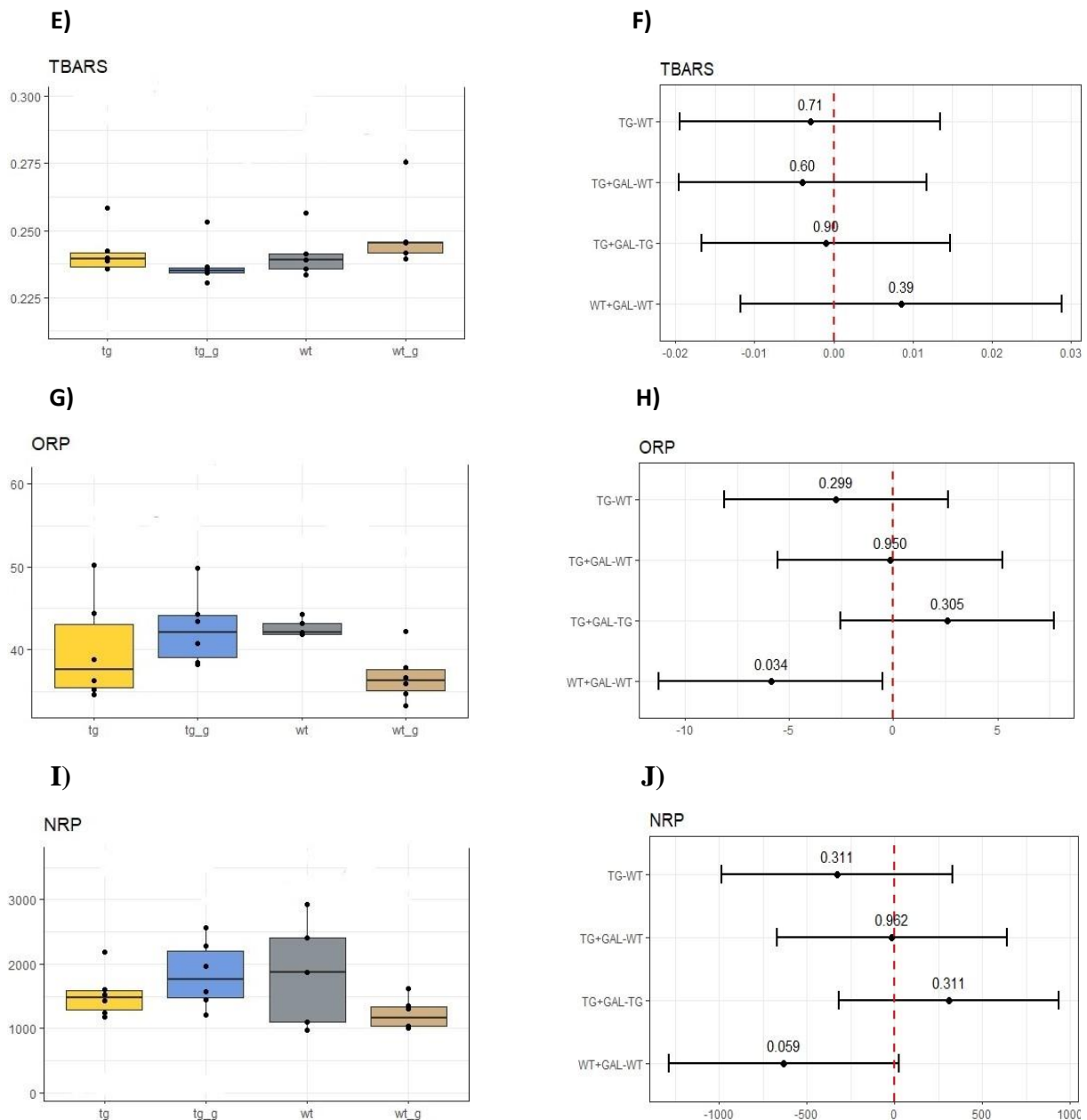


SLIKA 7. Učinak transgeničnosti i galaktoze na koncentraciju kortikosterona u plazmi 7-mjesečnih (A i B) i 12-mjesečnih miševa (C i D). Rezultati su prikazani kutijastim i preklapajućim raspršenim dijagramom (A i C) te grafovima učinka (eng. effect plot) (B i D). Na grafovima učinka prikazan je utjecaj transgeničnosti (TG - WT) te efekta galaktoze (WT+GAL – GAL), (TG+GAL – TG) i (TG+GAL – WT) na koncentraciju kortikosteroida u plazmi. Na y-osi označena je kategorijska varijabla (kontrast između odabranih grupa) i smjer razlike, a na x-osi kontinuirana varijabla dobivena oduzimanjem srednjih vrijednosti između odabranih grupa označenih na y-osi. Kada točka (eng. point estimate) sa 95% intervalom pouzdanosti siječe vertikalnu crvenu liniju tada učinak tretmana smatramo neznačajnim, u suprotnom, ukoliko ne dolazi do njihova preklapanja, učinak tretmana se smatra značajnim. Iznad intervala pouzdanosti označene su p vrijednosti učinka. **WT**- kontrolna skupina, **TG**- transgenična skupina, **WT+GAL**- kontrolna skupina na galaktozi, **TG+GAL**- transgenična skupina na galaktozi

U 7-mjesečnih miševa bilježimo značajan učinak transgeničnosti (TG-WT), $p=0,005$ koji dovodi do smanjene koncentracije kortikosterona u plazmi u odnosu na kontrolnu skupinu. Učinak galaktoze kod transgenične skupine (TG+GAL-TG), $p=0,011$ također je značajan te rezultira povećanjem koncentracije kortikosterona u plazmi takvih miševa (slika 7. A-B). Kod 12-mjesečnih miševa značajnu razliku primjećujemo u kontrolnoj skupini koja je uzimala galaktozu, $p=0,010$ što je također rezultiralo porastom koncentracije kortikosterona u plazmi u odnosu na kontrolnu skupinu koja galaktozu nije uzimala (slika 7. C-D).

5.3. Učinak transgeničnosti i galaktoze na pokazatelje oksidativnog stresa kod 7-mjesečnih miševa u regiji hipokampusa



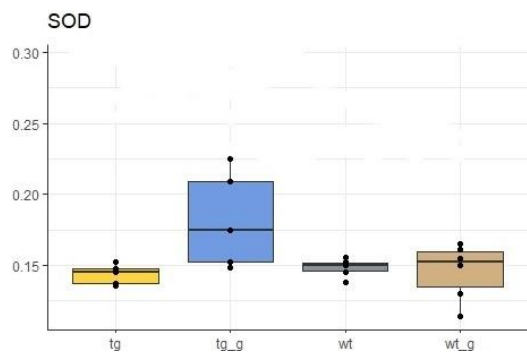


SLIKA 8. Učinak transgeničnosti i galaktoze na pokazatelje oksidativnog stresa kod 7-mjesečnih miševa u hipokampusu. Rezultati su prikazani kutijastim i preklapajućim raspršenim dijagramom (A,C,E,G,I) te grafovima učinka (eng. effect plot) (B,D,F,H,J). Na grafovima učinka prikazan je utjecaj transgeničnosti (TG - WT) te efekt galaktoze (WT+GAL - GAL),(TG+GAL - TG) i (TG+GAL - WT) na parametre oksidativnog stresa. Na y-osi označena je kategorijska varijabla (kontrast između odabranih grupa) i smjer razlike, a na x-osi kontinuirana varijabla dobivena oduzimanjem srednjih vrijednosti između odabranih grupa označenih na y-osi. Kada točka (eng.point estimate) sa 95% intervalom pouzdanosti siječe vertikalnu crvenu liniju tada učinak tretmana smatramo neznačajnim, u suprotnom, ukoliko ne dolazi do njihova preklapanja, učinak tretmana se smatra značajnim. Iznad intervala pouzdanosti označene su p vrijednosti učinka. **ORP**–oksidacijsko-redukcijski potencijal; **NRP**–nitrocelulozna redoks permanganometrija; **TBARS**–tvari koje reagiraju s tiobarbiturnom kiselinom; **SOD**–superoksid dismutaza; **SOD_KCN**- superoksid dismutaza sa dodanim inhibitorom Cu/Zn SOD-

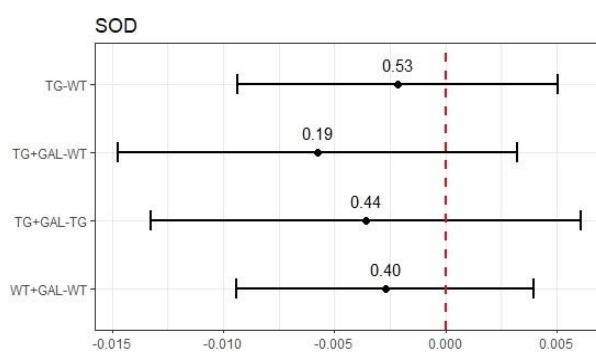
a KCN, **WT**- kontrolna skupina, **TG**- transgenična skupina, **WT+GAL**- kontrolna skupina na galaktozi, **TG+GAL**- transgenična skupina na galaktozi.

5.4. Učinak transgeničnosti i galaktoze na pokazatelje oksidativnog stresa kod 12-mjesečnih miševa u regiji hipokampusa

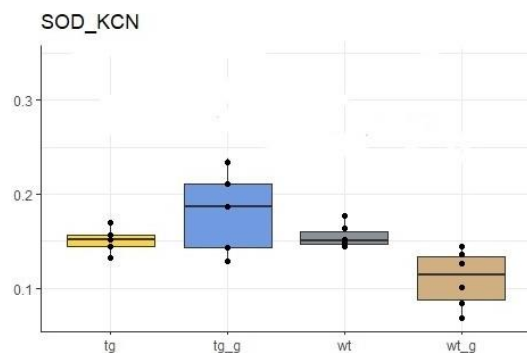
A)



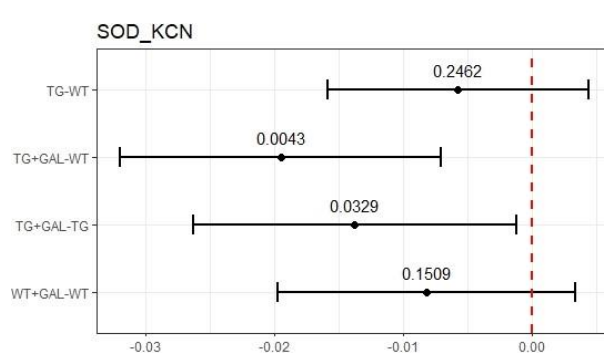
B)



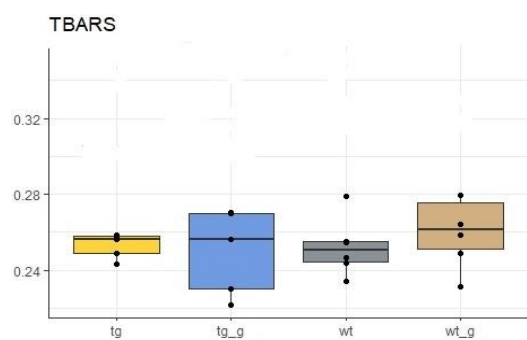
C)



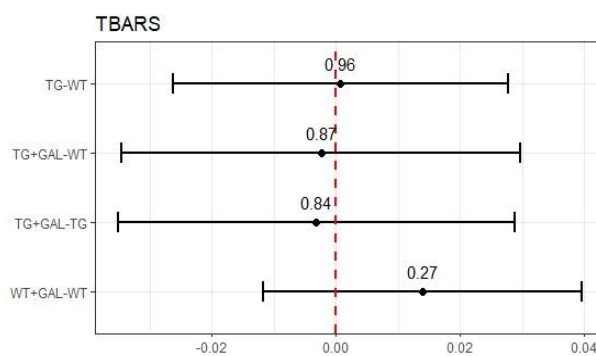
D)



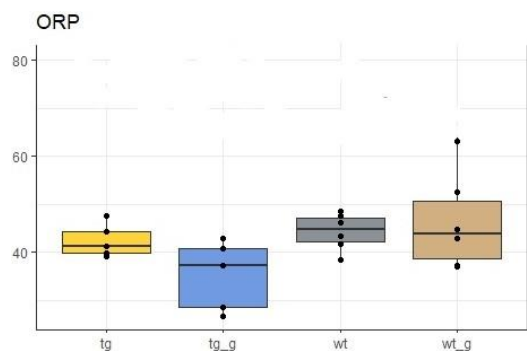
E)



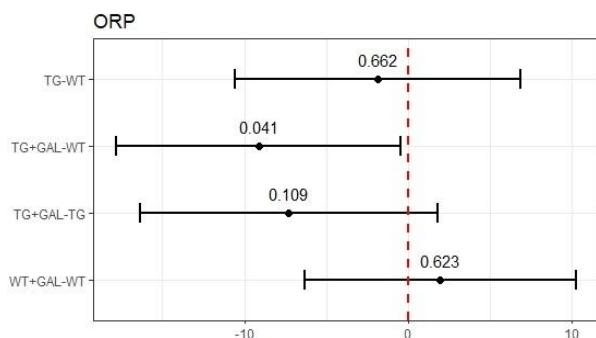
F)

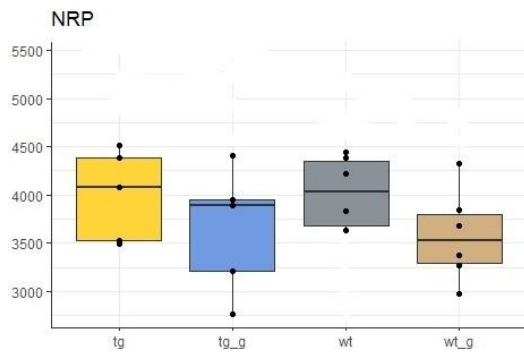
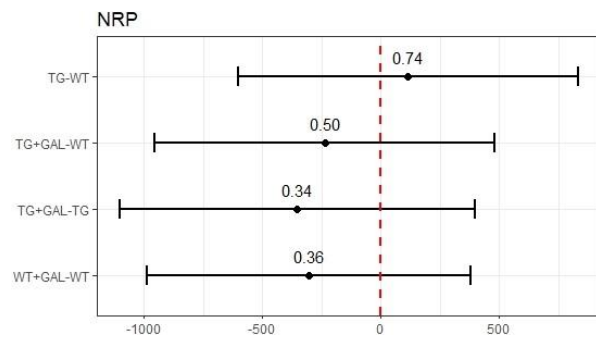


G)



H)



D)**J)**

SLIKA 9. Učinak transgeničnosti i galaktoze na pokazatelje oksidativnog stresa kod 12-mjesečnih miševa u hipokampusu. Rezultati su prikazani kutijastim i preklapajućim raspršenim dijagramom (A,C,E,G,I) te grafovima učinka (eng. effect plot) (B,D,F,H,J). Na grafovima učinka prikazan je utjecaj transgeničnosti (TG - WT) te efekt galaktoze (WT+GAL - GAL),(TG+GAL - TG) i (TG+GAL-WT) na parametre oksidativnog stresa. Na y-osi označena je kategorijska varijabla (kontrast između odabranih grupa) i smjer razlike, a na x-osi kontinuirana varijabla dobivena oduzimanjem srednjih vrijednosti između odabranih grupa označenih na y-osi. Kada točka (eng.point estimate) sa 95% intervalom pouzdanosti siječe vertikalnu crvenu liniju tada učinak tretmana smatramo neznačajnim, u suprotnom, ukoliko ne dolazi do njihova preklapanja, učinak tretmana se smatra značajnim. Iznad intervala pouzdanosti označene su p vrijednosti učinka. **ORP**–oksidacijsko-redukcijski potencijal; **NRP**–nitrocelulozna redoks permanganometrija; **TBARS**-tvari koje reagiraju s tiobarbiturnom kiselinom; **SOD**–superoksid dismutaza; **SOD_KCN**- superoksid dismutaza sa dodanim inhibitorom Cu/Zn SOD-a KCN, **WT**- kontrolna skupina, **TG**- transgenična skupina, **WT+GAL**- kontrolna skupina na galaktozi, **TG+GAL**- transgenična skupina na galaktozi

Ukupni antioksidativni kapacitet tkiva hipokampusa dobiven je analizom ORP-a i NRP-a. U 7-mjesečnih miševa značajan učinak zabilježen je samo kod kontrolne skupine koja je uzimala galaktozu u dvomjesečnom razdoblju (WT+GAL-WT; $p=0,034$) (slika 8 H) što znači da je kod njih 2-mjesečno uzimanje galaktoze dovelo do smanjenja ukupnog antioksidativnog kapaciteta. U 12-mjesečnih miševa galaktoza je imala značajan učinak kod transgeničnih miševa u odnosu na kontrolnu skupinu (TG+GAL vs WT), ostale usporedbe nisu bile značajne. (slika 9 G-J). Značajnija promjena lipidne peroksidacije (koncentracija malondialdehida) nije bilo niti u jednoj od ispitivanih skupina (slika 8 E-F) i (slika 9 E-F). Aktivnost superoksid dismutaze bila je bez značajnijih promjena u 7-mjesečnih miševa (slika 8 A-D), dok kod 12-mjesečnih miševa bilježimo značajan učinak galaktoze u transgeničnoj skupini (TG+GAL vs TG; $p=0,033$), (TG+GAL vs WT; $p=0,004$) gdje dodatkom inhibitora KCN blokiramo Cu/Zn SOD te bilježimo smanjenu aktivnost manganove superoksid dismutaze u oba slučaja. U svim ostalim usporedbama nije postignuta statistička značajnost te zaključujemo da razina oksidativnog stresa ostaje nepromijenjena.

6. DISKUSIJA

Alzheimerova bolest je najčešća neurodegenerativna bolest starijih osoba te je zbog svoje relativne nerazjašnjenosti predmet zanimanja mnogih znanstvenika (Savonenko i sur., 2015.). Istraživanja su u velikoj mjeri usmjerena na razjašnjavanje etiopatogeneze i metaboličkih promjena u pozadini samog oboljenja i iako postoji terapija koja, u nekih bolesnika, uspješno smanjuje simptome bolesti, efikasan lijek koji bi u potpunosti spriječio njen razvitak ili uzrokovao izlječenje, ostaje nepoznanica (Walsh i sur., 2021.). Veliki napredak u razumijevanju bolesti ostvaren je razvitkom transgeničnih životinjskih modela koji se prezentiraju kognitivnim deficitom i bihevioralnim promjenama te razvijaju iste patološke promjene u mozgu kao i oboljeli (Kobayashi i sur., 2005.). Jedan od najkorištenijih modela za istraživanje promjena fAB je Tg2576 model koji sadrži „švedsku“ mutaciju odgovornu za prekomjernu ekspresiju mutiranog APP-a, a korišten je u istraživanju opisanom u ovom radu. Poremećaji inzulinske signalizacije, mitohondrijske funkcije, oksidativnog stresa, povećanje krajnjih proizvoda napredne glikacije te pojava neuroinflamacije čest su nalaz u oboljelih od Alzheimerova, a čine poveznicu sa bolestima povezanim sa inzulinskom rezistencijom što je rezultiralo novim imenom „dijabetes tip 3“ (de la Monte i sur., 2008.). Budući da postoji rašireno mišljenje da je u podlozi bolesti rezistencija moždanih stanica na inzulin i nemogućnost dostatnog iskorištavanja glukoze te zbog niza dokaza koji upućuju na zajedničku patofiziologiju AB i T2DM (Steen i sur., 2005.), cilj ovog istraživanja je utvrditi da li galaktoza može poslužiti kao alterativni izvor energije za moždane stanice i odrediti postojanje njenog potencijalnog terapijskog učinka nakon dvomjesečne primjene ad libitum.

Provođenjem ovog istraživanja došli smo do značajnih rezultata, korisnih za daljnje shvaćanje kroničnog učinka galaktoze i transgeničnosti na dvije starosne skupine miševa koji su modeli za pre-simptomatski i blagi stadij bolesti, u dvije regije mozga, hipokampusu i hipotalamusu. Dobiveni rezultati ukazuju da nije bilo značajne promjene parametara oksidativnog stresa među ispitivanim skupinama. Nadalje, koncentracija kortikosterona u plazmi je bila snižena u 7-mjesečnih transgeničnih miševa u odnosu na kontrolu (TG vs WT), dok se kod 12-mjesečnih transgeničnih miševa bilježila veća koncentracija kortikosterona u odnosu na kontrolnu skupinu (TG vs WT), no kod potonjih razlika nije bila značajna. Također, izmjerena je ekspresija odabranih proteina inzulinske signalizacije, čije su promjene u ekspresiji sažeto prikazane (tablica 3 i 4), a detaljno su objašnjene niže u tekstu.

Premda većina istraživanja sam razvoj AB povezuje sa povećanom razinom oksidativnog stresa, postoje i oprečna istraživanja, u kojima pojava amiloidnih plakova smanjuje oksidativno oštećenje u odnosu na osjetljive, ali intaktne neurone (Castellani i sur., 2006). Zanimljivo, u našem istraživanju, mjerenjem i analizom parametara oksidativnog stresa u regiji hipokampusa nije zabilježeno značajnih promjena, osim u aktivnosti manganove superoksid dismutaze. Dobivene rezultate možemo objasniti: 1.) u pre-simptomatskom i ranom stadiju bolesti obično ne dolazi do poremećaja u oksidacijskom statusu kod ovog modela; 2.) učinak galaktoze mogao bi biti izraženiji kod dulje primjene (>2 mjeseca) ili pri većim koncentracijama; 3.) galaktoza bi mogla neizravno, povećavajući lučenje GLP-1 i GIP-a imati povoljan učinak na SŽS zbog neuroprotektivnog učinka GLP-1, no to u ovom eksperimentu unatoč povećanju brojnosti GLP-1R u području mozga izostaje zbog malih koncentracija u samoj plazmi (Perhoč i sur., 2018.).

Osovina hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda nadzire lučenje kortikosterona, koji kod laboratorijskih glodavaca predstavlja primarni kortikosteroid nadbubrežne žlijezde (Yu i sur., 2015.). Kod ljudi primarni hormon

adrenalne žlijezde je kortizol, a štakori i miševi ga ne proizvode u značajnim količinama jer im u području zone fasciculate nedostaje enzim 17- α hidroksilaza (Keeney i sur., 1995.). U pacijenata oboljelih od AB bilježe se kontinuirano visoke razine plazmatskog kortizola (Umegaki i sur.,2000.). Značajno povećane razine kortikosterona izmjerene su i u transgeničnih Tg2576 miševa u odnosu na kontrolu, bez obzira da li su miševi bili izolirani ili grupno smješteni u nastambama (Dong i sur.,2008.). U pravilu, veće koncentracije kortizola/kortikosterona bilježe se u oboljelih od Alzheimerera u odnosu na zdrave kontrole. Zanimljivo, u našem istraživanju kod 7-mjesečnih miševa, koji predstavljaju pre-simptomatski stadij bolesti, zabilježene su snižene razine kortikosterona u plazmi transgeničnih miševa u odnosu na kontrolnu skupinu (TG vs WT; $p=0,005$). Primjenom galaktoze dolazi do značajnog porasta koncentracije kortikosterona kod transgeničnih miševa u odnosu na one koji ju nisu dobivali (TG+GAL vs TG; $p=0,01$), dok ostale usporedbe nisu bile značajne. U 12-mjesečnih miševa, koji predstavljaju blagi stadij bolesti, plazmatske razine kortikosterona veće su kod transgenične nego kontrolne skupine (TG vs WT) što je u skladu sa ostalim istraživanjima. Kod ove starosne skupine, galaktoza značajan učinak postiže samo kod kontrolne skupine koja je uzimala galaktozu u odnosu na kontrolnu skupinu koja je dobivala običnu vodu (WT+GAL vs WT, $p=0,01$), dok ostale usporedbe nisu signifikantne. Imajući na umu da povišene koncentracije kortikosterona dovode do nastanka inzulinske rezistencije smanjujući utilizaciju glukoze, možemo pretpostaviti mogući negativni utjecaj galaktoze kod kontrolne skupine budući da se kod njih nakon njene primjene bilježi porast koncentracije kortikosterona.

Proteini koji su dio različitih signalnih puteva, a imaju ključne uloge u nastanku patogeneze AB analizirani su metodom Western blota. GSK-3 β je konstitutivno aktivan u većini tkiva i ima ključnu ulogu u modeliranju patoloških događaja oboljelih od AB (Forde i Dale, 2007.). Ova kinaza regulira A β produkciju utječući na aktivnost γ -sekretaze koja je odgovorna za cijepanje APPa (Cai i sur.,2012.) Zaključno, inhibicijom GSK3- β dolazi do smanjena A β patologije (Ly i sur.,2012.). U našem slučaju, budući da je AB poznata kao stanje inzulinske rezistencije mozga, očekivali bismo smanjenje ekspresije IR receptora, posljedično smanjenju aktivnost Akt proteina, što bi na posljetku dovodilo do izostanka fosforilacije na Ser9 navedene kinaze, njene pretjerane aktivacije i povećanja samih patoloških nalaza. Prije provedena analiza, u sklopu istraživanja opisanog u ovom radu, u regiji hipokampusa ukazala je na smanjenje ekspresije IR te smanjenje aktivnosti GSK-3 β (povećanje fosforilacije) u 7-mjesečnih miševa što ima kod njih blagotvoran učinak, te povećanje njegove aktivnosti u 12-mjesečnih miševa što bi moglo opravdati izostanak poboljšanja kognitivnog deficita kod te skupine (Perhoč i sur.,2018.). Čini se da učinak galaktoze na ekspresiju Akt proteina (fosforilira GSK3- β) ne pokazuje značajne promjene u 7-mjesečnoj skupini, dok kod 12-mjesečnih miševa postoji značajni porast u ekspresiji kod transgeničnih miševa u odnosu na kontrole, a primjenom galaktoze ta se značajnost gubi. U regiji hipotalamusa, također je zabilježena smanjena ekspresija IR u obje istraživane starosne dobi kod transgenične skupine (TG vs WT), što je u skladu sa prethodnim istraživanjima, a nakon primjene galaktoze kod 12-mjesečnih miševa došlo je do porasta u ekspresiji Akt proteina što upućuje na njen povoljan učinak. GSK3- β pokazuje povećanu aktivnost kod transgenične skupine u odnosu na kontrolnu u 7-mjesečnih miševa, a u 12-mjesečnih nije zabilježeno značajnih promjena. GSK3- β ciljna je molekula mnogih uzvodnih kinaza, a jedna od njih je p70SK6 koja u odgovoru na stimulaciju inzulinom ili nekim drugim čimbenikom rasta također dovodi do njene inaktivacije (Godemann i sur.,1999.). P70SK6 jedna je od ključnih kinaza preko kojih se vrši kontrola translacije proteina u mTOR sustavu, čija je regulacija u patologiji Alzheimerera narušena (Yang i sur.,2007.). Prethodna istraživanja su pokazala da u ljudskom mozgu u uznapredovalom stadiju dolazi do povećanja razina p-p70SK6 (An i sur.,2003.).

Naknadno, izmjerene su razine fosforiliranog oblika i u hipokampalnoj regiji transgeničnih Tg2576 miševa, gdje su u dobi od 3-4 mjeseca izmjerene snižene razine ovog proteina, dok kod starijih miševa u dobi od 21 mjesec te promjene više nisu bile vidljive (Ma i sur.,2010.). U našim rezultatima, sama transgeničnost nije imala značajnog utjecaja na ekspresiju niti u jednoj od istraživanih regija što možemo djelomično objasniti time da su u istraživanju korišteni miševi druge starosne dobi, točnije, čini se da u razdoblju od 3 do 7 mjeseci dolazi do povećanja prethodno smanjenih razina fosforiliranog oblika p70sk6 u ovog modela. Transport glukoze u mozgu se odvija pomoću GLUT3 receptora čija je ekspresija u oboljelih od Alzheimerera snižena (Liu i sur.,2008.). Analizom ekspresije GLUT4 receptora, uočili smo povećanje ekspresije kod transgenične skupine (TG vs WT) u dobi od 12 mjeseci u regiji HPC-a te u 7-mjesečnih transgeničnih miševa (TG vs WT) u regiji hipotalamusa što bi mogli objasniti kao kompezatornu reakciju stanica. Zanimljiv nalaz je, da smo uočili smanjenje ekspresije proteina u istih tih skupina nakon dvomjesečne primjene galaktoze, dok ostali učinci nisu bili značajni. U stanjima inzulinske rezistencije narušeno je iskorištavanje glukoze te dolazi do promjena u energijskom statusu stanica. Jednu od ključnih uloga u reguliranju kataboličkih i anaboličkih reakcija ima AMPom-aktivirana protein kinaza. AMPK se aktivira u stanjima niske energije, povišenom vrijednošću omjera AMP/ATP što dovodi do njene fosforilacije (Viollet i sur.2009.). Povećanje ekspresije pAMPK uočeno je u HPC regiji 7-mjesečnih transgeničnih miševa u odnosu na kontrolu, dok je njeno snižavanje zabilježeno nakon kronične primjene galaktoze što bi se moglo objasniti da je galaktoza djelovala kao alternativni izvor energije i dovela do poboljšanja narušenog energetskog stanja stanica. U području HPT-a, povećanje aktivnosti AMPK (gledano kao omjer pAMPK/AMPK) uočeno je kod kontrolne skupine 7-mjesečnih miševa nakon primjene galaktoze (WT vs WT+GAL) te kod transgenične skupine 12-mjesečnih miševa također nakon primjene galaktoze (TG vs TG+GAL). Čini se da u ovom slučaju galaktoza nije popravila energetsko stanje stanice, no dodatno objašnjenje bi mogli potražiti i u tome da se AMPK nalazi u sastavu više različitih signalnih puteva te da je utjecaj na njenu ekspresiju mogao imati i neki drugi uzvodni protein, primjerice CAMKK2 koji ima dokazan učinak na njegovu aktivaciju u neuronima i T-stanicama (Anderson i sur.,2008.) Naposljetku, analizirali smo ekspresiju mitohondrijskog COX4 proteina kako bismo dobili potpuniji uvid u energijski status. Veliki broj istraživanja ukazao je na redukciju COX4 aktivnosti i povećanje oksidativnog stresa u mozgu oboljelih od AB (Bosetti i sur., 2002.). Akumulacija mutacija mtDNA ovisne o starosti rezultira povećanjem oksidativnog stresa i oštećenjima proteina respiratornog lanca, posebice COX4 (eng. cytochrome c oxidase, subunit 4) što bi moglo biti dio objašnjenja za nastanak sporadičnog oblika AB koji nastupa u kasnijoj životnoj dobi (Li i sur.,2006.). Postoje već prethodno provedena istraživanja u kojima se mjerila ekspresija COX4 proteina kod miševa sa „švedskom“ mutacijom dobi 2 i 17 mjeseci, gdje nisu zabilježene značajne promjene u ekspresiji COX4 proteina(Manczak i sur.,2006.). U našem istraživanju, također nije postojala značajna razlika u ekspresiji COX4 Tg2576 u odnosu na kontrolnu skupinu niti jedne od istraživanih skupina u regiji hipokampusu i hipotalamusa što je u skladu sa prethodno navedenim istraživanjem, ali i sa našim rezultatima oksidativnog stresa gdje se čini da oksido-reduktivni procesi nisu narušeni u modelu predoptomatskog i blagog stadija bolesti. Sumarno, rezultati prezentirani u ovom radu, nude pregled učinka same transgeničnosti, ali i kroničnog učinka peroralne galaktoze primijenjene ad libitum na promjene metabolizma i oksidativnog stresa u familijarnom modelu Alzheimerove bolesti. Mišljenja smo da bi dobiveni rezultati mogli doprinjeti u razjašnjavanju mehanizma učinka galaktoze u modelima fAB-a, ali i svjesni činjenice da su potrebna daljnja ekstenzivna istraživanja zbog same raznolikosti u administraciji galaktoze, starosnoj dobi miševa i kompleksnosti molekularnih puteva, kako bismo mogli donijeti konkretnije zaključke i odgovore na datu temu.

7.ZAKLJUČCI

- 1.) Dvomjesečna peroralna administracija galaktoze ad libitum dovela je do smanjenja aktivnosti manganove superoksid dismutaze kod 12-mjesečnih transgeničnih miševa (TG+GAL vs WT),(TG+GAL vs TG), dok u 7-mjesečnih miševa nije imala značajni učinak pa je moguće da nastale promjene ovise o starosnoj dobi miša i stadiju bolesti.
- 2.) Galaktoza kod 7-mjesečnih kontrolnih životinja (WT+GAL vs WT) te kod 12-mjesečnih transgeničnih (TG+GAL vs WT) smanjuje ORP te pokazuje različit obrazac promjene između isptivanih skupina što možemo objasniti da navedene promjene ovise o starosnoj dobi miševa.
- 3.) U plazmi 7-mjesečnih transgeničnih miševa izmjerene su snižene razine kortikosterona u odnosu na kontrolu (TG vs WT) te povišene vrijednosti nakon primjene galaktoze kod transgenične skupine (TG+GAL vs TG). U 12-mjesečnih miševa galaktoza povećava kortikosteron u plazmi (WT+GAL vs WT) što upućuje na njeno potencijalno negativno djelovanje kod kontrolne skupine.
- 4.) Biokemijske promjene koje su učinak transgeničnosti (TG vs WT) u regiji HPT-a kod 7-mjesečnih miševa, a koje utječu na inzulinsku signalizaciju vidljive su kao smanjenje ekspresije IR, povećanje aktivnosti GSK3-beta i povećanje ekspresije GLUT4, dok kod 12-mjesečnih miševa zabilježeno je samo smanjenje IR.
- 5.) Biokemijske promjene koje su učinak galaktoze (TG+GAL vs WT) u regiji HPT-a kod 7-mjesečnih miševa rezultirale su smanjenom ekspresijom GLUT4, AKT, pGSK3/tGSK3 te IR. Kod 12-mjesečnih miševa kronični učinak galaktoze prezentirao se smanjenom ekspresijom AKT i pGSK3/tGSK3, a povećanjem pAMPK/AMPK.
- 6.) U regiji HPC-a kod 7-mjesečnih miševa zabilježen je značajan učinak transgeničnosti (TG vs WT) na ekspresiju AMPK i pAMPK gdje je u oba slučaja došlo do njihova povećanja, a u 12-mjesečnih miševa zabilježeni su značajni porasti u ekspresiji GLUT4, AKT i p70SK6 proteina.
- 7.) Značajan učinak galaktoze (TG+GAL vs WT) u regiji HPT-a kod 7-mjesečnih miševa prezentiralo se kao povećanje u ekspresiji AMPK, a smanjenje p70SK6. U 12-mjesečnih miševa galaktoza je dovela do smanjenja GLUT4 ekspresije te povećanja p70SK6.

8.ZAHVALE

Hvala prof.dr.sc. Meliti Šalković-Petrišić, voditeljici laboratorija za molekularnu neurofarmakologiju, na prilici da kao studentica učim u njenom laboratoriju.

Veliko hvala mojoj mentorici, izv.prof.dr.sc. Jeleni Osmanović-Barilar, na ukazanom povjerenju, stručnom i strpljivom vodstvu te svim savjetima i pomoći prilikom izrade ovoga rada.

Hvala bacc.med.lab.diag. Josipu Paviću što me naučio raditi Western blot.

Veliko hvala i prof.dr.sc. Vladimiru Trkulji na odličnom objašnjavanju statistike i konstruktivnim kritikama nakon kojih bih se uvijek oporavljala po tjedan dana haha :)

Hvala dr.med. Janu Homolaku na svim tips&tricks u svezi metoda koje sam koristila, Joji na pomoći kad god je trebalo i Graciji na tehničkoj pomoći pri mjerenju TBARS-a.

Naposljetku, najveće hvala mojoj obitelji i cimerici Franki na svemu. Legende ste!

9.POPIS LITERATURE

- An, Y., Varma, V. R., Varma, S., Casanova, R., Dammer, E., Pletnikova, O., Chia, C. W., Egan, J. M. (2018). Evidence for brain glucose dysregulation in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, 14(3), 318–329.
- Anandatheerthavarada HK, Biswas G, Robin MA, Avadhani NG. Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells. *J Cell Biol.* 2003 Apr 14;161(1):41-54.
- Anderson, Kristin A., et al. "Hypothalamic CaMKK2 contributes to the regulation of energy balance." *Cell metabolism* 7.5 (2008): 377-388.
- Babic Perhoc A, Osmanovic Barilar J, Knezovic A, Farkas V, Bagaric R, Svarc A, i sur. Cognitive, behavioral and metabolic effects of oral galactose treatment in the transgenic Tg2576 mice. *Neuropharmacology.* 2019;148:50–67.
- Blennow K. de Leon M. J. Zetterberg H. 2006Alzheimer's disease. *Lancet*, 368(9533), 387-403
- Bosetti F, Brizzi F, Barogi S, Mancuso M, Siciliano G, Tendi EA, Murri L, Rapoport SI, Solaini G. Cytochrome c oxidase and mitochondrial F1F0-ATPase (ATP synthase) activities in platelets and brain from patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2002 May-Jun;23(3):371-6
- Budni, J., Garcez, M. L., Mina, F., Bellettini-Santos, T., da Silva, S., Luz, A. P. da, ... Quevedo, J. (2017). *The oral administration of D-galactose induces abnormalities within the mitochondrial respiratory chain in the brain of rats. Metabolic Brain Disease*, 32(3), 811–817.
- Cai H., Wang Y., McCarthy D., Wen H., Borchelt D. R., Price D. L. and Wong P. C. (2001) BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons. *Nat. Neurosci.* 4, 233–234
- Cao, Tinghui, Min He, Tianyu Bai, i Hui Liu. 2016. „Establishment of a Method for Measuring Antioxidant Capacity in Urine, Based on Oxidation Reduction Potential and Redox Couple I2/KI“. *Bioinorganic Chemistry and Applications* 2016
- Castellani, R.J., Lee, HG., Zhu, X. *et al.* Neuropathology of Alzheimer disease: pathognomonic but not pathogenic. *Acta Neuropathol* 111, 503–509 (2006).
- Chogtu B, Avinash A, Kunder SK, Tilak A, Sori R. Evaluation of acute and chronic effects of D-galactose on memory and learning in Wistar rats. *Clin Psychopharmacol Neurosci.* 2017;March 2017.
- Davies P, Maloney AJF. Selective Loss of Central Cholinergic Neurons in Alzheimer's Disease. *Lancet.* 1976;308(8000):1403.
- de la Monte SM, Wands JR. Alzheimer's disease is type 3 diabetes-evidence reviewed. *J Diabetes Sci Technol.* 2008 Nov;2(6):1101-13.
- Dong H, Yuede CM, Yoo HS, Martin MV, Deal C, Mace AG, Csernansky JG. Corticosterone and related receptor expression are associated with increased beta-amyloid plaques in isolated Tg2576 mice. *Neuroscience.* 2008 Jul 31;155(1):154-63
- Forde JE, Dale TC. Glycogen synthase kinase 3: a key regulator of cellular fate. *Cell Mol Life Sci.* 2007 Aug;64(15):1930-44
- Godeman R., Bierant J., Mandelkow E., 1999., Phosphorylation of tau protein by recombinant GSK-3beta, *FEBS Lett.*, 157-164

- Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci.* 1991;12(C):383–8.
- Ho L, Qin W, Pompl PN, Xiang Z, Wang J, Zhao Z, i sur. Diet-induced insulin resistance promotes amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J.* 2004;18(7):902–4.
- Homolak, J, I Kodvanj, A Babic Perhoc, D Virag, A Knezovic, J Osmanovic Barilar, P Riederer, i M Salkovic Petrisic. 2020. „Nitrocellulose Redox Permanganometry: A Simple Method for Reductive Capacity Assessment“, lipanj.
- Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, i sur. Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science.* 1996;274(5284):99–102.
- Irizarry MC, McNamara M, Fedorchak K, Hsiao K, Hyman BT. APPSw transgenic mice develop age-related A beta deposits and neuropil abnormalities, but no neuronal loss in 154 CA1. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1997;56(9):965–73.
- Kawarabayashi T, Younkin LH, Saido TC, Shoji M, Ashe KH, Younkin SG (2001) Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (β) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 21: 372–381.
- Keeney DS, Jenkins CM, Waterman MR. Developmentally regulated expression of adrenal 17 alpha-hydroxylase cytochrome P450 in the mouse embryo. *Endocrinology.* 1995 Nov;136(11):4872-9.
- Kleinridders A, Ferris HA, Cai W, Kahn CR. Insulin action in brain regulates systemic metabolism and brain function. *Diabetes.* 2014 Jul;63(7):2232-43.
- Kobayashi D.T. and Chen K.S. Behavioral phenotypes of amyloid-based genetically modified mouse models od Alzheimer's Disease, *Genes Brain Behav.* 4, 173-196
- Krzysztoforska K, Piechal A, Blecharz-Klin K, Pyrzanowska J, Joniec-Maciejak I i sur. Administration of protocatechuic acid affects memory and restores hippocampal and cortical serotonin turnover in rat model of oral D-galactose induced memory impairment. *Behav Brain Res.* 2019;368
- Li XH, Chen C, Tu Y, Sun HT, Zhao ML, Cheng SX, Qu Y, Zhang S. Sirt1 promotes axonogenesis by deacetylation of Akt and inactivation of GSK3. *Mol Neurobiol.* 2013 Dec;48(3):490-9.
- Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature.* 2006 Oct 19;443(7113):787-95
- Liu Y, Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Gong CX. Decreased glucose transporters correlate to abnormal hyperphosphorylation of tau in Alzheimer disease. *FEBS Lett.* 2008 Jan 23;582(2):359-64.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, i R. J. Randall. 1951. „Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent“. *The Journal of Biological Chemistry* 193 (1): 265–75.
- Ma T, Hoeffler CA, Capetillo-Zarate E, Yu F, Wong H, Lin MT, Tampellini D, Klann E, Blitzer RD, Gouras GK. Dysregulation of the mTOR pathway mediates impairment of synaptic plasticity in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One.* 2010 Sep 20;5(9):e12845.
- Maria Manczak, Thimmappa S. Mitochondria are a direct site of A β accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression, *Human Molecular Genetics*, Volume 15, Issue 9, 1 May 2006, Pages 1437–1449,
- Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem.* 1974 Sep 16;47(3):469-74.

- Maurer K, Volk S, Gerbaldo H, Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet*. 1997 May 24;1546-9.
- Patterson, C. (2018) World Alzheimer Report 2018. The State of the Art of Dementia Research: New Frontiers. An Analysis of Prevalence, Incidence, Cost and Trends. Alzheimer's Disease International.
- Prabhakar, P. V., Reddy, U. A., Singh, S. P., Balasubramanyam, A., Rahman, M. F., Indu Kumari, (2012). Oxidative stress induced by aluminum oxide nanomaterials after acute oral treatment in Wistar rats. *Journal of Applied Toxicology*, 32(6), 436–445
- Price JL, McKeel DW Jr, Buckles VD, Roe CM, Xiong C et al. Neuropathology of nondemented aging: presumptive evidence for preclinical Alzheimer disease. *Neurobiol Aging*. 2009 Jul;30(7):1026-36.
- Salkovic-Petrisic M, Osmanovic-Barilar J, Knezovic A, Hoyer S, Mosetter K, Reutter W. Long-term oral galactose treatment prevents cognitive deficits in male Wistar rats treated intracerebroventricularly with streptozotocin. *Neuropharmacology*. 2014 Feb;77:68-80.
- Savonenko, A. V., Melnikova, T., Li, T., Price, D. L., (2015). Alzheimer Disease. In *Neurobiology of Brain Disorders: Biological Basis of Neurological and Psychiatric Disorders* (pp. 321-338). Elsevier Inc.
- Scheltens P, Blennow K, Breteler MM, de Strooper B, Frisoni GB, Salloway S i sur. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2016;388(10043):505-17.
- Steen E, Terry BM, Rivera EJ, Cannon JL, Neely TR, Tavares R, Xu XJ, Wands JR, de la Monte SM. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? *J Alzheimers Dis*. 2005 Feb;7(1):63-80.
- Takeuchi A, Irizarry MC, Duff K, Saido TC, Hsiao Ashe K, Hasegawa M, Mann DM, Hyman BT. 2000. Age-related amyloid beta deposition in transgenic mice overexpressing both Alzheimer mutant PSE1 and APP Swedish mutant is not associated with global neuronal loss. *Am J Pathol* 157: 331–339.
- Tian Yu, Hang Xu, Weiwen Wang, Shifei Li, Zheng Chen, Huihua Deng, Determination of endogenous corticosterone in rodent's blood, brain and hair with LC–APCI–MS/MS, *Journal of Chromatography B*, Volume 1002, 2015, Pages 267-276,
- Umegaki, Hiroyuki & Ikari, Hiroyuki & Nakahata, Hideki & Endo, Hidetoshi & Suzuki, Yusuke & Ogawa, Osamu(2000). Plasma cortisol levels in elderly female subjects with Alzheimer's disease: A cross-sectional and longitudinal study. *Brain research*. 881. 241-3.
- Velazquez, Ramon et al. “Central insulin dysregulation and energy dyshomeostasis in two mouse models of Alzheimer's disease.” *Neurobiology of aging* vol. 58 (2017): 1-13.
- Viollet B, Athes Y, Mounier R, et al. AMPK: Lessons from transgenic and knockout animals. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009;14(1):19-44. Published 2009 Jan 1.
- Walsh S, Merrick R, Milne R, Brayne C Aducanumab for Alzheimer's disease? *BMJ*. 2021, Jul 5;374:1682.
- Westerman MA, Cooper-Blacketer D, Mariash A, Kotilinek L i sur. The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2002;22(5):1858–67.
- Yasushi Tomidokoro, Yasuo Haeigaya, Etsuro Matsubara, (2001) Brain A β amyloidosis in APPsw mice induces accumulation of presenilin-1 and tau *The Journal of Pathology* 194; 500-506

10.SAŽETAK

UTJECAJ PERORALNO PRIMIJENJENE GALAKTOZE NA METABOLIČKE PROMJENE U HIPOKAMPUSU I HIPOTALAMUSU TRANSGENIČNOG MIŠJEG MODELA ALZHEIMEROVE BOLESTI

Diana Kovač

Alzheimerova bolest je neurodegenerativni poremećaj koji se očituje progresivnim deficitom u pamćenju te bihevioralnim promjenama, a u konačnici dovodi do razvoja demencije. Familijarni oblik Alzheimerove bolesti (fAB) rjeđi je oblik i pretežito zahvaća osobe mlađe od 60 godina te je povezan sa ranim nastupom simptoma. Transgenični mišji model Tg2576 jedan je od najboljih modela fAB-a, a korišten je u ovom istraživanju. Ispitani su učinci transgeničnosti te kronični učinak 2-mjesečne primjene galaktoze ad libitum u dvije različite faze bolesti- preasimptomatski i blagi stadij. Izmjerena je ekspresija odabranih proteina inzulinske signalizacije (IR, AKT, COX4, GLUT4, AMPK, pAMPK, p70SK6, p-p70SK6, tGSK3 i pGSK3-beta) u dvije regije mozga, hipokampusu i hipotalamusu. Nadalje, izmjereni su i parametri oksidacijskog stresa (TBARS, SOD, ORP, NRP) te su ukazali na nepostojanje promjena u oksidacijskom statusu HPC-a. Kompetitivnim ELISA testom određene su koncentracije kortikosterona u plazmi. Naši rezultati ukazuju na postojanje metaboličkih razlika između dvije ispitivane regije mozga HPT-a i HPC-a u dvije različite starosne dobi miševa (7 i 12 mjeseci) te potvrđuju važnost odabira odgovarajućeg modela i stadija AB-a u ispitivanju novih potencijalnih terapijskih čimbenika.

Ključne riječi: Alzheimerova bolest, galaktoza, oksidativni stres, kortikosteron, inzulinska signalizacija

11.SUMMARY

THE EFFECT OF ORAL GALACTOSE ADMINISTRATION ON METABOLIC CHANGES IN THE HIPPOCAMPUS AND HYPOTHALAMUS OF THE TRANSGENIC MOUSE MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE

Diana Kovač

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disorder that is characterized by progressive loss of memory, behavioral changes and ultimately leads to the development of dementia. Familial Alzheimer's disease (fAD) is a rarer form of Alzheimer's disease, associated with the early onset of symptoms, generally affecting people below the age of 60. Transgenic mouse model Tg2576 is one of the best fAD models and it was used in this research. The effects of transgenicity and the chronic effect of 2-month administration of galactose ad libitum were examined in two different stages of the disease - presymptomatic and mild stage. The expression of selected insulin signaling proteins was measured (IR, AKT, COX4, GLUT4, AMPK, pAMPK, p70SK6, p-p70SK6, tGSK3 and pGSK3-beta) in two brain regions: the hippocampus and hypothalamus. Furthermore, oxidative stress parameters (TBARS, SOD, ORP, NRP) were measured and indicated the absence of changes in the oxidative status of HPC. Plasma corticosterone concentrations were determined by Competitive ELISA. Our results indicate the existence of metabolic differences between the two examined brain regions HPT and HPC at two different ages of mice (7- and 12-month-old) and confirm the importance of selecting the appropriate model and stage of AD when examining new potential therapeutic factors.

Key words: Alzheimer's disease, galactose, oxidative stress, corticosterone, insulin signalization

12.ŽIVOTOPIS

Moje ime je Diana Kovač. Rođena sam 2.5.1997. godine u Ljubuškom, Bosna i Hercegovina. Osnovnu školu „Tina Ujevića“ i Gimnaziju „Ljubuški“ završila sam kao Učenica generacije. Godine 2016. upisala sam Medicinski fakultet u Zagrebu gdje sam na 3. godini dobila Dekanovu nagradu za uspjeh (5,0). Tijekom studija obavljala sam demonstrature iz predmeta: Anatomija i klinička anatomija, Temelji neuroznanosti, Patofiziologija i Klinička propedeutika. Članica sam volonterske udruge „Krijesnica“ za pomoć djeci oboljeloj od malignih bolesti i igram futsal u ženskoj futsal sekciji MEF-a.

