

Sveučilište u Zagrebu
Medicinski fakultet

Vito Papić

Modeliranje Parkinsonove bolesti intrastriatalnom primjenom diabetogene supstance

Zagreb, 2024.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za Farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv.prof.dr.sc. Jelene Osmanović-Barilar, u sklopu znanstvenog projekta „Mehanizmi nutrijentom posredovanih učinaka glukagonu sličnog peptida-1 na kognitivne i metaboličke poremećaje u eksperimentalnim modelima neurodegenerativnih bolesti,“ IP-2018-01-8938, Voditelj Melita Šalković-Petrišić, te Sveučilišnog projekta „Modeliranje Parkinsonove bolesti centralnom primjenom streptozotocina u strijatum ili supstanciju nigru štakora,“ Voditelj Ana Knezović, i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2023./2024.

Popis i objašnjenje kratica korištenih u radu:

PB – Parkinsonova bolest

S – corpus striatum

HPC - hipokampus

HPT - hipotalamus

IR – inzulinski receptor

D1 – dopaminski receptor D1

AMPAR – AMPA glutamatni receptor

ChAT – kolin acetiltransferaza

AD – Alzheimerova bolest

SD – standardna devijacija

ATP – adenzin trifosfat

GTP – gvanozin trifosfat

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. PARKINSONOVA BOLEST	1
1.2. TRENUTNI TERAPIJSKI PRISTUPI LIJEČENJU PARKINSONOVE BOLESTI.....	2
1.3. INZULINSKA REZISTENCIJA KAO TEORIJA NASTANKA PARKINSONOVE BOLESTI	2
2. HIPOTEZA, OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	4
3. MATERIJALI I METODE	5
3.1. ŽIVOTINJE.....	5
3.2. ETIKA	5
3.3. DIZAJN EKSPERIMENTA.....	5
3.4. BIHEVIORALNO-MOTORIČKA PROCJENA.....	5
3.5. PRIPREMA TKIVA	7
3.6. BIOKEMIJSKA I METABOLIČKA ANALIZA	8
3.7. STATISTIKA.....	9
4. REZULTATI	10
4.1. REZULTATI ISPITIVANJA MOTORIČKE FUNKCIJE	10
4.2. REZULTATI ISPITIVANJA KOGNITIVNO-BIHEVIORALNE FUNKCIJE	10
4.3. REZULTATI BIOKEMIJSKE ANALIZE	13
4.4. METABOLOMIKA.....	15
5. RASPRAVA	17
6. ZAKLJUČCI	21
7. SAŽETAK	22
8. CONCLUSION	23
9. POPIS LITERATURE	24

1. UVOD

1.1. Parkinsonova bolest

Parkinsonova bolest (PB) je neurodegenerativna bolest karakterizirana progresivnim gubitkom dopaminergičkih neurona u *substantia nigra pars compacta* mezencefalona i drugih monoaminskih neurona mozga. Prema procjenama iz 2016. godine, u prethodećem 20-godišnjem razdoblju uočen je znatan rast u incidenciji i prevalenciji Parkinsonove bolesti, te se sveukupni broj dijagnosticiranih popeo na 6,1 milijuna (Li i sur., 2023). Parkinsonova je bolest druga najčešća neurodegenerativna bolest današnjice (Athauda i sur., 2016). Epidemiološke studije ukazuju na muški spol, stariju životnu dob, život u ruralnim sredinama i izloženost pesticidima kao rizične faktore za razvoj PB-a. Pacijenti se često prvo javljaju liječniku zbog tremora u ekstremitetima, koji je najčešće jednostran i sporije frekvencije od esencijalnog tremora. (Hayes, 2019). Ne postoji definitivni test za dijagnozu PB-a, tako da se dijagnoza mora postaviti temeljem kliničkih kriterija. Tremor u mirovanju, bradikinezija, rigidnost i gubitak posturalnih refleksa smatraju se ključnim znakovima PB-a. Prisutnost specifičnih prezentacija ovih značajki koristi se kako bi se PB izdvojio od srodnih poremećaja. Druge kliničke značajke uključuju sekundarne motoričke simptome (npr. hipomimija, dizartrija, disfagija, sijaloreja, mikrografija, vukući hod, festinacija, fenomen smrzavanja, distonija), nemotorički simptomi (npr. autonomna disfunkcija, kognitivne i neurobiheviornalne abnormalnosti, poremećaji spavanja i senzorne abnormalnosti poput anosmije, parestezije i boli) (Jankovic, 2008). Kod nekih pacijenata, klasični parkinsonski tremor jedina je manifestacija bolesti, no prema kliničkom iskustvu, i ti pacijenti u konačnici razviju ostale simptome bolesti (Hayes, 2019). Oštećenje kognitivnih funkcija u PB-u heterogeno je u svojim simptomima, ozbiljnosti i progresiji, te varira od suptilnih promjena do blagog kognitivnog oštećenja, sve do ozbiljnih deficita sličnih demenciji (Goldman i sur., 2020). Simptomi anksioznosti javljaju se u otprilike 40% pacijenata s PB-om. Nova saznanja ukazuju da anksioznost u PB-u nije primarno utemeljena u dopaminergičkom deficitu u bazalnim ganglijima, već da je povezana s ekstrastrijatalnom patologijom (Wang i sur., 2023).

1.2. Trenutni terapijski pristupi liječenju Parkinsonove bolesti

Glavno patološko obilježje PB-a je depigmentacija substantije nigre i locus coeruleus s gubitkom neurona u pars compacta substantije nigre. Gubitak neurona vidljiv je i u nucleus basalis Meynerti i dorzalnim motoričkim jezgrama n. vagusa. U zahvaćenim područjima pronalaze se Lewyjeva tjelešca, eozinofilna citoplazmatska inkluzijska tjelešca koja sadrže α -sinuklein (Hayes, 2019). Trenutni farmakoterapijski pristupi liječenju Parkinsonove bolesti usmjereni su na ublažavanje kliničkih simptoma, primjerice podizanjem razine dopamina u mozgu, aktivacijom dopaminskih receptora na postsinaptičkoj membrani ili onemogućavanjem razgradnje ovog neurotransmitera, no niti jedna trenutno dostupna terapija ne odgađa smrt dopaminergičkih neurona i progresiju bolesti (Li i sur., 2023; Muddapu i sur., 2020). Unatoč dugom nizu spojeva koji su pokazali neuroprotektivni učinak u in vitro ili u životinjskim modelima, do sada niti jedan nije uvjerljivo dokazao ikakav učinak na progresiju bolesti u kliničkim ispitivanjima (Athauda i Foltynie, 2016). Retrospektivna analiza prekliničkih istraživanja novih lijekova za PB pokazala je da je u 90% istraživanja na miševima, 95% istraživanja na štakorima i 67-80% istraživanja na primatima uočeno poboljšanje motoričkog deficita. Međutim, samo u 32% istraživanja na ljudima pokazalo je vrlo malo kliničko poboljšanje (Marshall i sur., 2023). Razlog ovakvoj razlici najvjerojatnije leži u nemogućnosti replikacije svih kliničkih obilježja PB-a u životinjskim modelima. PB nije karakterizirana samo motoričkim deficitom već njenu kliničku sliku karakteriziraju i ne-motorički simptomi. U ne-motoričke simptome ubrajamo kognitivni deficit, anksioznost, dizatriju te konstipaciju (Dovonou i sur., 2023). Prema tome, razvojem novog životinjskog modela Parkinsonove bolesti mogao bi se omogućiti bolji uvid u patofiziologiju bolesti i efikasniju selekciju potencijalnih kandidata za terapiju, a time u konačnici i unaprijediti mogućnost liječenja.

1.3. Inzulinska rezistencija kao teorija nastanka Parkinsonove bolesti

Jedna teorija nastanka neurodegenerativnih bolesti, uključujući Alzheimerovu bolest i PB, predlaže da je metabolička disfunkcija zajednička poveznica u temelju razvoja ovih bolesti. Neurodegenerativne bolesti dijele niz molekularnih i staničnih patologija, uključujući agregaciju proteina, mitohondrijsku disfunkciju, glutamatnu toksičnost, oksidativni stres i neuroinflamaciju, a kod svake od njih postoje specifični klasteri neurona koji su primarno ranjivi te zbog toga postanu ishodište širenja patološkog procesa. Ti neuroni imaju složena morfološka obilježja poput dalekih projekcija i velikog broja sinapsi, što ih čini selektivno ranjivima zbog povećanih metaboličkih zahtjeva da održe svoju strukturnu složenost (Muddapu

i sur., 2020). Sve više dokaza ukazuje na to da se procesi nalik perifernoj inzulinskoj rezistenciji mogu naći u i mozgu pacijenata koji nemaju dijabetes, a mnoga su istraživanja pokazala da dijabetes melitus tip 2 (DMT2) povećava rizik od kasnijeg razvijanja PB, te da inzulinska rezistencija ili preddijabetes u pacijenata s PB negativno utječe na tijek i težinu bolesti (Li i sur., 2023; Athauda i Foltynie, 2016; Ruiz-Pozo i sur., 2023; Hogg i sur., 2018). Brojne prekliničke studije sugeriraju da bi modulacija inzulinskog signalizacijskog puta i obnavljanje inzulinske osjetljivosti korištenjem antidijabetika potencijalno mogli biti nova meta za modifikaciju PB, i to zbog njihovog utjecaja na taloženje proteina amylin i α -synuklein, koji su zajednički PB i DMT2, obnavljanja PI3K/Akt/NF- κ B signalizacijskog puta ili smanjivanja neuroinflamacije (Athauda i Foltynie, 2016; Sharma i sur., 2021). Streptozotocin (STZ) je spoj glukozamin-nitrozouree prirodnog nastanka identificiran u rodu bakterije *Streptomyces* (Sanfeliu i sur., 2024). STZ ima snažno alkilirajuće djelovanje koje remeti transport glukoze i inducira višestruke prekide DNA lanca. Periferna primjena pojedinačne visoke doze STZ-a koristi se za izazivanje dijabetesa tipa 1, što je posljedica izravnog toksičnog djelovanja molekule na beta stanice gušterače, dok se višestruke niske doze STZ-a koriste u svrhu izazivanja DMT2, koje nastaje zbog oštećenja autofosforilacije IR i nastanka inzulinske rezistencije (Grünblatt i sur., 2007). Intracerebroventrikularna primjena niskih doza STZ (STZ-icv) izaziva inzulinsko rezistentno stanje mozga, ali bez izazivanja sistemskog dijabetičkog stanja kod odraslih štakora (Lester-Coll i sur., 2006; Grünblatt i sur., 2007) i danas se često koristi kao reprezentativni netransgenični model sporadične Alzheimerove bolesti (sAB).

2. HIPOTEZA, OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Hipoteza ovog istraživanja temelji se na pretpostavci da je inzulinska rezistencija temeljni zajednički uzrok neurodegenerativnih poremećaja i da metabolička disfunkcija uzrokovana izravnom primjenom dijabetogenog supstance (streptozotocina) u područje mozga zahvaćeno PB-om (corpus striatum) može izazvati simptome karakteristične za Parkinsonovu bolest, uključujući motoričke simptome i nemotoričke bihevioralne deficite.

Opći cilj rada je ispitati valjanost intrastrijatalne primjene streptozotocina u štakora kao modela Parkinsonove bolesti.

Specifični ciljevi rada su:

1. Ispitati može li intrastrijatalna primjena streptozotocina uzrokovati motoričke i kognitivno-bihevioralne promjene (deficiti učenja i pamćenja, anksioznost) kod štakora koje po simptomima odgovaraju Parkinsonovoj bolesti.
2. Analizirati učinak intrastrijatalne primjene streptozotocina na promjenu razine specifičnih proteina (tirozin hidroksilaze, inzulinskog receptora, dopaminskog receptora, kolin acetiltransferaze i AMPA receptora) i na metaboličke promjene u mozgu, primarno na metabolizam glukoze.
3. Usporediti promjene u strijatumu i hipokampusu nakon intrastrijatalne primjene različitih doza streptozotocina.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Životinje

U pokusima su korišteni muški Wistar štakori stari 3 mjeseca držani su u kavezima (2-3 štakora po kavezu) s ciklusom 12 sati svjetlosti/12 sati tame, a sobna temperatura i vlažnost bili su postavljeni su u rasponu od 21-23°C, odnosno 40-70%, u licenciranoj nastambi za životinje na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (HR-POK-007 Šalata 11, Zagreb).

3.2. Etika

Sva in vivo istraživanja strogo su slijedila nacionalne i međunarodne zakone i propise. Svi su provedeni postupci odobreni od strane Ministarstva poljoprivrede (klasa: UP/I-322-01/22-01/39, ur. broj: 525-09/589-23-4 od 19. siječnja 2023. godine i klasa UP/I-322-01/18-01/57 ur. broj: 525-10/0255-18-5 od 22. listopada 2018. godine) te Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Sa životinjama su rukovale osobe osposobljene za rad sa životinjama.

3.3. Dizajn eksperimenta

Provedena su dva pokusa. U prvom pokusu, u općoj anesteziji (70 mg/kg ketamina, 7 mg/kg ksilazina) štakorima (8 životinja po skupini) je dan STZ bilateralno u strijatum (1,5 mg/kg po hemisferi, otopljen u 0,05 M citratnom puferu, pH 4,5, bilateralno 2 µL/strijatumu: AP-0 mm/ML-3 mm/DV-8,5 mm, podijeljeno u dvije doze primijenjene 1. i 3. dan; Sbi-1.5) ili samo vehikul (CTR) (8 životinja po skupini). U 2. pokusu štakorima (10 životinja po skupini) je na isti način dan STZ jednostrano (STZ/lijevo i vehikul/desno; Suni-0,75) i bilateralno (Sbi-0,75; 0,75 mg/kg po strijatumu) ili samo vehikul (CTR).

3.4. Bihevioralno-motorička procjena

Tijekom dva tjedna koja su prethodila žrtvovanju, životinjama su ispitivane kognitivne, bihevioralne i motoričke funkcije testovima: Rota Rod (RR), test prepoznavanja novog objekta (PNO), test pasivnog izbjegavanja (PI), Morrisov vodeni labirint (MVL), uzdignuti plus labirint (UPL) i CatWalk (CW). Svi bihevioralni testovi provedeni su u tihom laboratorijskom okruženju tijekom dana (7-13 h).

Test Rota Rod (RR). Životinje su trenirane za održavanje ravnoteže na uređaju s rotirajućom šipkom sa šipkom promjera 8 cm koja se okreće frekvencijom od 10 okretaja u minuti. Vrijeme

prekida postavljeno je na 180 s. Napravljena su dva pokusa po seriji mjerenja i za svaku životinju je izračunata srednja vrijednost.

Test hoda CatWalk (CW). Analiza hoda provedena je pomoću automatiziranog sustava koji se koristi za procjenu hoda štakora koji se svojevoljno kreću (GaitLab, ViewPoint, Lyon, Francuska). Štakori su trenirani 5 dana da prijeđu stazu od prozirnog stakla dugu 125 cm sa zelenim LED svjetlom usmjerenim u strane staklene staze. Na dan testiranja zabilježena su najmanje tri uspješna prijelaza po životinji. Prijelaz se smatrao uspješnim ako je štakor ravnomjerno prošao srednjih 80 cm staze bez zaustavljanja ili okretanja. Softver GaitLab korišten je za analizu brzine i različitih dinamičkih (vrijeme stava, vrijeme zamaha) i statičkih parametara hoda (duljina koraka) za svaku pojedinačnu šapu.

Test plivanja u Morrisovom vodenom labirintu (MVL). Test u MVL-u sastojao se od trodnevne vježbe za učenje i vježbu pamćenja, te ispitivanja 4. dana, izvedenog mjesec dana nakon primjene STZ-icv, u okruglom bazenu promjera 180 cm, dubine 60 cm, s podešenom temperaturom vode na $25\pm 1^\circ\text{C}$. Na dane 1-3, štakori su trenirani da pobjegnu iz vode pronalaženjem skrivene platforme (promjera 15 cm) uronjene oko 2 cm ispod površine vode kako ne bi bila očito vidljiva i postavljene u sjeverozapadni kvadrant bazena. Ostanak na platformi kako bi se zapamtio njezin položaj bilo je dopušteno 5 s. Svaki dan su obavljena četiri uzastopna pokusa, svaki s različite početne pozicije: jugozapad (JZ), jug (J), istok (I) i sjeveroistok (SI), odvojena 30-minutnim periodom odmora. Zabilježeno je vrijeme potrebno za pronalaženje platforme, te plivanje štakora i kutna brzina, čime se testirale sposobnost učenja i motorike. Izvedeno je ispitivanje koje je testiralo retenciju memorije iz jugoistočnog kvadranta s platformom uklonjenom iz bazena, gdje je zabilježeno vrijeme provedeno u potrazi za platformom unutar sjeverozapadnog kvadranta. Vrijeme prekida bilo je 1 min. Podaci su snimljeni, praćeni i analizirani pomoću softvera za video praćenje EthoVision XT (Noldus Information Technology).

Test uzdignutog plus labirinta (UPL). Ispitivanje se izvodilo u instalaciji od pleksiglasa u obliku plusa podignutoj na visinu od 50 cm, smještenoj u normalno osvijetljenoj prostoriji. Dva nasuprotna kraka su većinom otvorena, ograđena samo malom ogradom od 4 mm, a druga dva kraka su zatvorena, potpuno zaklonjena crnim pleksiglas stijenkama visine 30 cm. Svaki je štakor postavljen na spojnicu otvorenih i zatvorenih krakova labirinta okrenut prema istom otvorenom kraku. Štakori su ostavljeni da se slobodno kreću 5 minuta. Kretanje životinja

snimljeno je kamerom te praćeno i analizirano video softverom EthoVision XT. Smanjenje vremena provedenog u otvorenim kracima uzima se kao anksiozno ponašanje.

Test pasivnog izbjegavanja (PI). Uređaj za pasivno izbjegavanje prolaznog tipa (Ugo Basile, Gemonio, Italija) podijeljen je u 2 odjeljka, svijetli i tamni, odijeljenih kliznim vratima. Vrijeme potrebno da životinja uđe u mračni odjeljak izmjereno je jedan dan nakon što je životinja bila podvrgnuta elektrićnom šoku od 0,5 mA tijekom 2 s. Prvog dana provedeno je privikavanje na novu okolinu – životinje su istraživale oba odjeljka bez ikakvog elektrićnog šoka, a 15 s nakon što su ušle u tamni odjeljak izvađene su iz aparata. Kako bi naućile izbjegavati tamnu komoru, sljedećí su dan životinje bile podvrgnute elektrošoku nakon ulaska u tamni odjeljak. Trećeg dana izmjereno je vrijeme potrebno da životinja uđe u tamni odjeljak, s vremenom prekida od 5 minuta.

Test prepoznavanja novog objekta (PNO). Za test prepoznavanja novog objekta, prvog dana sve su životinje radi adaptacije na novi prostor zajedno smještene u uređaj u kojem će se provoditi test. Sljedećí dan životinje su stavljene u isti prostor u kojem su se na suprotnim stranama nalazila dva identićna nepoznata predmeta, koje su životinje mogle istraživati 5 min. Sat vremena nakon završetka prvog dijela, jedan objekt se zamijenio novim, drugaćijim objektom, koji su životinje mogle istraživati 5 minuta. Svi postupci snimali su se video kamerom. Nakon završetka svih pokusa, interakcija s objektima tijekom treninga (dva identićna objekta) i testa (jedan novi objekt) analizira se i rućno kvantificira videoanalizom (softver za videoanalizu EthoVision XT). Ključni rezultat testa je udio vremena provedenog u istraživanju novog objekta (korigirano za ukupno vrijeme provedeno u istraživanju oba objekta).

3.5. Priprema tkiva

Životinje su žrtvovane u dubokoj anesteziji (tiopental 70 mg/kg; 7 mg/kg diazepam) mjesec i pol dana nakon primjene STZ. Životinje su odmah obezglavljene nakon ćega su mozgovi brzo bili uklonjeni; od ukupno 8 ili 10 po svakoj skupini, 6 mozgova je secirano te su hipokampus (HPC) i strijatum (S) zamrznuti u tekućem dušiku. Ostali su mozgovi (2 ili 4 po skupini) odmah zamrznuti. Uzorci tkiva za analizu Western blot odmrznuti su i homogenizirani s pet jedinica volumena pufera za lizu koji je sadržavao 10 mM HEPES, 1 mM EDTA, 100 mM KCl, 1% Triton X-100, pH 7,5 i koktel inhibitora proteaze i fosfataze (1:100). Homogenati su centrifugirani 10 minuta na 13000 okretaja u minuti na 4°C, a supernatant je zamrznut i

pohranjen na -80°C . Koncentracija proteina je mjerena Lowry testom proteina. Uzorci tkiva za metabolomičku analizu (HPC i S) su odmrznuti i homogenizirani.

3.6. Biokemijska i metabolička analiza

Western blot analiza. Jednake količine ukupnih proteina (35 μg po uzorku) odvojene su elektroforezom na natrijevom dodecil sulfatu-poliakrilamidu (SDS) u gelu koristeći TGX Stain-Free 12% gelove. Nakon elektroforeze, gelovi su vizualizirani korištenjem ChemiDoc Imaging Systema, a učinkovitost prijenosa provjerena je korištenjem iste tehnologije. Ukupni proteini u uzorku korišteni su za normalizaciju i analizu. Nakon vizualizacije, proteini su prebačeni (Trans-Blot Turbo Transfer System, Bio-Rad) na nitrocelulozne membrane (veličine pora 0,2 μm) koje su zatim stavljene u blok 1 h na sobnoj temperaturi u 5% nemasnog mlijeka u puferu za pranje s niskom razinom soli (Low Salt Washing Buffer, LSBW; 10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5 i 0.5% Tween 20). Blokiranje membrane inkubirane su preko noći na 4°C s primarnim protutijelima: tirozin hidroksilaza (TH), inzulinski receptor (IR), dopaminski receptor (D1), kolin acetiltransferaza (ChAT) i AMPA receptor (AMPA); 1:1000. Nakon inkubacije, membrane su isprane tri puta LSBW-om i inkubirane 1 h na sobnoj temperaturi s otopinom odgovarajućeg sekundarnog protutijela (anti-mišji ili anti-zečji IgG, 1:2000) te ponovno isprane 3x LSBW-om. Signal na membranama vizualiziran je pomoću domaćeg (Mruk i Cheng, 2011) kemiluminiscencijskog reagensa ili Super Signal West Atto ako je signal bio preslab. Sve Western blot analize učinjene su korištenjem softvera ImageJ (ImageJ, američki Nacionalni institut za zdravlje, Bethesda, Maryland, SAD). Ukupni sadržaj proteina korišten je kao kontrola postupka, a intenzitet proteina izražen je proporcionalno signalu ukupnih proteina u istom uzorku na odgovarajućem gelu.

Mjerenje α -sinukleina. α -sinuklein u hipokampusu i strijatumu određen je komercijalno dostupnim enzimskim imunotestom (PathScan® Total α -Synuclein Sandwich ELISA Kit, Cell Signalling) strogo prateći protokol proizvođača i analiziran kolorimetrijskom analizom pomoću multimodalnog čitača mikropločica Infinite F200 PRO. Apsorbancija je mjerena na 450 nm, od koje je oduzeta apsorbancija na 590 nm. Rezultati su prezentirani kao očitavanja apsorbancije na 450 nm, oduzete za apsorbanciju na 590 nm.

Neciljana Metabolomika. Metabolomski spektri obrađeni su pomoću MetaboAnalyst 6.0. Odabran je automatski optimiziran tijek rada za centWave odabiranja vršne vrijednosti (min Frakcija:0,8, polaritet:negativan; s uklanjanjem onečišćenja). Podaci su dalje obrađeni

korištenjem filtra varijance – 25% SD za filtriranje i podaci su transformirani (log transformacija; baza 10).

3.7. Statistika

Podaci bihevioralne i biokemijske analize prikazani su kao kutijasti dijagrami (min do max), a razlike između grupa testirane Kruskal-Wallisovom jednosmjernom analizom varijance, te Mann-Whitneyevim U-testom, gdje se $p < 0,05$ smatra statistički značajnim, korištenjem statističkog softvera GraphPad Prism 5. Rezultati MVL testa za ispitivanje učenja (vrijeme za pronalaženje platforme) izraženi su kao srednja vrijednost \pm SD i analizirani dvosmjernom ANOVA-om za ponovljena mjerenja s Bonferronijevom post-hoc korekcijom, pri čemu se $p < 0,05$ smatra statistički značajnim, koristeći statistički softver GraphPad Prism 5. Monotone asocijacije analizirane su izračunavanjem Spearmanovih koeficijenata korelacije ranga (ρ) za parove mjerenih varijabli. Korelacije su prikazane kao toplinske karte vizualizirane u softveru JASP (0.18.2.0). Analiza glavnih komponenti korištena je za multivarijantnu eksplorativnu analizu podataka metabolomike korištenjem softvera MetaboAnalyst 6.0. Toplinska karta hijerarhijskog grupiranja sa 100 najboljih metabolita napravljena je korištenjem softvera MetaboAnalyst 6.0 na normaliziranim podacima, značajkom automatskog skaliranja, euklidskom mjerom udaljenosti i metodom klasteriranja odjela. Rezultati metabolita predstavljeni su kao normalizirani kutijasti dijagrami koncentracije (min do max) s razlikama između grupa testiranih jednosmjernom ANOVA-om, nakon čega je uslijedila post-hoc analiza Tukeyjevim HSD-om pomoću softvera MetaboAnalyst 6.0, gdje se $p < 0,05$ smatralo statistički značajnim.

4. REZULTATI

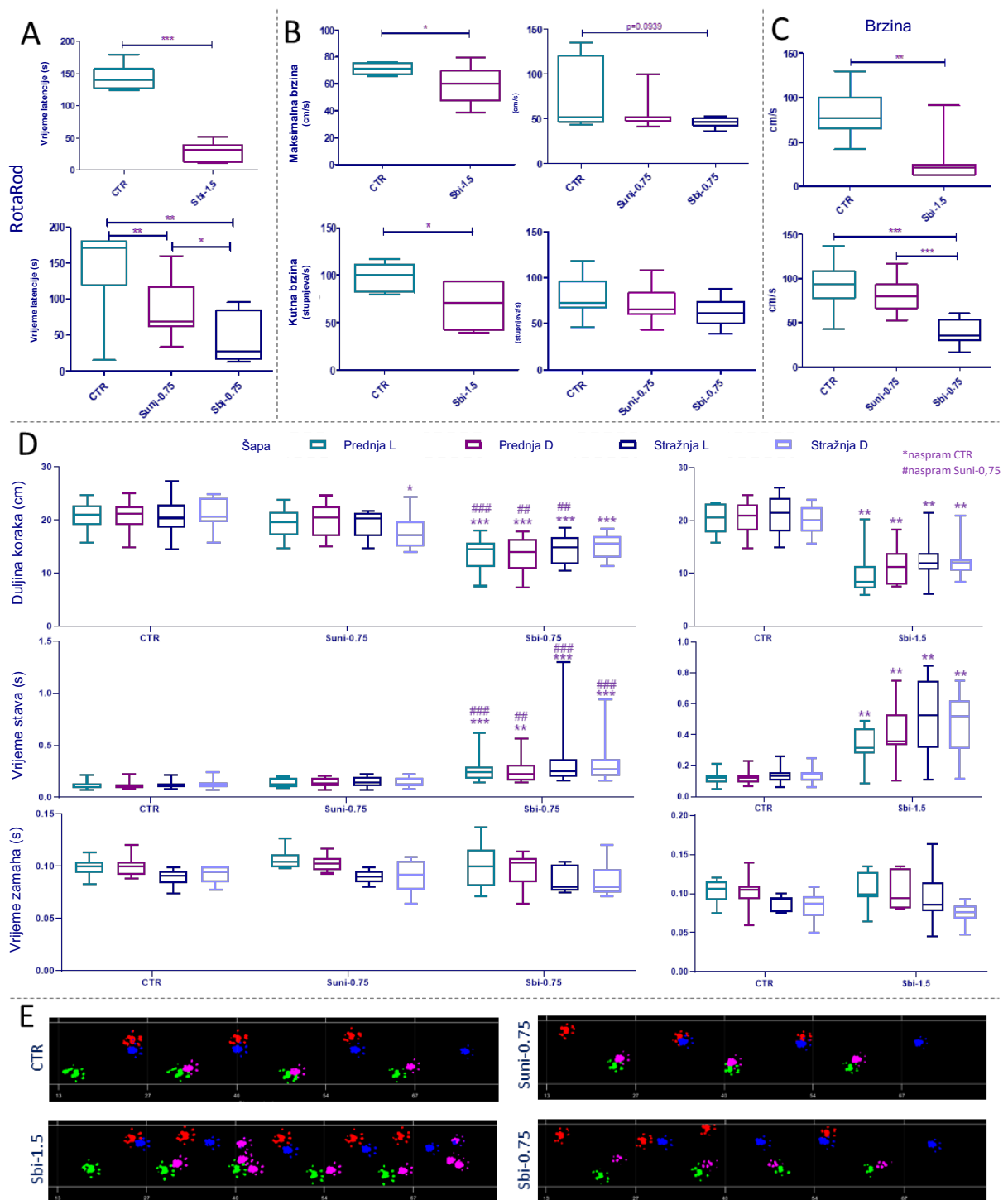
4.1. Rezultati ispitivanja motoričke funkcije

Utvrđeno je da je svaki motorički parametar patološki promijenjen nakon bilateralne primjene veće doze STZ-a (Sbi-1,5) u usporedbi s kontrolama, uključujući: dinamički (vrijeme držanja - razdoblje nošenja težine) i statički parametri hoda (duljina koraka - parametar koji opisuje udaljenost između uzastopnih polaganja iste šape) (slika 1D), brzina cijelog tijela (slika 1C) tijekom prirodnog kasačkog hoda preko uske ravne arene, maksimalna i kutna brzina tijekom plivanja i vrijeme koje životinja ostaje na rotirajućoj šipki (mjera ravnoteže, koordinacije, fizičkog stanja i motoričkog planiranja). Niža doza STZ (Sbi-0,75) izazvala je slične motoričke abnormalnosti bez razlike u kutnoj brzini u usporedbi s kontrolnim životinjama nakon bilateralne intrastrijatalne primjene. Unilateralna primjena STZ-a izazvala je malo motoričkih abnormalnosti, sa statistički značajnim rezultatima vidljivim samo u RR testu (slika 1A). Prema tim rezultatima, bilateralna intrastrijatalna primjena STZ-a kod životinja izaziva motoričke abnormalnosti na način koji je ovisan o dozi.

4.2. Rezultati ispitivanja kognitivno-bihevioralne funkcije

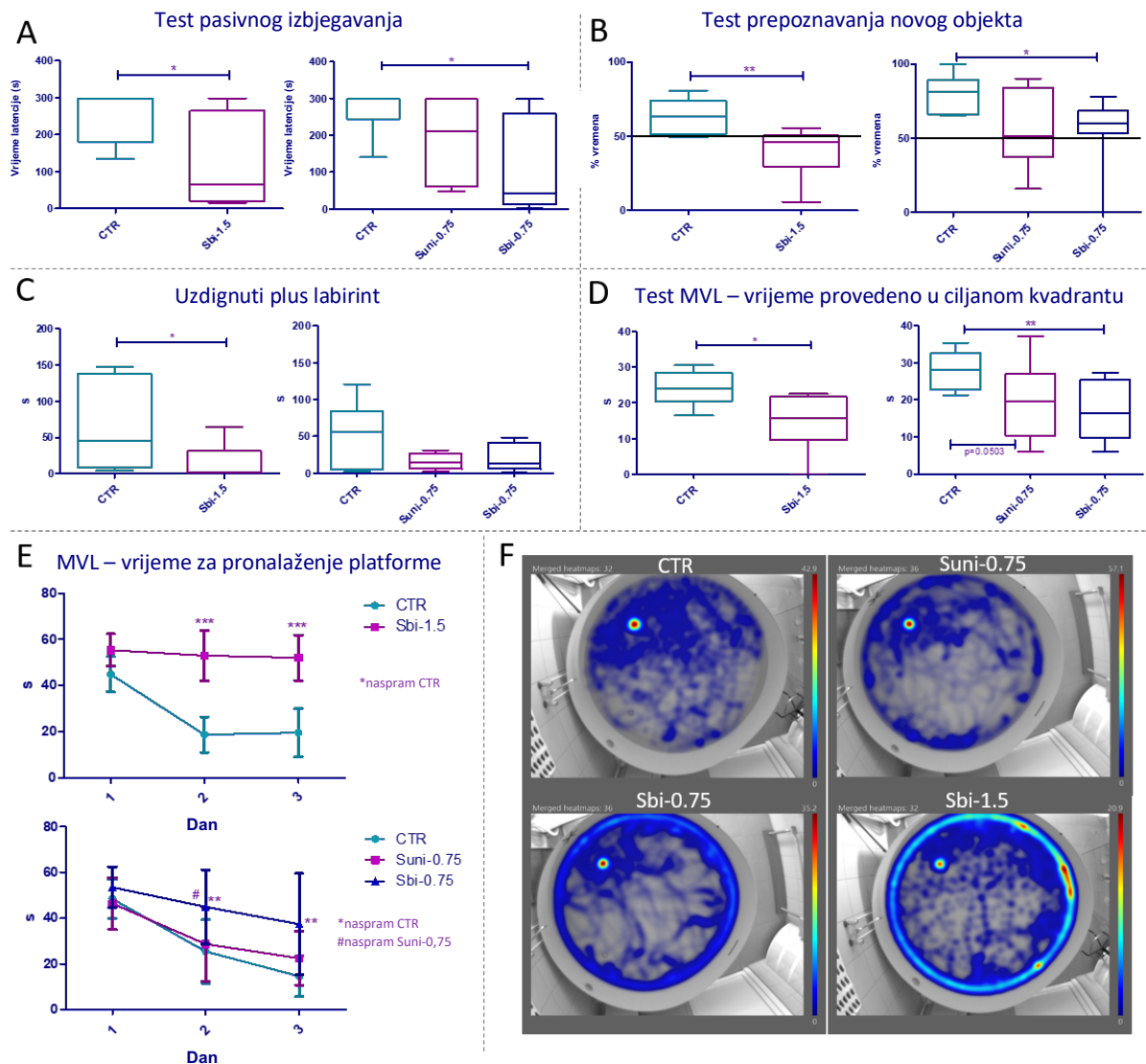
Kod obje grupe kojima je STZ dan bilateralno (Sbi; Sbi-0,75 i Sbi-1,5) inducirani su deficiti u prostornom učenju i pamćenju, strahu uvjetovanom učenju i pamćenju, te učenju i pamćenju prepoznavanja. U MVL testu objema grupama trebalo je više vremena da pronađu platformu tijekom vježbanja učenja (slika 2E i 2F) i proveli su manje vremena u ciljanom kvadrantu tijekom ispitivanja pamćenja (slika 2D) u usporedbi s odgovarajućim kontrolama bez razlike u njihovim srednjim brzinama (slika 3A). U testu PI, obje Sbi grupe provele su manje vremena u osvjetljenom odjeljku u usporedbi s odgovarajućim kontrolama (slika 2A). Deficit u pamćenju prepoznavanja uočen je nakon bilateralne primjene STZ kao manje vremena provedenog u istraživanju novog objekta od poznatog u usporedbi s kontrolama tijekom testa PNO (slika 2B). Uz kognitivni deficit, viša doza STZ-a izazvala je ponašanje slično anksioznosti, opaženo kao manje vremena provedenog u otvorenim kracima tijekom testa UPL u usporedbi s odgovarajućom kontrolom (slika 2C). Dakle, bilateralna intrastrijatalna primjena STZ-a izaziva tjeskobu i poremećaj učenja i pamćenja. Nije bilo razlike u srednjim brzinama između skupina tijekom testa UPL (slika 3B). Iako ne postoji statistički značajna razlika u vremenu provedenom u otvorenim kracima između kontrole i Suni-0,75 ili Sbi-0,75, tendencija je STZ životinja da provode manje vremena u otvorenim kracima naspram kontrole. Unilateralna primjena STZ-a nije izazvala ikakve kognitivne deficite, ali je postojala određena

tendencija provođenja manje vremena u ciljanom kvadrantu tijekom MVL testa (slika 2D) te u vremena u istraživanju novog objekta tijekom testa PNO (slika 2B).

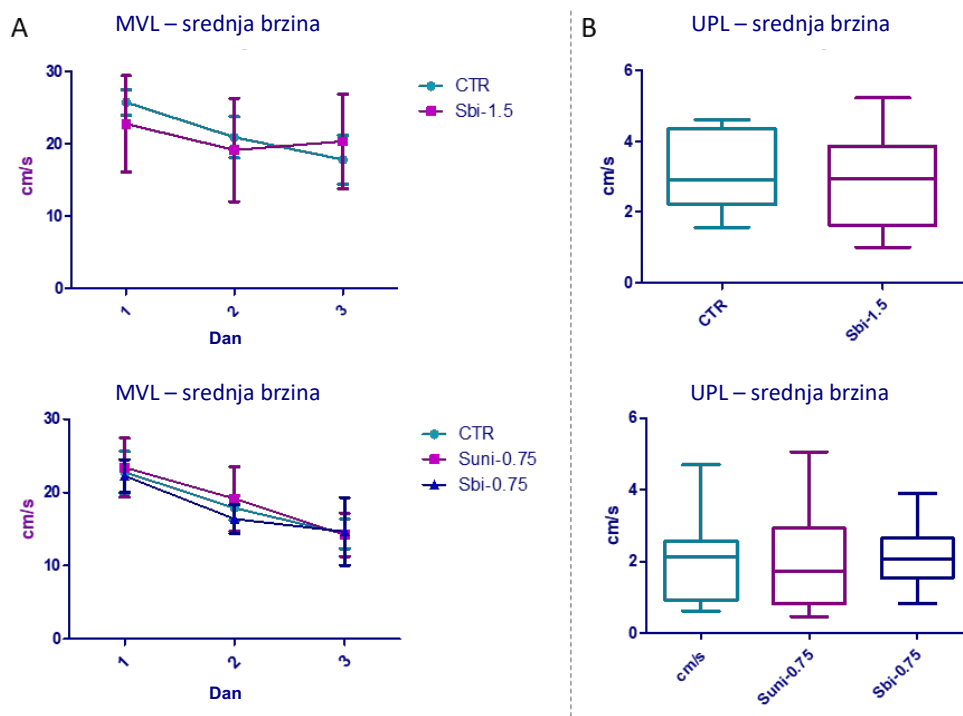


Slika 1. Rezultati motoričkih testova skupina tretiranih STZ-om i kontrolne skupine. (A) Vrijeme provedeno na rotirajućoj šipci tijekom testa Rota Rod (RR). (B) Maksimalna i kutna brzina tijekom 1. dana testa u Morrisovom vodenom labirintu (MVL). (C) Brzina

životinje tijekom testa CatWalk (CW). (D) Duljina koraka, vrijeme držanja i vrijeme zamaha tijekom testa CW. (E) Primjer otisaka šape tijekom testa CW.



Slika 2. Rezultati bihevioralnih testova skupina tretiranih STZ-om i kontrolne skupine. (A) Vrijeme potrebno da životinja uđe u tamni odjeljak tijekom testa pasivnog izbjegavanja (PI). (B) Postotak vremena provedenog istražujući novi objekt u odnosu na ukupno vrijeme provedeno istražujući oba objekta tijekom testa prepoznavanja novog objekta (PNO). (C) Vrijeme provedeno u otvorenim kracima tijekom testa uzdignutog plus labirinta (UPL). (D) Vrijeme provedeno u ciljnom kvadrantu tijekom ispitivanja plivanja u testu Morrisovog vodenog labirinta (MVL). (E) Vrijeme potrebno za pronalaženje platforme tijekom vježbanja učenja u testu MVL. (F) Spojene toplinske karte skupina životinja u testu MVL tijekom 3. dana ispitivanja. Boja piksela predstavlja ukupno vrijeme koje je životinja provela na određenoj lokaciji, gdje je crvena maksimum i plava minimum, a temelji se na lokacijama svih životinja.

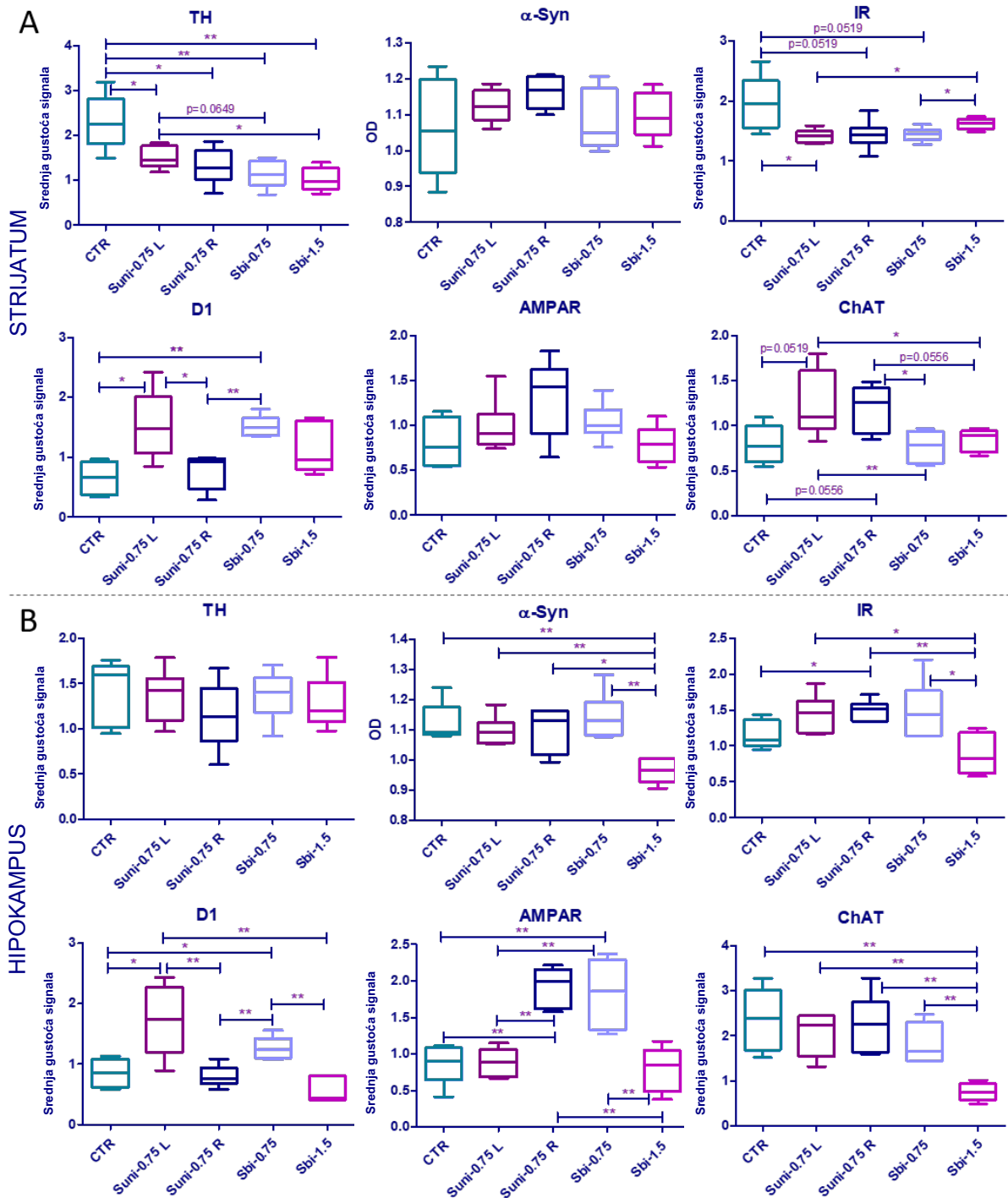


Slika 3. Srednje brzine tijekom testova ponašanja u Morrisovom vodenom labirintu (MVL) i uzdignutom plus labirintu (UPL). (A) Srednja brzina tijekom faze učenja u testu MVL. (B) Srednja brzina tijekom testa UPL.

4.3. Rezultati biokemijske analize

Kod skupina u kojima je primijenjen STZ (bilateralno i unilateralno), izmjerene su smanjene razine TH i IR u strijatumu – lijevi (L) i desni (R) strijatum nakon jednostrane primjene i desni (R) strijatum nakon bilateralne primjene. Smanjena razina TH potvrđuje uništenje dopaminergičkih neurona u strijatumu. Primjena niže doze STZ-a dovela je do povećanja razine D1 receptora u strijatumu (slika 4A). Viša doza STZ-a dovela je do smanjenja ChAT i α -sinukleina u hipokampusu, bez promjene u razinama D1, AMPAR, TH i IR (slika 4B). Kao što je primijećeno i u strijatumu, primjena niže doze STZ-a izazvala je porast razine D1 receptora u hipokampusu. Nadalje, povećanje razine AMPAR-a primijećeno je u kontralateralnom hipokampusu (Suni-0,75 R). Nije došlo do promjena u razinama TH u hipokampusu niti u jednoj STZ skupini u usporedbi s kontrolom (slika 4B). Provedena je Spearmanova korelacija ranga kako bi se analizirale monotone povezanosti parametara rezultata ponašanja i izmjerenih parametara u HPC-u i S-u. Strijatalni TH (ali ne i hipokampalni) pozitivno korelira s vremenom provedenim na rotirajućoj šipki (RR) i duljinom koraka (CW), a negativno s vremenom potrebnim za pronalaženje platforme (MVL), što upućuje na važnost dopaminergičkih neurona strijatuma u regulaciji motorike. Razina ChAT u

HPC-u korelira s tim parametrima na isti način, upućujući na važnost ravnoteže dopamina i acetilkolina u regulaciji motoričkih pokreta. I u HPC-u i u S-u, α -Syn pozitivno korelira s razinama glutamatnog AMPAR-a, upućujući na važnost glutamata u metabolizmu α -Syn.

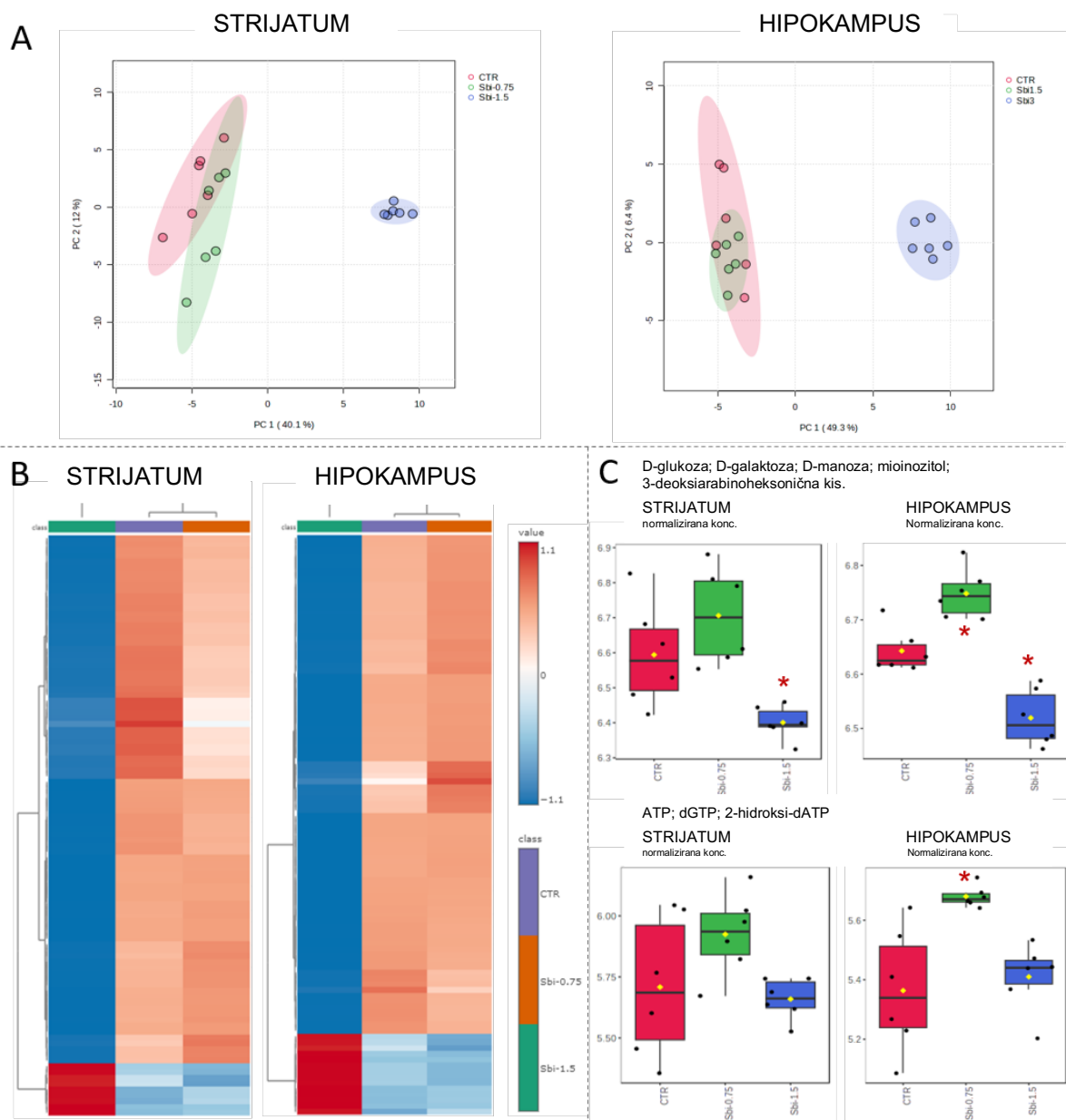


Slika 4. Razine neuronskih markera i analiza α -sinukleina. Razine markera tirozin hidroksilaze (TH), inzulinskog receptora (IR), dopaminskog receptora (D1), kolin acetiltransferaze (ChAT)

i AMPA receptora (AMPA) izmjerene su Western blot analizom u strijatumu (A) i hipokampusu (B). α -sinuklein je mjereno ELISA testom u strijatumu (A) i hipokampusu (B).

4.4. Metabolomika

Analiza glavnih komponenti korištena je za multivarijantno istraživanje zasebno za strijatum i hipokampus (slika 5A). I za HPC i S prva komponenta objašnjava više od 40% varijance s najizraženijim grupiranjem skupine Sbi-1,5 u obje promatrane regije. Analiza toplinske karte 100 najboljih metabolita otkriva uglavnom smanjene koncentracije metabolita u obje regije mozga kod štakora obostrano liječenih višom dozom STZ-a (Sbi-1,5). Vrijednosti Sbi-0,75 uglavnom variraju u usporedbi s kontrolnim životinjama (slika 5B). Prikazane su dvije označene koncentracije metabolita. Utvrđeno je da je koncentracija ATP-a povećana u HPC-u skupine Sbi-0,75, dok nije bilo promjena u S-u. Koncentracija D-glukoze je uočena smanjena u HPC-u i S-u nakon intrastrijatalne primjene veće doze STZ-a (Sbi-1,5) i povećana u HPC-u u skupini Sbi-0,75 (slika 5C).



Slika 5: *Metabolomska analiza.* (A) Analiza glavnih komponenti metabolomičkih podataka u strijatumu i hipokampusu predstavljena kao biplot s koordinatama pojedinačnih životinja u odnosu na 1. i 2. dimenziju (B). Toplinska karta hijerarhijskog klasteriranja sa 100 najboljih metabolita (C). Normalizirane koncentracije naznačenih metabolita u strijatumu i hipokampusu.

5. RASPRAVA

Već dugi niz godina glavna terapija Parkinsonove bolesti je bazirana na povećanju dopamina u mozgu čime dolazi do poboljšanja motoričkog deficita u pacijenata, no takva terapija nema značajni učinak na nemotoričke simptome Parkinsonove bolesti niti dovodi do zaustavljanja progresije bolesti (Li i sur., 2023). Iako je većina životinjskih modela PB-a bazirana na kemijskom ili genetičkom uništenju dopaminergičkih neurona, poticanje razvoja bolesti u glodavaca akutnim davanjem toksina koji ne oponašaju kroničnu, progresivnu staničnu smrt karakterističnu za bolest kod ljudi dovodi do precjenjivanja translacijskih mogućnosti životinjskih modela (Marshall i sur., 2023).

U ovom istraživanju davanje malih doza dijabetogene supstance u strijatum dovelo je do progresivnog širenja metaboličkih promjena u hipokampusu (slika 5). Te metaboličke promjene dovele su do nastanka kako motoričkih (slika 1, slika 3), tako i nemotoričkih simptoma anksioznosti i kognitivnih deficita (slika 2).

Iako je u štakora tretiranih STZ-om intrastrijatalno došlo do propadanja dopaminergičkih neurona u strijatumu, nije došlo do povećanja razina α -Syn u strijatumu (slika 4A). Ovaj je nalaz u skladu s hipotezom da gubitak neurona u substanciji nigri i smanjena TH imunoreaktivnost prethode pojavi lokalnih α -Syn patoloških stanja (Calabresi i sur., 2023). Međutim, ovo je istraživanje pratilo životinje do 1,5 mjesec nakon intrastrijatalne primjene STZ-a, pa postoji mogućnost patološke progresije α -Syn u kasnijim fazama nakon STZ tretmana. Također, utvrđena je značajna korelacija motoričkih i kognitivnih deficita (slika 1, slika 2 i slika 3) s razinama TH u strijatumu i razinama ChAT-a u hipokampusu (slika 4). Velika većina strijatuma sastoji se od trnastih projekcijskih neurona (Spiny projection neurons, SPNs), koji sačinjavaju do 95% svih strijatalnih neurona u glodavaca i približno 75% u primata. Osim SPN-ova, u strijatumu se nalaze GABAergički i kolinergički interneuroni. Limbički sustav se aktivira u različitim fazama motoričkog učenja i može utjecati na stjecanje motoričkih vještina putem izravnih i neizravnih veza sa strijatumom. Hipokampus je vjerojatno uključen u sjećanje na izvedene radnje i prostornu lokaciju pozitivnih stimulansa, a konvergentne informacije iz medijalnog prefrontalnog i prednjeg cingulatnog korteksa, uz informacije koje dopaminergični neuroni pars compacta supstancije nigre šalju u dorzomedijalni strijatum, omogućuju učenje temeljem ishoda radnji (Cataldi i sur., 2022). Sve se više priznaje da su moždane funkcije strogo regulirane integritetom višestrukih međuovisnih neuronskih krugova, a neurodegenerativni poremećaji različite etiologije vjerojatno su rezultat zamršenog

međudjelovanja više sustavnih degeneracija koje nadilaze gubitak nigrostrijatalnih dopaminergičkih neurona u PB-u ili kolinergičku denervaciju Alzheimerove bolesti (AB) (Amalric i sur., 2021). Stoga, u ovom potencijalnom novom modelu PB-a postoje 2 karakteristična obilježja neurodegenerativnih bolesti kao što su AB i PB (kolinergički deficit u hipokampusu i dopaminergički u strijatumu, slika 4) koji potvrđuju međusobnu povezanost te dvije regije, kliničke manifestacije bolesti i kolinergičko-dopaminergičkog reciprociteta .

Razine ChAT-a u hipokampusu i strijatumu pozitivno koreliraju s IR-om u hipokampusu. Stouffer i sur. pokazali su u svojim istraživanjima povezanost inzulina, dopaminergičke i kolinergičke neurotransmisije. Primarni efekt inzulina je pospješeno otpuštanje dopamina, usprkos istovremenog povećanja ponovne pohrane inzulina. Ova dinamična regulacija dopaminskog otpuštanja uključuje o inzulinu ovisno povećanje ekscitabilnosti strijatalnih kolinergičkih interneurona, što uzrokuje povećano otpuštanje dopamina aktivacijom nikotinskog acetilkolinskog receptora, posredovano IR-om (Stouffer i sur., 2015). Vezano uz to, intranazalni inzulin testiran je kao terapijska strategija ne samo u temeljnom i kliničkim AB-u, već i u studijama PB-a i može pružiti klinički relevantno funkcionalno poboljšanje, iako su opsežnija istraživanja potrebna kako bi se potvrdio utjecaj intranazalnog inzulina na kognitivne i motoričke simptome PB-a (Novak i sur., 2019). U istraživanju Patel i sur., intranazalni inzulin je poboljšao motivaciju za kretanjem u štakorskom modelu starenja i povezan je sa smanjenim odumiranjem dopaminergičkih neurona, kao i poboljšanom funkcijom dopamina i motoričkim performansama u 6-OHDA modelu PB-a (Patel i sur., 2023).

Mozak je odavno označen kao organ neosjetljiv na inzulin čije je korištenje glukoze posredovano mehanizmima neovisnima o inzulinu. Od tada, ogromna količina istraživanja pokazala je da je mozak zapravo osjetljiv na inzulin, makar je njegova sposobnosti unosa glukoze većinskim dijelom neovisna o inzulinu. Bolesti povezane s poremećenom inzulinskom signalizacijom, koje zajednički zovemo inzulinskom rezistencijom, pretežno su povezane s promijenjenom metaboličkom funkcijom i primarno su metabolički poremećaji, kod kojih su i metabolizam i mitohondrijske funkcije mozga poremećene (Milstein i Ferris, 2021). U mozgovima pacijenata s PB-om primijećene su široko rasprostranjene abnormalnosti metabolizma glukoze. Smanjen ili povećan metabolizam glukoze uvelike ovisi o tipu i stadiju PB-a, te regiji mozga. Bolesnici u ranom stadiju bolesti imaju hipermetabolizam glukoze bilateralno u palidumu i SN-u, unilateralno u kaudatusu, a hipometabolizam u korteksu (Dai i sur., 2023). U bolesnika s uznapredovalom bolešću, smanjenje unosa glukoze izmjereno je u parijetalnom, frontalnom i temporalnom korteksu, kao i u kaudatusu, bez obzira na prekid

uzimanja lijekova ili liječenja levodopom. Veći hipermetabolizam glukoze praćen je smanjenim unosom dopamina u ventralnom strijatumu kod akinetičko-rigidnih pacijenata (Dai i sur., 2023).

Uzorak povezan s PB-om dosljedno je karakteriziran relativno povećanim metabolizmom u globusu palidusu i putamenu, talamusu, cerebelumu, ponsu i senzomotoričkom korteksu, te relativnim smanjenjem metabolizma u lateralnim frontalnim i parijetookcipitalnim regijama (Meles i sur., 2017). Za razliku od drugih modela PB-a induciranih toksinom, poput 6-OHDA štakorskog i mišjeg modela, gdje je dosljedno zabilježen smanjeni cerebralni metabolizam glukoze (Ni, 2023), bilateralna injekcija veće doze STZ-a (Sbi-1,5) smanjila je količinu glukoze (slika 5C), potvrđujući negativan efekt STZ-a na metabolizam u stanicama mozga. Nadalje, Crabbé i sur. pokazali su dinamički obrazac metaboličkih promjena unosa fluorodeoksiglukoze (FDG) povezanih s PB-om u štakorskom modelu α -sinukleina na bazi rekombinantnih adeno-povezanih virusnih vektora serotipa 2/7 (rAAV); hipermetabolizam glukoze pokriva veliko bilateralno područje koje seže od inzularnog, motoričkog i somatosenzornog korteksa do strijatuma u 2. tjednu, dok je hipometabolizam primijećen u ipsilateralnom strijatumu u 6. Tjednu (Crabbé i sur., 2019). Da su životinje praćene duži vremenski period nakon primjene STZ-a, postoji mogućnost da bi došlo do nastanka hipometabolizma s napredovanjem bolesti. Osvrt na rezultate metabolomičke analize našeg pokusa potvrđuje abnormalnosti metabolizma u mozgu životinja: razine metabolita uglavnom su smanjene razine nakon primjene veće doze STZ-a (Sbi-1,5), dok su razine nekih metabolita povećane nakon niže doze (Sbi-0,75), poput razine ATP-a i glukoze.

Poznato je da kardinalni simptomi PB-a postaju klinički očiti tek nakon što je značajna populacija dopaminergičkih neurona uništena, uglavnom oko 50-60%, i strijatalna koncentracija dopamina padne ispod 70% (Blesa i sur., 2017). Biokemijski nalaz kod STZ skupina, gdje je signal TH bio vrlo slab, potvrđuje naše prethodne rezultate, te zaključujemo da je došlo do uništenja dopaminergičkih neurona strijatuma proporcionalno s dozom STZ-a (slika 4A). Nadalje, PB ima dugo razdoblje prije razvoja simptoma i motoričke evolucije tijekom kojeg se aktiviraju kompenzatorni mehanizmi koji usporavaju kliničku prezentaciju onesposobljavajućih manifestacija. Klasični kompenzatorni mehanizmi uključuju promjene i prilagodbe u nigrostrijatalnom sustavu, poput povećane neuronske aktivnosti u pars compacta substancije nigre, i pojačane sinteze i otpuštanja dopamina i tirozin hidrosilaze u strijatumu (Blesa i sur., 2017). Prema tome, normalni ili blago narušeni nalazi kognitivno-bihevioralnog testiranja u skupini koja je primila nižu dozu STZ-a (Sun-0,75, slika 1, slika 2, slika 3) ide u

prilog tome da je kod tih životinja došlo do aktivacije kompenzatornih mehanizama kao posljedica primjene niže doze STZ-a. Imajući na umu da ova skupina nije pokazala statistički značajne razlike u testovima kognitivnih funkcija u odnosu na kontrolu, te da je pokazala značajno manje deficite u motoričkim testovima od obje skupine bilateralne primjene STZ-a, može se zaključiti da je u ovoj skupini nastupilo stanje najsličnije ranoj Parkinsonovoj bolesti, prije manifestacije ključnih simptoma. Stoga, čini se da su bilateralne lezije potrebne za stvaranje simptoma koji odgovaraju klasičnom PB-u.

Inzulinska rezistencija smatra se temeljnom vezom između dijabetesa i Parkinsonove bolesti. Čak do 58,4% pacijenata s PB-om ima inzulinsku rezistenciju, što se povezuje s težim fenotipom, bržom progresijom i većim rizikom od demencije povezane s PB-om. Dijabetičari s Parkinsonovom bolešću većinom imaju teže motoričke simptome, slabije reagiraju na dopaminergičku terapiju i imaju teže kognitivno oštećenje (Dai i sur., 2023). Trenutačni dokazi o kognitivnoj disfunkciji i pretilosti podupiru hipotezu da se moždani hipermetabolizam i moždana inzulinska rezistencija pojavljuju u odabranim visokorizičnim stanjima kao prolazni fenomen, koji kasnije evoluira prema normalnim ili niskim vrijednostima tijekom života ili progresije bolesti. Moguće je da se moždani hipermetabolizam pojavi kao rana značajka bolesti, javivši se tijekom ranog ili srednjeg života razdoblja i nestavši sa starenjem, uznapređovalom bolešću ili nakon dugotrajne izloženosti prehrani s visokim udjelom masti. Ovaj zaključak potvrđuje studija na pacijentima s različitim stupnjevima kognitivnog oštećenja koja je pokazala da je cerebralni metabolizam glukoze bio visok u ispitanika s blagom bolešću, a nizak u uznapređaloj fazi bolesti, u usporedbi sa zdravom kontrolom (Iozzo i Guzzardi, 2019).

Naši rezultati pokazuju da ovaj model, osim motoričkog deficita, pokazuje i nemotoričke simptome Parkinsonove bolesti koji ovise o dozi primjene dijabetogene supstance. Ovim bi se novim modelom Parkinsonove bolesti moglo omogućiti dulje praćenje napredovanja bolesti, kao i otkriće novih biomarkera te razvoj novih lijekova.

6. ZAKLJUČCI

1. Bilateralna intrastrijatalna primjena streptozotocina uzrokuje motoričke deficite na način koji je ovisan o dozi.
2. Unilateralna primjena STZ nije dovela do motoričkih ili značajnih kognitivno-bihevioralnih deficita.
3. Bilateralna intrastrijatalna primjena STZ uzrokuje anksiozno ponašanje i deficite u učenju i pamćenju.
4. Strijatalne i hipokampalne promjene u količini TH i IR koreliraju obrnuto proporcionalno s dozom STZ-a.
5. Intrastrijatalna primjena dijabetogene supstance dobro oponaša širok spektar simptoma Parkinsonove bolesti.
6. Ovaj model može se dalje koristiti u svrhu ispitivanja novih terapijskih opcija za PB.

7. SAŽETAK

Modeliranje Parkinsonove bolesti intrastriatalnom primjenom diabetogene supstance

Autor: Vito Papić

Jedan od mogućih uzroka nastanka neurodegenerativnih bolesti mogli bi biti metabolički poremećaji u mozgu. Prijašnja istraživanja dokazala su da periferna primjena streptozotocina uzrokuje dijabetes kod životinja, dok intracerebroventrikularna primjena inducira inzulinsku rezistenciju u mozgu. Cilj ovog rada je ispitati može li metabolička disfunkcija uzrokovana primjenom streptozotocina u područje mozga zahvaćeno kod pacijenata koji boluju od Parkinsonove bolesti, corpus striatum, izazvati simptome karakteristične za Parkinsonovu bolest. Odraslim mužjacima Wistar štakora davan je streptozotocin, unilateralno ili bilateralno u dvije doze. Na životinjama su provedeni testovi kognitivnih, bihevioralnih i motoričkih funkcija. Analiza metabolita i proteina učinjena je neciljanom metabolomikom, ELISA-om i Western blotom.

Štakori kojima je bilateralno davan streptozotocin pokazali su motoričke deficite, nedostatak prostornog učenja i pamćenja, otežano pamćenje uvjetovano strahom te ponašanje nalik anksioznosti. Time je po prvi puta potvrđen nastanak karakterističnih simptoma Parkinsonove bolesti nakon bilateralne intrastrijatalne primjene streptozotocina. Daljnja karakterizacija modela pomoći će u razumijevanju mogućeg temeljnog mehanizma ove bolesti i iskoristiti novi životinjski model ove bolesti za testiranje novih lijekova.

Ključne riječi: Parkinsonova bolest, streptozotocin, dopamin, strijatum, inzulinska rezistencija

8. CONCLUSION

Modeling Parkinson's disease by intrastriatal administration of a diabetogenic substance

Author: Vito Papić

Metabolic dysfunction in the brain could be a possible cause for the development of neurodegenerative diseases. Previous research has shown that peripheral administration of streptozotocin causes diabetes in animals, while intracerebroventricular administration induces insulin resistance in the brain. The aim of this paper is to examine whether metabolic dysfunction caused by the administration of streptozotocin in the affected area of the brain in patients suffering from Parkinson's disease, the corpus striatum, can cause symptoms characteristic of Parkinson's disease. Adult male Wistar rats were administered streptozotocin unilaterally or bilaterally in two doses. Cognitive, behavioral and motor function tests were performed on the animals. Metabolite and protein analysis was done by untargeted metabolomics, ELISA and Western blot.

Rats that were administered streptozotocin bilaterally showed motor deficits, lack of spatial learning and memory, impaired fear-conditioned memory, and anxiety-like behavior. This confirmed for the first time the occurrence of hallmark symptoms of Parkinson's disease after bilateral intrastriatal administration of streptozotocin. Further characterization of the model will help to understand the possible underlying mechanism of this disease and use a new animal model of this disease to test new drugs.

Key words: Parkinson's disease, streptozotocin, dopamine, striatum, insulin resistance

9. POPIS LITERATURE

Amalric M, Pattij T, Sotiropoulos I, Silva JM, Sousa N, Ztaou S, Chiamulera C, Wahlberg LU, Emerich DF, Paolone G. Where Dopaminergic and Cholinergic Systems Interact: A Gateway for Tuning Neurodegenerative Disorders. *Front Behav Neurosci.* 2021;15:661973. doi:10.3389/fnbeh.2021.661973

Athauda D, Foltynie T. Insulin resistance and Parkinson's disease: A new target for disease modification?. *Prog Neurobiol.* 2016;145-146:98-120. doi:10.1016/j.pneurobio.2016.10.001

Blesa J, Trigo-Damas I, Dileone M, Del Rey NL, Hernandez LF, Obeso JA. Compensatory mechanisms in Parkinson's disease: Circuits adaptations and role in disease modification. *Exp Neurol.* 2017;298(Pt B):148-161. doi:10.1016/j.expneurol.2017.10.002

Calabresi P, Mechelli A, Natale G, Volpicelli-Daley L, Di Lazzaro G, Ghiglieri V. Alpha-synuclein in Parkinson's disease and other synucleinopathies: from overt neurodegeneration back to early synaptic dysfunction. *Cell Death Dis.* 2023;14(3):176. doi:10.1038/s41419-023-05672-9

Cataldi S, Stanley AT, Miniaci MC, Sulzer D. Interpreting the role of the striatum during multiple phases of motor learning. *FEBS J.* 2022;289(8):2263-2281. doi:10.1111/febs.15908

Crabbé M, Van der Perren A, Kounelis S, Lavreys T, Bormans G, Baekelandt V, Casteels C, Van Laere K. Temporal changes in neuroinflammation and brain glucose metabolism in a rat model of viral vector-induced α -synucleinopathy. *Exp Neurol.* 2019;320:112964. doi:10.1016/j.expneurol.2019.112964

Dai C, Tan C, Zhao L, Liang Y, Liu G, Liu H, Zhong Y, Liu Z, Mo L, Liu X, Chen L. Glucose metabolism impairment in Parkinson's disease. *Brain Res Bull.* 2023;199:110672. doi:10.1016/j.brainresbull.2023.110672

Dovonou A, Bolduc C, Soto Linan V, Gora C, Peralta Iii MR, Lévesque M. Animal models of Parkinson's disease: bridging the gap between disease hallmarks and research questions. *Transl Neurodegener.* 2023;12(1):36. doi:10.1186/s40035-023-00368-8

Goldman JG, Sieg E. Cognitive Impairment and Dementia in Parkinson Disease. *Clin Geriatr Med.* 2020;36(2):365-377. doi:10.1016/j.cger.2020.01.001

Grünblatt E, Salkovic-Petrisic M, Osmanovic J, Riederer P, Hoyer S. Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates

hyperphosphorylated tau protein. *Journal of Neurochemistry*. 2007;101:757-770. doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04368.x

Hayes MT. Parkinson's Disease and Parkinsonism. *Am J Med*. 2019;132(7):802-807. doi:10.1016/j.amjmed.2019.03.001

Hogg E, Athreya K, Basile C, Tan EE, Kaminski J, Tagliati M. High Prevalence of Undiagnosed Insulin Resistance in Non-Diabetic Subjects with Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis*. 2018;8(2):259-265. doi:10.3233/JPD-181305

Iozzo P, Guzzardi MA. Imaging of brain glucose uptake by PET in obesity and cognitive dysfunction: life-course perspective. *Endocr Connect*. 2019;8(11):R169-R183. doi:10.1530/EC-19-0348

Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2008;79(4):368-376. doi:10.1136/jnnp.2007.131045

Lester-Coll N, Rivera EJ, Soscia SJ, Doiron K, Wands JR, de la Monte SM. Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: relevance to sporadic Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2006;9(1):13-33. doi:10.3233/jad-2006-9102

Li L, Liu S, Zhuang J, Li M, Huang Z, Chen Y, Chen X, Chen C, Lin S, Ye L. Recent research progress on metabolic syndrome and risk of Parkinson's disease. *Reviews in the Neurosciences*. 2023;34(7):719-735. doi.org/10.1515/revneuro-2022-0093

Marshall LJ, Bailey J, Cassotta M, Herrmann K, Pistollato F. Poor Translatability of Biomedical Research Using Animals - A Narrative Review. *Altern Lab Anim*. 2023;51(2):102-135. doi:10.1177/02611929231157756

Meles SK, Teune LK, de Jong BM, Dierckx RA, Leenders KL. Metabolic Imaging in Parkinson Disease. *J Nucl Med*. 2017;58(1):23-28. doi:10.2967/jnumed.116.183152

Milstein JL, Ferris HA. The brain as an insulin-sensitive metabolic organ. *Mol Metab*. 2021;52:101234. doi:10.1016/j.molmet.2021.101234

Mruk DD, Cheng CY. Enhanced chemiluminescence (ECL) for routine immunoblotting: An inexpensive alternative to commercially available kits. *Spermatogenesis*. 2011;1(2):121-122. doi:10.4161/spmg.1.2.16606

Muddapu VR, Dharshini SAP, Chakravarthy VS, Gromiha MM. Neurodegenerative Diseases – Is Metabolic Deficiency the Root Cause? *Frontiers in Neuroscience*. 2020;31:14. doi:10.3389/fnins.2020.00213

Ni R. PET imaging in animal models of Parkinson's disease. *Behav Brain Res*. 2023;438:114174. doi:10.1016/j.bbr.2022.114174

Novak P, Pimentel Maldonado DA, Novak V. Safety and preliminary efficacy of intranasal insulin for cognitive impairment in Parkinson disease and multiple system atrophy: A double-blinded placebo-controlled pilot study. *PLoS One*. 2019;14(4):e0214364. doi:10.1371/journal.pone.0214364

Patel JC, Carr KD, Rice ME. Actions and Consequences of Insulin in the Striatum. *Biomolecules*. 2023;13(3):518. doi:10.3390/biom13030518

Ruiz-Pozo VA, Tamayo-Trujillo R, Cadena-Ullauri S, Frias-Toral E, Guevara-Ramírez P, Paz-Cruz E, Chapela S, Montalván M, Morales-López T, Simancas-Racines D, Zambrano AK. The Molecular Mechanisms of the Relationship between Insulin Resistance and Parkinson's Disease Pathogenesis. *Nutrients*. 2023;15(16):3585. doi:10.3390/nu15163585

Sanfeliu C, Bartra C, Suñol C, Rodríguez-Farré E. New insights in animal models of neurotoxicity-induced neurodegeneration. *Front Neurosci*. 2024;17:1248727. doi:10.3389/fnins.2023.1248727

Sharma T, Kaur D, Grewal AK, Singh TG. Therapies modulating insulin resistance in Parkinson's disease: A cross talk. *Neurosci Lett*. 2021;749:135754.

Stouffer MA, Woods CA, Patel JC, Lee CR, Witkovsky P, Bao L, Machold RP, Jones KT, de Vaca SC, Reith ME, Carr KD, Rice ME. Insulin enhances striatal dopamine release by activating cholinergic interneurons and thereby signals reward. *Nat Commun*. 2015;6:8543.

Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res*. 2001;50(6):537-546.

Wang H, Zhao Y, Schrag A. Development of anxiety in early Parkinson's disease: A clinical and biomarker study. *Eur J Neurol*. 2023;30(9):2661-2668. doi:10.1111/ene.15890