

Sveučilište u Zagrebu

Medicinski fakultet

Kamelija Horvatić

**OPORAVAK INZULINSKE SIGNALIZACIJE I FOSFORILACIJE TAU PROTEINA U
MOZGU ŠTAKORSKOG MODELA ALZHEIMEROVE BOLESTI POSREDOVAN JE
OBOGAĆENIM OKOLIŠEM I FIZIČKOM AKTIVNOŠĆU**

Zagreb, 2020.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za molekularnu neurofarmakologiju na Zavodu za farmakologiju i Hrvatskom institutu za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta u Zagrebu, pod mentorskim vodstvom doc.dr.sc. Jelene Osmanović-Barilar u sklopu znanstvenog projekta „Mozak, eksperimentalni i cerebralni dijabetes i kognitivni i drugi poremećaji“ (šifra projekta 108-1080003-0020, voditelj projekta prof.dr.sc. Melita Šalković-Perišić) i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2019./2020.

POPIS KRATICA

AD:	Alzheimerova bolest (eng. <i>Alzheimer's disease</i>)
sAD:	sporadični oblik Alzheimerove bolesti (eng. <i>sporadic Alzheimer's disease</i>)
fAD:	obiteljski oblik Alzheimerove bolesti (eng. <i>familial Alzheimer's disease</i>)
Aβ:	β -amiloidni protein (eng. <i>β-amyloid protein</i>)
Aβ42	oligomer β -amiloidnog proteina 1-42 (eng. <i>β-amyloid protein oligomer 1-42</i>)
AKT/PKB:	protein kinaza B (eng. <i>protein kinase B</i>)
APP:	amiloidni prekursorski protein (eng. <i>amyloid precursor protein</i>)
CTR:	kontrolna skupina životinja (eng. <i>control</i>)
EH:	obogaćeni okoliš/ uvjeti (eng. <i>enriched housing / enriched environment</i>)
FC:	čeonni režanj (eng. <i>frontal cortex</i>)
GAPDH:	gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza (eng. <i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>)
GFAP:	kiseli vlaknasti protein glije (eng. <i>glial fibrillar acidic protein</i>)
HPC:	hipokampus
IDE:	enzim razgradnje inzulina (eng. <i>insulin degrading enzyme</i>)
IRBS:	inzulinska rezistencija u mozgu (eng. <i>insulin resistant brain state</i>)
IR:	inzulinski receptor (eng. <i>insulin receptor</i>)
MAPK:	mitogenom aktivirana proteinska kinaza (eng. <i>mitogen activated protein kinase</i>)
NFT:	neurofibrilarni snopići (eng. <i>neurofibrillary tangles</i>)
tGSK-3α:	ukupna glikogen sintaza kinaza 3 α (eng. <i>total glycogen synthase kinase 3α</i>)
tGSK-3β:	ukupna glikogen sintaza kinaza 3 α (eng. <i>total glycogen synthase kinase 3α</i>)
tTAU:	ukupan tau protein (eng. <i>total tau protein</i>)

PA:	fizička aktivnost (eng. <i>physical activity</i>)
PI3K:	fosfatidilinozitol 3 kinaza (eng. <i>phosphatidylinositol 3 kinase</i>)
pGSK-3α	fosforilirana glikogen sintaza kinaza 3 β (eng. <i>phosphorylated glycogen synthase kinase 3β</i>)
pGSK-3β:	fosforilirana glikogen sintaza kinaza 3 β (eng. <i>phosphorylated glycogen synthase kinase 3β</i>)
PSEN1:	presenilin 1 (eng. <i>presenilin 1</i>)
PSEN2:	presenilin 2 (eng. <i>presenilin 2</i>)
pTAU:	fosforilirani oblik tau proteina (eng. <i>phosphorylated tau protein</i>)
STZ:	streptozotocin
STZ-icv:	intracerebroventrikularna administracija streptozotocina

SADRŽAJ RADA

1. UVOD	1
1.1. Alzheimerova bolest	1
1.2. Etiopatogeneza Alzheimerove bolesti	1
1.2.1. Oblici Alzheimerove bolesti	1
1.2.2. Hipoteze o nastanku Alzheimerove bolesti	1
1.2.3. Inzulinska signalizacija u sAD	2
1.3. Štakorski model sporadičnog oblika AD	3
1.4. Obogaćen okoliš kao metoda prevencije nastupa AD	4
2. HIPOTEZA	5
3. OPĆI CILJ I SPECIFIČNI CILJEVI	5
4. MATERIJALI I METODE	6
4.1. Materijali	6
4.1.1. Kemikalije	6
4.1.2. Životinje	6
4.2. Metode	6
4.2.1. Izrada eksperimentalnog modela sporadične Alzheimerove bolesti	6
4.2.2. Protokol obogaćenih uvjeta i fizičke aktivnosti	6
4.2.3. Kognitivno testiranje u Morrisovom labirintu	7
4.2.4. Protokol žrtvovanja i uzimanja biološkog materijala	8
4.2.5. Homogeniziranje tkiva	8
4.2.6. Mjerenje koncentracija proteina	8
4.2.7. Western blot analiza	8
4.2.8. Statistička analiza	10
5. REZULTATI	10
5.1. Analiza rezultata Morrisovog vodenog testa navigacije	10
5.2. Western blot analiza promjena inzulinske signalizacije, ekspresije IDE i hiperfosforilacije tau proteina u frontalnom režnju i hipokampusu štakorskog modela sAD	11
5.2.1. Western blot analiza ekspresije inzulinskog receptora u HPC-u i FC-u	11
5.2.2. Western blot analiza fosforilacije i inaktivacije GSK3 β u HPC-u i FC-u	12
5.2.3. Western blot analiza hiperfosforilacije tau proteina u HPC-u i FC-u	13
5.2.4. Western blot analiza ekspresije proteolitičkog enzima IDE u HPC-u i FC-u	14
6. RASPRAVA	16
7. ZAKLJUČCI	18

8. ZAHVALA	19
9. POPIS LITERATURE	20
10. SAŽETAK	24
11. SUMMARY	25

1. UVOD

1.1. Alzheimerova bolest

Alzheimerova bolest (eng. *Alzheimer's disease*; AD) je najčešći oblik demencije karakteriziran ireverzibilnim propadanjem kognitivnih funkcija koji su posljedica atrofije i degeneracije moždanih struktura u pacijenata starije životne dobi (Begić i sur., 2015). S obzirom na sporu progresiju AD, od prvih simptoma do dijagnoze može proći i po par godina. Epidemiološki je demencija prepoznata kao važan entitet s podacima koji upućuju na broj oboljelih preko 50 milijuna u 2019. s prognozom udvostručenja broja do 2030. rezultirajući sa 152 milijuna oboljelih do 2050. Analiza ukazuje da svake tri sekunde netko u svijetu razvije demenciju, naglašavajući time razinu zdravstvenog i socioekonomskog tereta, te ukazujući na potrebu za ekstenzivnijim istraživanjima u pronalasku i determiniranju metode adekvatnog liječenja (World Alzheimer report, 2019).

1.2. Etiopatogeneza Alzheimerove bolesti

1.2.1. Oblici Alzheimerove bolesti

Postoje dva glavna oblika Alzheimerove bolesti – rijetki obiteljski oblik (eng. *familial Alzheimer's disease*; fAD) koji obuhvaća 1-5% i češći sporadični oblik (eng. *sporadic Alzheimer's disease*; sAD) koji obuhvaća 95-99% svih slučajeva (Lista i sur., 2015). S obzirom na to da su genetski putevi razvoja AD lakše shvatljivi, uspješno je definirana nekolicina ključnih mutacija gena odgovornih za patogenezu obiteljskog oblika ove bolesti. Među njima su mutacije za protein amiloidnog prekursora (eng. *amyloid precursor protein*; APP) i gena za presenilin 1 (PSEN1) i presenilin 2 (PSEN2). Zajedničko obilježje svih navedenih mutacija je promjena metabolizma A β i stvaranje njegovog manje topljivog oligomera A β 1-42 (A β 42). S druge strane, patofiziološka pozadina razvoja sAD ima kompleksniji mehanizam nastanka kojemu se pretpostavlja interakcija brojnih rizičnih okolišnih i genetskih čimbenika (Ballard i sur., 2011).

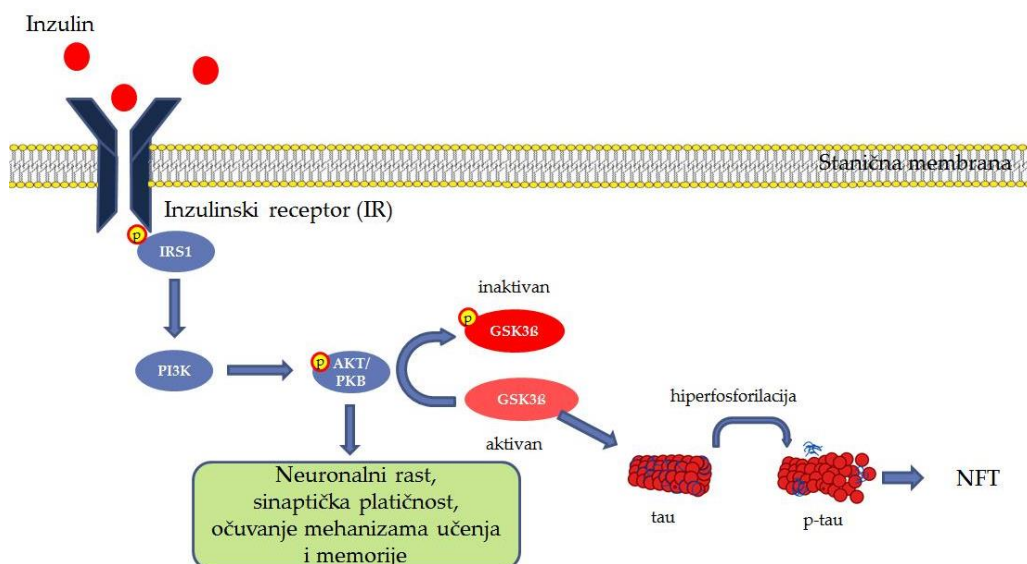
1.2.2. Hipoteze o nastanku sporadične Alzheimerove bolesti

Obzirom da je točan uzrok nastanka AD nepoznat, postoji više hipoteza. Neke od najpoznatijih su amiloidna, tau, kolinergička hipoteza i hipoteza oksidativnog stresa (Hardy i sur., 1992). Dva ključna patohistološka obilježja ove bolesti su pojava beta amiloidnih plakova (eng. *β -amyloid*; A β) i neurofibrilarnih snopića (eng. *neurofibrillary tangles*; NFT) tau proteina u mozgu oboljelih. Amiloidna kaskada predlaže klasični model u kojem su neuronalna insuficijencija i posljedična neuronalna smrt posljedica toksičnog efekta nakupljanja oligomera A β u moždanom parenhimu. (Hardy i sur., 1992). U fiziološkim okolnostima A β nastaje djelovanjem β - i γ -sekretaze iz APP, nakon čega bude razgrađen pri izlasku iz stanice. Prilikom starenja dolazi do slabljenja metabolizma A β , što rezultira nakupljanjem njegovih oligomera A β 42 te posljedičnom formacijom senilnih plakova, neurotoksičnošću i indukcijom patologije tau proteina (Hardy i sur., 1992). Tau protein je topljiv i fiziološki važan u građi mikrotubula neurona, ali fosforilirani oblik (eng. *phosphorylated tau protein*; pTAU) formira netopljive agregate u

obliku NFT koji ometaju normalnu neuronalnu strukturu i funkciju (Price i sur., 2009). Novija istraživanja upućuju da tau protein ima bitniju ulogu u patogenezi AD od A β formirajući temelje za tau hipotezu uzroka AD (Hardy i sur., 2011). Kasnijim pokusima se pokazalo da postoje slučajevi kada unatoč obilnoj formaciji senilnih plakova A β oligomera nema smanjenja kognitivne funkcije. (Kim i sur., 2013) Pritom, primjena ciljane imunoterapije nije utjecala na kognitivni deficit i razine pTAU iako su razine A β bile efektivno smanjene (Ostrowitzki i sur., 2011). Potonje dovodi teoriju amiloidne kaskade i njenu centralnu poziciju u objašnjavanju patofiziologije AD u upitan položaj (Kametani i sur., 2018). Nasuprot tome, novijim istraživanjima raste broj dokaza koji povezuju poremećaj inzulinske rezistencije s razvojem simptoma AD i otvaraju mogućnost razmatranja ove bolesti s druge perspektive (Neumann i sur., 2008, Ahmed i sur., 2014). U prilog inzulinskoj hipotezi idu i epidemiološki podaci koji povezuju oboljele od dijabetesa tipa II s povećanom učestalošću razvoja AD, što je navelo određen broj istraživača da se referiraju na AD kao na dijabetes tip III (de la Monte i sur., 2008).

1.2.3. Inzulinska signalizacija u sAD

IR prisutan u mozgu je blago drukčiji od perifernog i ne regulira se povećanom koncentracijom inzulina. Inzulin vezanjem na IR aktivira dva paralelna puta signalne kaskade – fosfatidilinozitol-3-kinazu (eng. *phosphatidylinositol-3-kinase*; PI3K) (Slika 1.) i mitogenom aktiviranu kinazu (eng. *mitogen activated kinase*; MAPK). Put PI3K aktivira dalje protein kinazu B (eng. *protein kinase B*; pKB) koja fosforilacijom inaktivira alfa i beta podjedinice glikogen sintaze kinaze 3 (eng. *glycogen synthase kinase 3*; GSK3 $\alpha\beta$) (Hooper i sur., 2008, De Meyts, 2016). Navedeni je enzim svojim daljnjim djelovanjem uključen u brojne funkcije stanice, uključujući i određene patofiziološke mehanizme u sAD. GSK3 α je odgovorna za regulaciju produkcije A β i njegovu promociju u ekstracelularni prostor gdje će biti razgrađen pod utjecajem enzima za razgradnju inzulina (eng. *insulin degrading enzyme*; IDE) koji je također pod regulatornim mehanizmom razina inzulina. S druge strane, za regulaciju fosforilacije tau proteina odgovorna je izoforma enzima GSK3 β (Hooper i sur., 2008, Šalković-Petrišić i Hoyer, 2007). Interupcija normalne inzulinske produkcije i signalizacije je također pokazala povezanost s izraženim deficitima u učenju i formaciji pamćenja (Zhao i Alkon, 2001). Inzulinska hipoteza uključuje poremećaj inzulinske signalizacije i metabolizam energije u mozgu u patofiziološku sliku AD, te ukazuje na važnu ulogu inzulina u održavanju homeostaze bitne za preživljenje neurona i posljedičnu neuroplastičnost i uspješno održavanje viših kognitivnih funkcija pojedinca.



Slika 1. Inzulinska signalizacija posredovana putem – fosfatidilinozitol-3-kinaze (PI3K) s utjecajem na regulaciju aktivnosti glikogen sintaze kinaze 3 (GSK3 β) i posljedičnim utjecajem na razinu fosforilacije tau proteina i formacije neurofibrilarnih snopića (NFT) (Ahmad i sur., 2014).

1.3.Štakorski model sporadičnog oblika AD

AD predstavlja veliki izazov za istraživanje zbog osobitosti bolesti, te tehničkih i etičkih nemogućnosti in vivo kliničkih istraživanja na ljudima. Dostupni modeli za proučavanje AD su uglavnom životinjski ili in silico metode u farmakologiji. Određen napredak je ostvaren u istraživanju fAD zbog lakše manipulacije genoma u svrhu formiranja adekvatnog modela za istraživanje karakteristika bolesti. Međutim, takav model pokriva oblik fAD koji je znatno rjeđi i ograničen specifičnim karakteristikama koje se ne mogu primijeniti na sAD oblik. Stoga, daljnji izazov predstavlja formiranje modela koji bi oponašao sporadični oblik, zbog problema pretpostavke uzroka bolesti. Štakorski model intracerebroventrikularno tretiran streptozotocinom (STZ-icv) je omogućio napredak u istraživanjima inzulinske hipoteze nastanka AD jer pokazuje promjene u inzulinskoj signalizaciji slične onima u oboljelih od sAD, što ga ujedno čini prigodnim modelom za proučavanje (Šaković i sur., 2013). Streptozotocin (eng. *streptozotocin*; STZ) je po svom sastavu glukozamin-nitrozourea deriviran iz bakterijskog soja *Streptomyces achromogenes*, te se u klinici koristi za liječenje kao kemoterapeutski agens u tretiranju karcinoma β stanica gušterače. S obzirom na citotoksični efekt alkilacijom DNA u β stanicama, rezultira hipoinzulinemijom i hiperglikemijom na periferiji (Graham i sur., 2011). Prilagodбом parenteralno primijenjene betacitotoksične doze se ostvaruje pojava simptoma dijabetičke bolesti – jednostrukom visokom perifernom dozom (60mg/kg) za indukciju tipa 1, te barem tri niske periferne doze (35mg/kg) za indukciju simptoma dijabetesa tipa 2 (Wu i Yan, 2015). Ukoliko se subdijabetogene doze (1-3mg/kg) primjene intracerebroventrikularno, pokazalo se da induciraju kognitivni deficit i alteracije u moždanom metabolizmu glukoze i energije (Lannert i Hoyer, 1998), oksidativni stres (Saxena i sur., 2011) i neuroinflamaciju (Rai i sur., 2013) stanje inzulinski rezistentnog mozga (eng. *insulin resistant brain state*; IRBS) (Grünblatt i sur., 2007; Barilar i sur., 2015, Šalković i sur., 2013),

neuropatologiju hiperfosforilacije tau proteina, formaciju A β i kolinergičkog deficita, te je sukladno navedenim promjenama primijećeno progresivno oštećenje kognicije u vidu učenja i pamćenja (Knezović i sur., 2015, Barilar i sur., 2015). Potonje ukazuje na adekvatnost STZ-icv tretiranog štakora u prikazu i proučavanju sAD.

1.4. Obogaćen okoliš i fizička aktivnost kao metoda prevencije nastupa AD

Brojne epidemiološke studije potvrdile su hipotezu da fizička aktivnost (Stern i sur., 1994), psihosocijalni kontakt i razina edukacije utječu na usporavanje razvoja demencije (Zhang i sur., 1990; White i sur., 1994). Potvrđeno je da osobe s pojačanom mentalnom aktivnošću razvijaju jače i brojnije neuronalne veze za koje se pretpostavlja da su sposobne izdržati veću količinu patoloških procesa i oštećenja prije podlijevanja propadanju i bolesti (Katzman, 1993). Postulat formiranja okoliša s obogaćenim uvjetima (eng. *enriched environment*; EH) je postavio Donald Hebb sugerirajući njihov utjecaj na sinaptičku plastičnost ovisnu o aktivnosti, čime su uslijedila brojna istraživanja koja su izvještavala o postojanju kemijskih i strukturalnih promjena u mozgu (Rampon i sur., 2000) uz promoviranje neurogeneze (Beauquis i sur., 2010). Riječ je o istraživačkoj metodi gdje se životinjski modeli drže u znatno prostranijim i većim kavezima koji sadrže igračke i kotače za trčanje, što im skupno omogućuje uz aktivnost i učestaliju socijalnu interakciju (van Praag i sur., 2000). Broj studija na transgeničnim životinjskim modelima AD broj koje su bile u mogućnosti istraživati pozitivni efekt obogaćenih uvjeta na bihevioralne i molekularne promjene (Jankowski i sur., 2005; Verret i sur., 2013) je izdašniji u usporedbi s vrlo uskim spektrom provedenih istraživanja na STZ-icv i sličnim modelima za sporadični oblik AD. Prethodno provedenim istraživanjima je dokazano olakšanje simptoma posljedično provedenom izlaganju STZ-icv štakorskih modela sAD psihičkoj aktivnosti (Osmanović i sur., 2009, Kang i Cho, 2014), ali još uvijek nije determiniran egzaktan mehanizam djelovanja na navedeno poboljšanje kognitivnih funkcija testiranih subjekata.

2. HIPOTEZA

Obogaćeni uvjeti i pojačana fizička aktivnost djeluju preventivno na propadanje kognitivnih funkcija učenja i pamćenja djelujući na inzulinsku signalizaciju u mozgu štakorskog modela Alzheimerove bolesti.

3. OPĆI CILJ I SPECIFIČNI CILJEVI

Opći cilj rada:

Opći cilj rada je ispitati učinak obogaćenih uvjeta i fizičke aktivnosti na kognitivne funkcije i njihovu povezanost s biokemijskim promjenama inzulinske signalizacije u mozgu štakorskog modela Alzheimerove bolesti.

Specifični ciljevi rada:

- 1.** Istražiti utječu li obogaćeni uvjeti i fizička aktivnost na prevenciju kognitivnog deficita nakon STZ-icv primjene.
- 2.** Ispitati postoje li promjene u inzulinskoj signalizaciji u vidu ekspresije IR u hipotalamusu i frontalnom korteksu štakorskog modela sAD.
- 3.** Utvrditi utječu li obogaćeni uvjeti i fizička aktivnost na ekspresiju IDE u hipotalamusu i frontalnom korteksu mozga štakorskog modela sAD.
- 4.** Analizirati postoje li promjene aktivnosti GSK3 u hipotalamusu i frontalnom korteksu u štakorskom modelu sAD
- 5.** Ispitati učinak obogaćenih uvjeta i fizičke aktivnosti na razine hiperfosforiliranog tau proteina u hipotalamusu i frontalnom korteksu u STZ-icv štakorskom modelu.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Materijali

4.1.1. Kemikalije

U istraživanju korištena su primarna protutijela IR (Merck Millipore, SAD), IDE (Calbiochem, Njemačka), tGSK3 (Cell-signaling, SAD), pGSK3 β (Cell-signaling, SAD), tTAU (Sigma-Aldrich, SAD), pTAU (Cell Signaling, SAD). Sekundarna protutijela korištena u eksperimentu su s HRP (eng. *horseradish* peroxidase) vezana na IgG miša (anti-Ms) i s HRP vezana na IgG zeca (anti-Rb) (Cell-signaling, SAD). Za dobivanje sAD štakorskog modela je korišten streptozotocin (Sigma-Aldrich, Njemačka).

4.1.2. Životinje

Svi pokusi u ovom istraživanju su provedeni na muškim Wistar štakorima starim 3 mjeseca, tjelesne mase između 300 i 350 g uzgojenim na zavodu za Farmakologiju Medicinskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu (dozvola br. HR-POK-007). Sva *in vivo* istraživanja strogo su slijedila smjernice Zakona o zaštiti životinja (NN 135/06) i Pravilnika o zaštiti životinja koja se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/13). Za obavljanje pokusa na projektu, kojeg je ovaj znanstveni rad dio, dobivena je dozvola Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (04-1343-2006). Sa životinjama su rukovale isključivo osobe službeno osposobljene za rad sa životinjama.

4.2. Metode

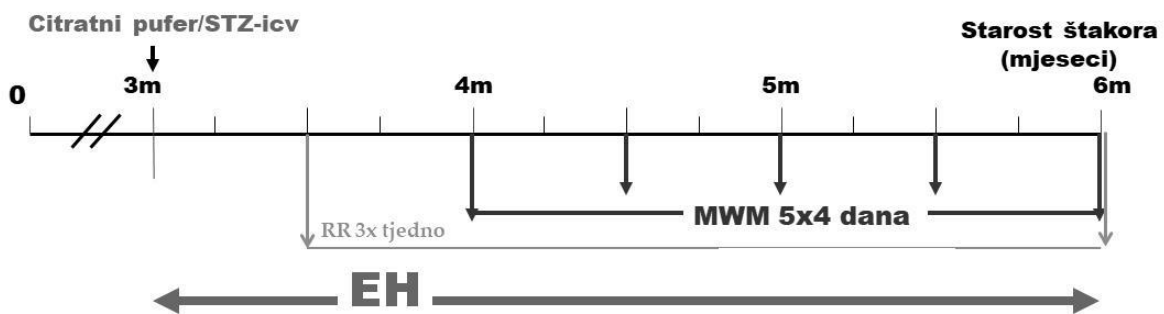
4.2.1. Izrada eksperimentalnog modela sporadične Alzheimerove bolesti

Štakorski model sAD temeljen je na administraciji streptozotocina intracerebroventrikularnim putem (STZ-icv). Nakon anesteziranja ketaminom (60mg/kg) i ksilazinom (5-10 mg/kg), štakori stari 3 mjeseca podliježu kratkom kirurškom zahvatu tijekom prvog i trećeg dana izvođenja eksperimenta. Nakon šišanja dlake na vrhu glave učini se kratki rez slojeva kože i potkožja, kako bi potom preciznom električnom bušilicom (NSK Ultimate XL, Hoffman Estates, SAD) napravio otvor veličine promjera 1 mm u parijetalnoj kosti s lijeve i desne strane, na udaljenosti 1,5-2 mm dijagonalno od križanja sagitalnog i koronarnog šava prema ranije opisanom postupku (Grünblatt i sur., 2007). Sljedeći korak se sastoji od uvođenja tanke mikroinjekcijske igle na dubinu od 4 mm obostrano u lateralne moždane komore. Potom se polagano u lijevu i desnu komoru daje po 2 μ L STZ prethodno otopljen u 0,05M citratnom puferu (pH 4,5) u dozi od 3 mg/kg, dok se kontrolnim životinjama administrira samo citratni pufer.

4.2.2. Protokol obogaćenih uvjeta i fizičke aktivnosti

Obogaćeni uvjeti podrazumijevali su veliki kavez za zečeve površine 0.46 m² i visine 25.5 cm podijeljen na dva kata. Na donjem katu se nalazio tunel u koji su se štakori mogli sakriti, kotač za trčanje, zvonce, a male ljestve su vodile na gornji kat na kojem su im bile stavljene dvije lego igračke. Svaki tjedan isti dan (srijeda) kroz 3 mj stavljanje su im nove igračke (lopte hopsice, lego autiće, lego građevine poput piramide, jaja raznih boja i tekstura, lego lutke). U tako obogaćenim kavezima nalazilo se po 6 životinja (6 kontrolnih

u jednom kavezu i 6 STZ-icv tretiranih u drugom kavezu) radi dodatne socijalne interakcije. U standardnim manjim kavezima nalazilo se po 3 životinje iz svake grupe kojima se nisu davale igračke niti su bili podvrgnuti pojačanoj fizičkoj aktivnosti. Obje skupine štakora koje su bile držane u obogaćenim uvjetima (kontrola i STZ-icv tretirani štakori) dodatno su bile podvrgnute pojačanoj fizičkoj aktivnosti na Rota-rod sustavu. Svaki tjedan kroz tri dana laboratorijski su se štakori stavljali na rota-rod po 3 minute tri puta na dan. Na Rota-rodu štakori su se morali kretati dok se je rotirajući valjak okretao stalnom brzinom motivirajući štakore da hodaju. U slučaju pada štakor bi bio ponovno vraćen na Rota-rod do završetka trajanja.



Slika 2. Protokol eksperimenta izlaganja obogaćenim uvjetima i fizičkoj aktivnosti. Tri mjeseca starim Wistar štakorima (N=24) je prvog i trećeg dana eksperimenta injiciran STZ-icv odnosno citratni pufer. Odmah potom se svaka skupina (CTRL i STZ; N=12) podijeli na dvije podskupine (N=6). Po jedna od svake skupine (CTRL-EH i STZ-EH) se izlaže EH i fizičkoj i mentalnoj aktivnosti u vidu Rota-roda 3 puta tjedno počevši od drugog tjedna eksperimenta (RR) i testiranja u Morrisovom labirintu (MWM) počevši od četvrtog tjedna eksperimenta svakih 2 tjedna u trajanju od 4 dana.

4.2.3. Kognitivno testiranje u Morrisovom labirintu

Morrisov labirint (*Morris Water Maze Swimming Test* -MWM) pruža informacije o prostornoj memoriji. Eksperiment se izvodi u bazenu veličine 150x60 cm i dubokom 50 cm napunjenom vodovodnom vodom temperature $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Životinje se 2 dana prilagođavaju plivanju u bazenu. Nakon toga životinje se četiri dana uvježbavaju pronaći čvrsti oslonac u bazenu, prozirno postolje uronjeno 2 cm ispod površine vode. Po dolasku na postolje, životinji se dozvoljava boravak na njemu u trajanju od 15 sekundi, nakon toga se životinja vraća u kavez. Ukoliko životinja ne uspije pronaći postolje, plivanje se prekida nakon 1 minute, ispitivač postavlja životinju na postolje, ostavlja je tamo 15 sekundi kako bi životinja zapamtila lokaciju postolja, te je vraća u kavez. Štakori se puštaju iz svakog odjeljka, osim iz odjeljka u kojem je postolje, te se mjeri vrijeme potrebno za pronalazak postolja za bijeg, tijekom uzastopna 4 dana i broj ulazaka (grešaka) u odjeljke bez postolja. Pokus se ponavlja tri puta u danu s razmakom od 30 minuta. Također će se peti dan testiranja, kada se postolje miče, mjeriti broj pogrešaka i vrijeme utrošeno u potrazi za uklonjenom postoljem unutar ciljnog kvadranta. Pokus se temelji na pretpostavci da će kontrolne životinje provoditi više vremena u ciljnom kvadrantu i napraviti pri tome manje grešaka jer im je proces učenja i pamćenja

očuvan, dok će STZ-icv tretirani štakori provesti manje vremena u ciljnom kvadrantu jer su zaboravili lokaciju platforme i napraviti više pogrešaka jer imaju oštećen proces učenja i pamćenja.

4.2.4. Protokol žrtvovanja i uzimanja biološkog materijala

Životinje su žrtvovane u dubokoj anesteziji tiopentalom (60 mg/kg) i diazepamom (6 mg/kg). Nakon administracije anestetika su dekapitirane, a mozak izvađen i razdijeljen na anatomske regije (HPC i FC). Zatim je tkivo smrznuto u tekućem dušiku i pohranjeno na -80°C.

4.2.5. Homogeniziranje tkiva

Za izolaciju proteina, frontalni korteks štakora stavili smo u 150µL, a hipokampus štakora u 500 µL otopine pufera za lizu stanica (1 M trisa pH 8,0; 1 M NaCl; 0,005 M EDTA; 1 M DTT; 0,01 M natrij vanadata) i proteaza inhibitora (1:100) na ledu nakon čega je tkivo homogenizirano pomoću sonikatora (Microson Ultrasonic Cell Disruptor XL, Manassas, VA, SAD). Homogenat je centrifugiran 10 minuta na 12 500 g i 4 °C (Biofuge frescko heraeu, Hanau, Njemačka), a dobiveni supernatant alikvotiran u triplikatu i pohranjen na -80 °C do daljnje upotrebe.

4.2.6. Mjerenje koncentracije proteina

Koncentraciju proteina u uzorcima ukupnog staničnog lizata frontalnog korteksa i hipokampus odredili smo metodom po Lowriju (Lowry i sur., 1951). Pripremili smo uzorke dodavanjem 10 µL ukupnog staničnog lizata u 2 mL reagensa bakrova sulfata (49 mL otopine 2% Na₂CO₃ u 0,1 M NaOH i 1 mL otopine jednake količine 1% CuSO₄·5H₂O i 2% NaK tartarata) i ostavili 10 min. Dodali smo 0,2 mL folin reagensa (H₂O i Folin-ciocalteu, 2:1) i uzorke ostavili 30 minuta. Nastalu plavu boju izmjerili smo spektrofotometrijskom analizom pri valnoj duljini od 750 nm (Iskra HPV 220, Slovenija). Koncentraciju proteina izračunali smo na temelju standardne otopine albumina goveđeg seruma koncentracije 15mg/mL. Kao slijepu probu u postupku koristili smo 10 µL 0,1 N HCl.

4.2.7. Western blot analiza

Za analizu ekspresije i fosforilacije pojedinih proteina koristili smo Western blot analizu, kojom smo proteine elektroforezom na poliakrilamidnom gelu pod utjecajem napona razdvojili ovisno o njihovoj molekularnoj masi. Razdvojeni proteini su potom preneseni na nitroceluloznu membranu i vizualizirani primarnim i sekundarnim protutijelima kemiluminescentnom reakcijom koju detektiramo kamerom. Uzorci odabrane moždane regije (HPC ili FC) su u odvojenim pokusima pripremljeni uzimanjem jednake količine otopine proteina i *loading buffera* (sample pufer [2 mL glicerola; 6mL 10% SDS; 2,5 mL 1 M trisa pH 6,7; 2-4 mg bromfenol plavila] te 10% β-merkaptetanol). Nakon kratkotrajnog vorteksiranja i centrifugiranja homogenata, kako bi proteini uzorka bio jednoliko raspoređeni pri denaturaciji, kuhamo uzorke na 95°C 10

min. Prilikom kuhanja se pripremi donji 9% SDS-poliakrilamidni gel (N=2: 4,3 mL ddH₂O; 2,5 trisa pH 8,8; 3mL 30% akrilamid/bisakrilamida; 120 µL 10% amonijevog persulfata [APS] i 6,6 µL N,N,N',N'-tetrametiletildiamina [TEMED]) Donji 9% gel će služiti razdvajanju proteina, dok gornji SDS-poliakrilamidni gel služi za sabijanje (3,05 mL H₂O; 1,25 mL trisa pH 6,8; 0,65 mL 30% akrilamid/bisakrilamida; 40µL 10% APS-a i 5µL TEMED-a). Nakon kuhanja, uzorke centrifugiramo 60 sekundi na 13000g (Mikro 120, Hettich, Njemačka) kako bi ostvarili maksimalnu koncentraciju uzoraka na dnu Eppendorf tubice. Potom slijedi nanošenje prethodno izračunatog volumena uzoraka tako da je u svakoj jažici prisutna količina mase od 35 µg. U prvu jažicu se lodira 2µL proteinskog markera (Precision Plus Protein Standards, All Blue, Bio-Rad, SAD) koji će služiti za orijentaciju u detekciji lokacije proteina od interesa prema određenoj standardnoj molekularnoj masi proteina u markeru. Gelovi bivaju uronjeni u pufer za elektroforezu (eng. *running buffer*: 10g SDS-a u 100 mL H₂O; 30g trisa i 115m² glicina u 1 L H₂O) 60 min na uvjetima od 150V i 400mA (Bio-Rad PowerPac Basic, Hercules, SAD). Nakon elektroforeze slijedi transfer na nitroceluloznu membranu 60 min pri uvjetima od 100 V i 400 mA u puferu za transfer (eng. *transfer buffer*: 200 mL hladnog metanola, 105 g glicina i 22,32 g trisa otopljenih u 1 L H₂O). Završetkom transfera provjerimo uspješnost Ponceau otopinom (0,1% Ponceau S otopina u 5% acetatnoj kiselini) i isperemo membrane u LSBW puferu (eng. *low salt washing buffer*: pH7,5; 1,211 g trisa i 78,788 g NaCl u 1 L H₂O). U svrhu sprječavanja nespecifičnog vezanja protutijela iz narednih koraka, nitrocelulozne membrane se blokiraju 1 h na sobnoj temperaturi inkubacijom u otopini za blokiranje (1g nemasnog mlijeka u prahu; 20mL LSBW pufera, 100µL Tween-a). Nakon blokiranja membrana se inkubirane preko noći na 4 °C s protutijelima otopljenima u otopini za blokiranje primjerenom koncentraciji razrjeđenja (IR, IDE, tTAU, tGSK3 1:2000; pTAU, pGSK3 1:1000). Sljedeći dan, nakon trostrukog ispiranja u LSBW puferu (3x5 min), membrana se inkubira s odgovarajućim sekundarnim protutijelom (razrjeđenja anti-mouse 1:200, anti-rabbit 1:2000) 1 h na sobnoj temperaturi. Nakon ponovnog ispiranja u LSBW-u (3x5 min), membrane se inkubiraju u kemiluminescentnoj otopini (Super Signal West Femto, ThermoFisher, SAD) te se detektira signal MicroChemi kamerom (DNR Bio-Imaging Systems MicroChemi, Izrael). Membrana se potom ispere u LSBW-u (3x5min) i inkubira 2 h na sobnoj temperaturi primarnim protutijelom na β-aktin (1:2000) ili GAPDH (1:1000) koji su ekvivalentno i ubikvitarno prisutan proteini u stanicama. Odluku za izbor nanošenja protutijela za jednog od ta dva proteina se donosi ovisno o molekularnoj masi prethodno vizualiziranog ciljnog proteina na pojedinoj nitroceluloznoj membrani i procjeni o mogućem preklapanju signala. GAPDH ima nižu molekularnu masu od β-aktina, zbog čega se nalazi niže na nitroceluloznoj membrani i koristi se u slučajevima kada prethodno vizualizirani ciljni protein ima sličnu molekularnu masu kao β-aktin, što nam predstavlja prepreku u kvalitetnoj analizi signala. Za detekciju i analizu aktina i GAPDH se služimo istim postupkom sekundarnim protutijelom anti-mouse i kemiluminescentom. Analizu aktina i GAPDH koristili smo kao kontrolu postupka te su intenziteti proteina izraženi u omjeru prema signalu aktina u istom uzorku na odgovarajućoj membrani. Rezultati promjene fosforilacije izraženi su kao omjer omjera fosforiliranog proteina i odgovarajućeg aktina i ukupnog proteina i odgovarajućeg aktina.

4.2.8. Statistička analiza

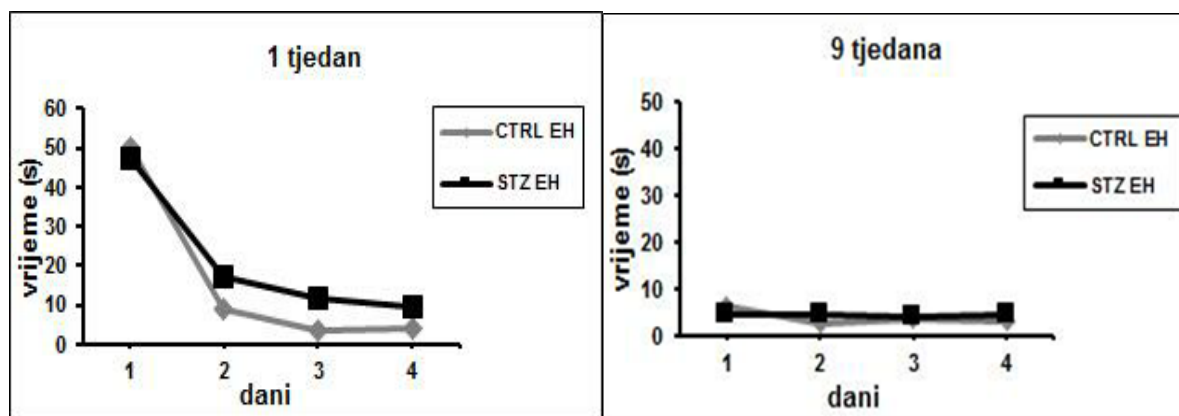
Statistička analiza je provedena neparametrijskim Mann-Whitney U-testom za usporedbu dvije grupe, te Kruskal-Wallis za usporedbu više od dvije grupe. Rezultati su prikazani u obliku srednjih vrijednosti \pm SEM, uz odabranu razinu značajnosti $p < 0,05$.

5. REZULTATI

5.1. Analiza kognitivnih testova

5.1.1. Analiza rezultata test plivanja u Morrisovom labirintu (*Morris water maze test*).

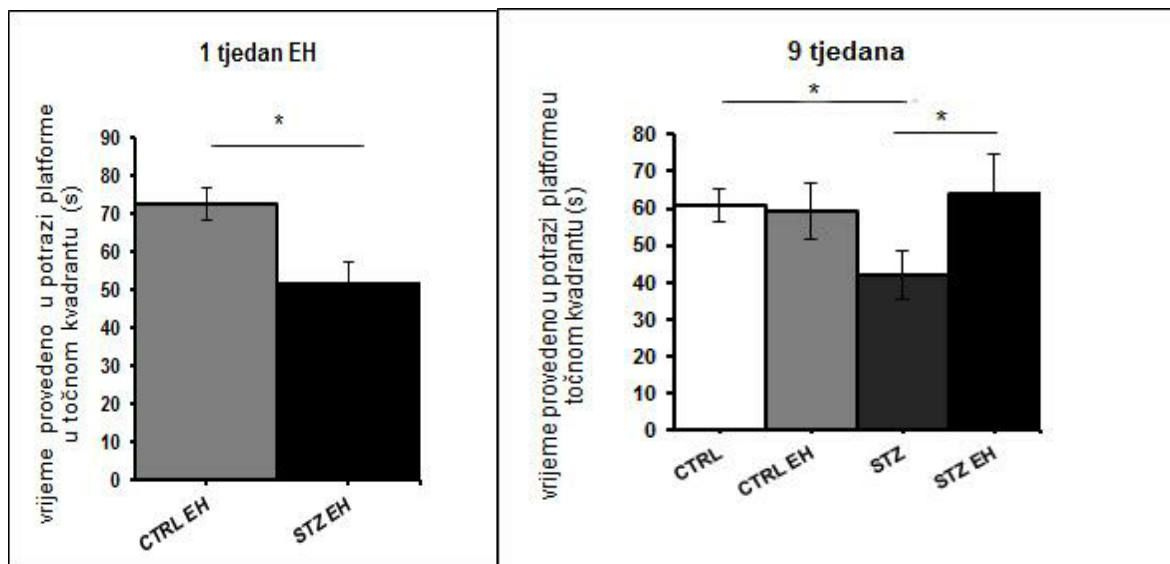
Morrisov vodeni test navigacije je koristan za mentalni trening i istodobnu evaluaciju sposobnosti prostornog učenja i razvijanja dugoročne memorije na mišjem modelu vaskularne demencije (Higaki i sur., 2018). Kako bismo testirali valjanost hipoteze o preventivnom utjecaju obogaćenog okoliša i fizičke aktivnosti (EH+PA) na simptome kognitivnog deficita, bilo je nužno dokumentirati razinu sposobnosti razvijanja prostorne memorije u streptozotocinom tretiranim štakora koji su podvrgnuti EH+PA (STZ EH) u odnosu na kontrolnu skupinu izloženu EH+PA (CTRL+EH). Analiza prikazuje odnos razlika početne faze u prvom tjednu i konačne faze mentalnog treninga u devetom tjednu kroz 4 dana. Utvrđen pad razlike (STZ EH vs. CTRL EH) sa $\Delta t = 6.1 \pm 2,2$ s u prvom tjednu na razliku (STZ EH vs. CTRL EH) od $\Delta t = 1,8 \pm 0,2$ s u devetom tjednu (Slika 3.).



Slika 3. Grafički prikaz odnosa vremena (u sekundama) potrebnog pri plivanju u Morrisovom labirintu za pronalazak postolja kroz 4 dana u prvom (*lijevo*) i devetom tjednu (*desno*) u životinja tretiranih streptozotocinom i potom izloženih obogaćenom okolišu i fizičkoj aktivnosti (STZ EH) i kontrolne skupine izložene obogaćenom okolišu i fizičkoj aktivnosti (CTRL EH). U svakom danu je mjerenje provedeno 3 puta. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina pojedine skupine u danu.

U svakom od provedenih tjedana mentalnog treninga se peti dan koristio za ispitivanje vremena koje bi životinje pri plivanju provele u kvadrantu gdje se prethodna četiri dana nalazilo postolje, omogućavajući nam time ispitivanje kognitivnih funkcija pojedine grupe i samog utjecaja obogaćenog okoliša i fizičke aktivnosti (EH+PA) na prevenciju oštećenja istih.. U prvom tjednu mentalnog treninga je skupina tretirana streptozotocinom i potom izložena EH+PA (STZ EH) provodila statistički značajno manje vremena u

točnom kvadrantu u odnosu na kontrolnu skupinu izloženu EH+PA (-28,9%, $p < 0,05$ vs. CTRL EH) (Slika 4.). U devetom tjednu se razlika smanjila i skupina tretirana STZ-icv i potom izložena EH+PA je pokazala statistički značajan napredak u odnosu na skupinu kojoj se samo administriran STZ-icv. (+40%, $p < 0,05$ vs. STZ) (Slika 4.). Skupina tretirana STZ-icv je statistički značajno manje vremena provodila u točnom kvadrantu u odnosu na kontrolnu skupinu (-31,2%, $p < 0,05$ vs. STZ) (Slika 4.).



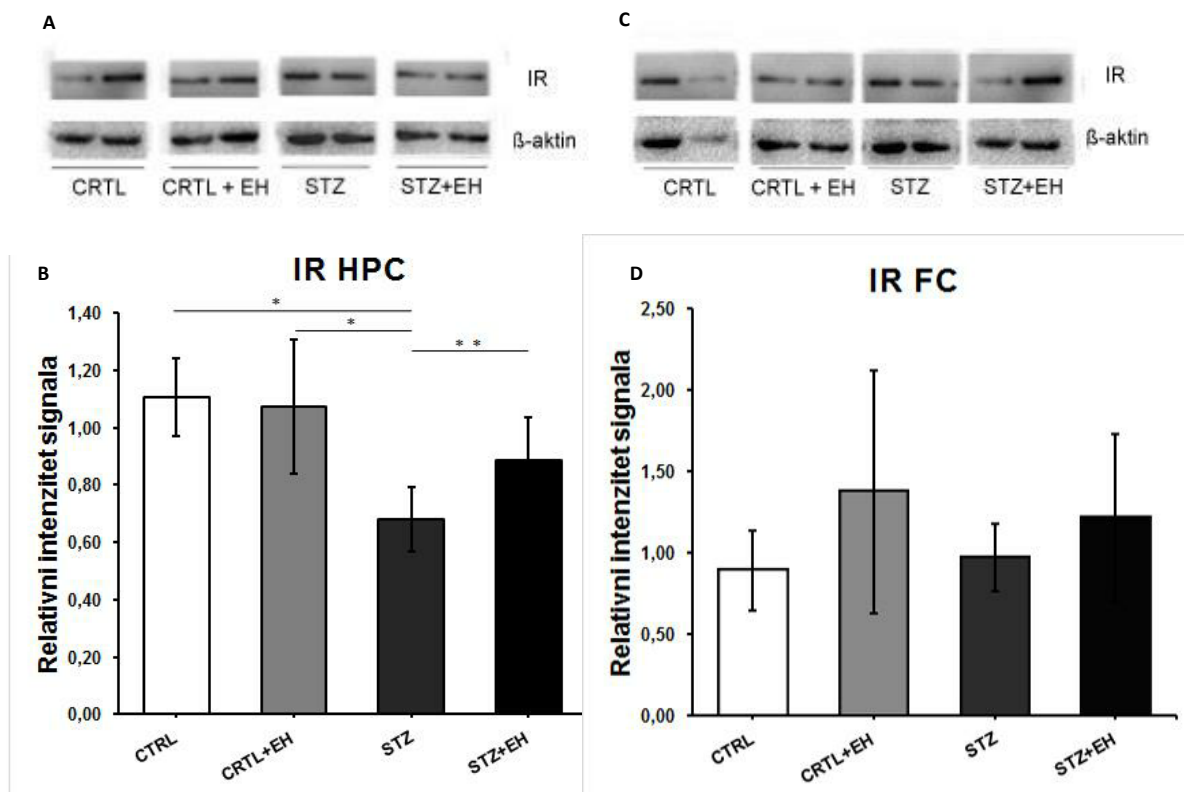
Slika 4. Grafički prikaz odnosa vremena (u sekundama) provedenog pri plivanju u Morrisovom labirintu u točnom kvadrantu s uklonjenim postoljem u prvom (*lijevo*) i devetom tjednu (*desno*) u kontrolnoj skupini (CTRL), kontrolnoj skupini podvrgnutoj obogaćenim uvjetima i fizičkoj aktivnosti (CTRL EH), streptozotocinom tretiranoj skupini (STZ) i streptozotocinom tretiranoj skupini koja je potom podvrgnuta obogaćenom okolišu i fizičkoj aktivnosti (STZ EH). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm SEM. Analizom statističkih značajnosti su dobiveni rezultati prikazani odgovarajućim oznakama: * $p < 0,05$ prema Mann-Whitney U-testu.

5.2. Western blot analiza promjena inzulinske signalizacije, ekspresije IDE i hiperfosforilacije tau proteina u frontalnom režnju i hipokampusu štakorskog modela sAD

Kako bismo kognitivne promjene povezali s biokemijskim promjenama u inzulinskoj signalizaciji, učinjena je western blot analiza inzulinskog receptora (IR), enzima za razgradnju inzulina (IDE), ukupne glikogen sintaze kinaze 3 β (tGSK3 β), fosforilirane glikogen sintaze kinaze 3 β (pGSK3 β), ukupnog tau proteina (t-tau) i fosforiliranog tau proteina (p-tau).

5.2.1. Western blot analiza ekspresije inzulinskog receptora u HPC-u i FC-u

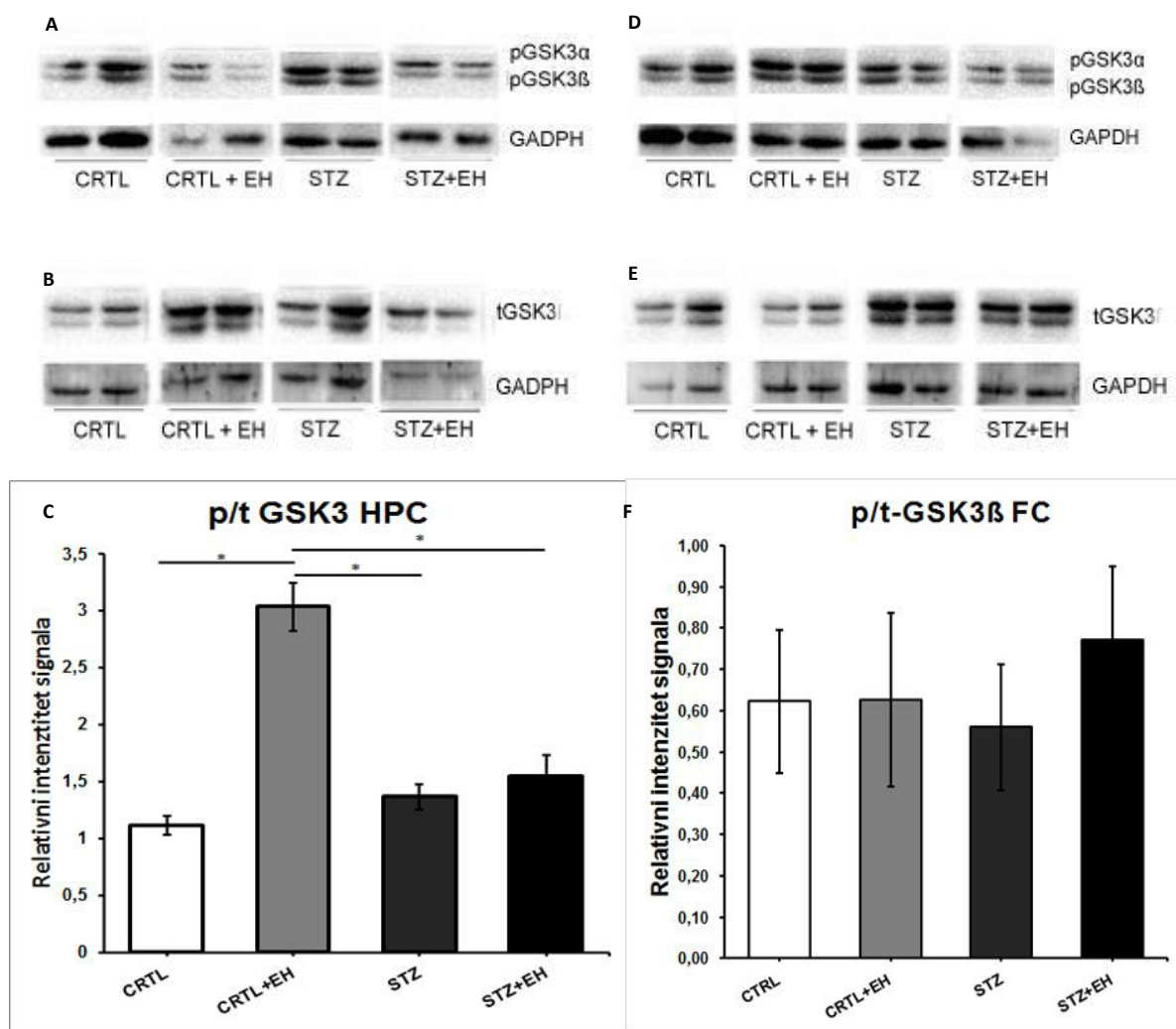
Intracerebroventrikularna primjena STZ-a je utjecala na značajan pad ekspresije IR-a u HPC-u u odnosu na kontrolnu skupinu (-39%, $p > 0,01$ vs. CTRL) (Slika 5.). Obogaćen okoliš i fizička aktivnost (EH+PA) u STZ-icv tretiranih štakora su spriječili pad ekspresije IR-a u HPC-u u odnosu na skupinu tretiranu STZ-icv (+24%, $p < 0,05$ vs. STZ) (Slika 5.). Nije primijećena statistički značajna razlika u ekspresiji IR-a u regiji frontalnog korteksa ni u jednoj skupini (Slika 5.).



Slika 5. Western blot analiza omjera relativnog intenziteta signala IR (inzulinski receptor) i β -aktina u hipokampusu (HPC, A i B) i frontalnom režnju (FC, C i D) kontrolnih životinja (CTRL), kontrolnih životinja izloženih obogaćenim uvjetima, fizičkoj i mentalnoj aktivnosti (CTRL+EH), streptozotocinom tretiranih životinja (STZ) i streptozotocinom tretiranih životinja izloženih obogaćenom okolišu, fizičkoj i mentalnoj aktivnosti (STZ+EH). Prikaz reprezentativnih uzoraka s membrana s elektroforetskim razdvajanjem proteina obilježenih IR protutijelom i detektiranih na 95 kDa (A i C) te pripadajućih uzoraka membrana obilježenih β -aktinom detektiranim na 42 kDa (A i C) u regijama HPC (A) i FC (C). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm SEM. Analizom statističkih značajnosti su dobiveni rezultati prikazani odgovarajućim oznakama: * $p < 0,01$ prema Mann-Whitney U-testu, ** $p < 0,05$ Mann-Whitney U-testu.

5.2.2. Western blot analiza fosforilacije i inaktivacije GSK3 β u HPC-u i FC-u

Aktivacija inzulinskog receptora rezultira fosforilacijom odnosno inaktivacijom GSK3 β (Neumann i sur., 2008). Inače aktivna β podjedinica GSK3 sudjeluje u daljnjoj fosforilaciji tau proteina (Hooper i sur., 2008). Kako bismo utvrdili je li navedeni signalni put uključen u poboljšanje simptoma kognitivnog deficita, analizirali smo udio inaktivnog odnosno fosforiliranog GSK3 β enzima. Podaci prikazuju statistički značajan porast fosforilacije GSK3 β u HPC-u kontrolne skupine izložene obogaćenim uvjetima, fizičkoj i mentalnoj aktivnosti u odnosu na kontrolnu skupinu (271%, $p < 0,001$ vs. CTRL) (Slika 6.). U području HPC-a nije primijećena statistički značajna razlika u fosforilaciji GSK3 β između STZ i STZ-EH skupine (Slika 6.) Također nije primijećena statistički relevantna promjena u fosforilaciji GSK3 β u području frontalnog korteksa (Slika 6.) Potonje upućuje na mogući utjecaj drugih signalnih puteva na kognitivno poboljšanje reguliranih promjenom aktivnosti IR.

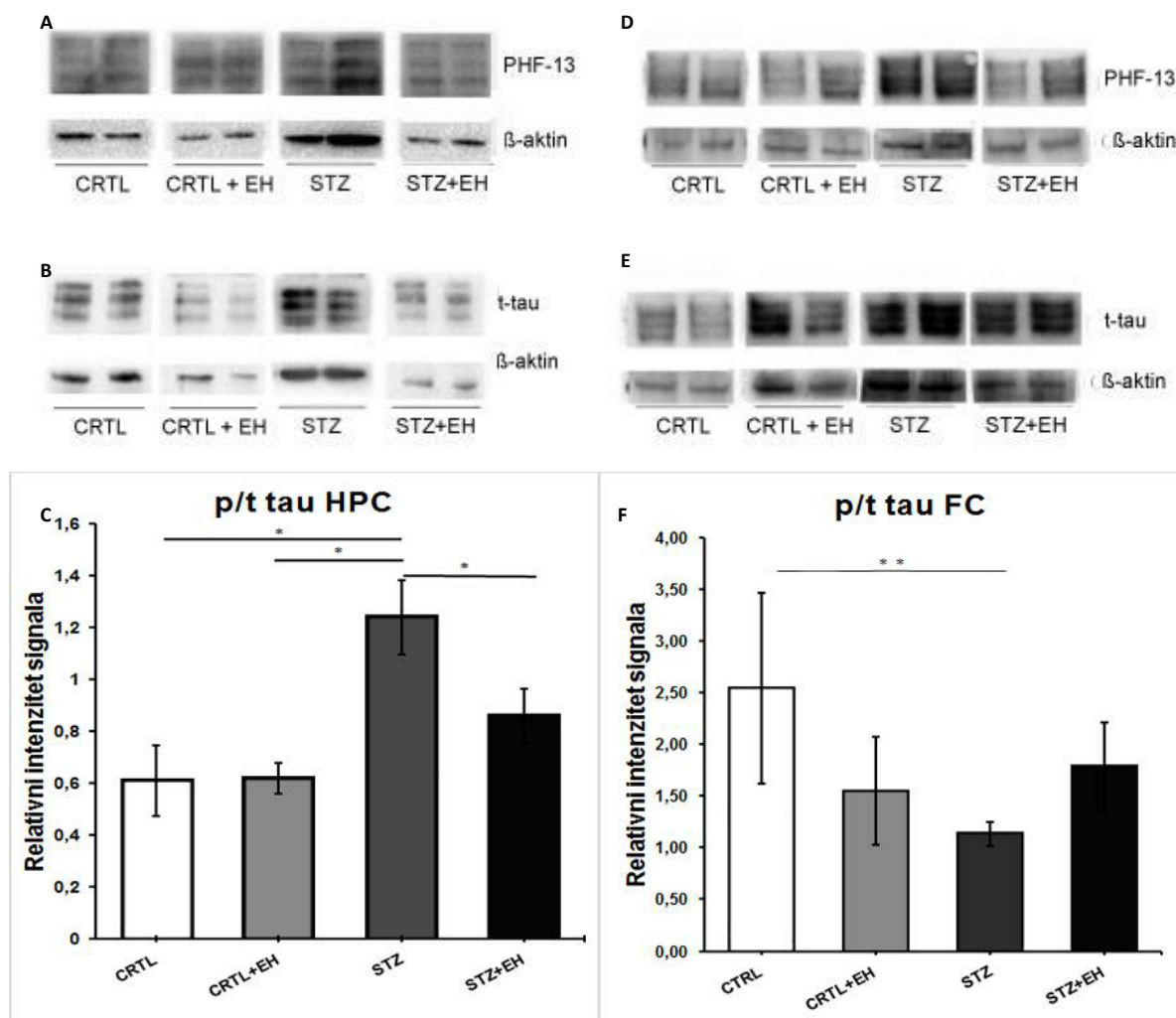


Slika 6. Western blot analiza omjera relativnog intenziteta signala fosforiliranog i ukupnog proteina GSK3β (glikogen sintaza kinaza 3β) u hipokampusu (HPC, A-C) i frontalnom korteksu (FC, D-F) kontrolnih životinja (CTRL), kontrolnih životinja izloženih obogaćenim uvjetima, fizičkoj i mentalnoj aktivnosti (CTRL+EH), streptozotocinom tretiranih životinja (STZ) i streptozotocinom tretiranih životinja izloženih obogaćenim uvjetima, fizičkoj i mentalnoj aktivnosti (STZ+EH). Prikaz reprezentativnih uzoraka s membrana s elektroforetskim razdvajanjem proteina obilježenih pGSK3αβ i tGSK3αβ protutijelima i detektiranih na 51 i 47 kDa (A i B) te pripadajućih uzoraka membrana obilježenih GAPDH detektiranim na 36 kDa (A-B i D-E) u regijama HPC (A-B) i FC (D-E). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± SEM. Analizom statističkih značajnosti su dobiveni rezultati prikazani odgovarajućim oznakama: * $p < 0,001$ prema Mann-Whitney U-testu.

5.2.3. Western blot analiza hiperfosforilacije tau proteina u HPC-u i FC-u

Intracerebroventrikularna primjena STZ-a je pokazala statistički značajan utjecaj na porast hiperfosforilacije tau proteina na SER396 mjestu u odnosu na kontrolnu skupinu (200%, $p < 0,01$, vs. CTRL) (Slika 7.). Izlaganje EH+PA u prethodno tretiranoj STZ-icv grupi je utjecalo na statistički značajan pad u udjelu fosforiliranog tau proteina u HPC-u u odnosu na grupu tretiranu isključivo STZ-icv (-30%, $p < 0,01$, vs. STZ) (Slika 7.). U FC-u STZ-icv tretiranih štakora je primijećen obrnuti fenomen u vidu pada fosforilacije tau proteina u odnosu na kontrolnu skupinu (-55%, $p = 0,08$ vs. CTRL) (Slika 7.). Porast fosforilacije tau proteina u štakora izloženih EH+PA nakon tretiranja STZ-icv u odnosu na grupu

tretiranu samo STZ-om (+36% $p=0,1$) je također uviđen, no statističkom analizom su podatak nije primijećen kao statistički značajan.

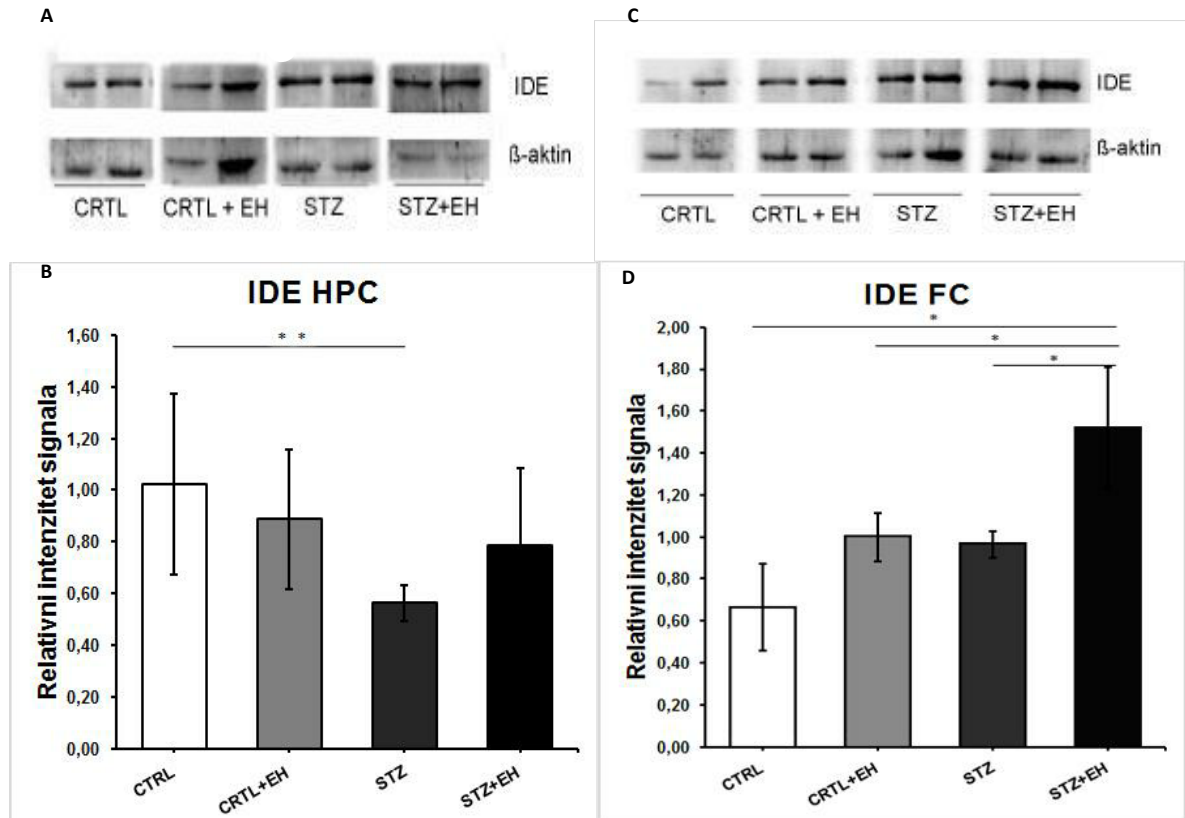


Slika 7. Western blot analiza omjera relativnog intenziteta signala fosforiliranog i ukupnog tau proteina u hipokampusu (HPC, *lijevo*) i frontalnom korteksu (FC, *desno*) kontrolnih životinja (CTRL), kontrolnih životinja izloženih obogaćenom okolišu, fizičkoj i mentalnoj aktivnosti (CTRL+EH), streptozotocinom tretiranih životinja (STZ) i streptozotocinom tretiranih životinja izloženih obogaćenim uvjetima, fizičkoj i mentalnoj aktivnosti (STZ+EH). Prikaz reprezentativnih uzoraka s membrana s elektroforetskim razdvajanjem proteina obilježenih PHF-13 (p-tau) i t-tau protutijelima i detektiranih na 50-80 kDa (A i B) te pripadajućih uzoraka membrana obilježenih β -aktina detektiranim na 42 kDa (A-B i D-E) u regijama HPC (A-B) i FC (D-E). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm SEM. Analizom statističkih značajnosti su dobiveni rezultati prikazani odgovarajućim oznakama: * $p<0,01$ prema Mann-Whitney U-testu, ** $p<0,05$ prema Mann-Whitney U-testu.

5.2.4. Western blot analiza ekspresije proteolitičkog enzima IDE u HPC-u i FC-u

Kao sljedeći od mehanizama potencijalno odgovornih za povoljan utjecaj EH i PA na kognitivne funkcije smo uzeli u obzir ekspresiju enzima za razgradnju inzulina (IDE) za koji je dokumentirana aktivnost razgradnje β -amiloida i regulacije razine inzulina (Farris i sur., 2003). Primjena STZ-icv je utjecaja na značajno smanjenje ekspresije IDE u HPC u odnosu na kontrolnu skupinu. (-45%, $p<0,05$ vs. CTRL) (Slika 8.). U FC-u grupe tretirane STZ-icv i potom izložene EH+PA je razina ekspresija IDE statistički značajno

porasla u odnosu na grupu tretiranu STZ-icv (+33% $p < 0,05$ vs. STZ) (Slika 8.) i kontrolnu skupinu (+88%, $p < 0,01$) (Slika 8.). To bi moglo upućivati na dominantniju ulogu IDE na olakšavanje kognitivnog deficita u području FC.



Slika 8. Western blot analiza omjera relativnog intenziteta signala hipokampusu (HPC, A i B) i frontalnom korteksu (FC, C i D) kontrolnih životinja (CTRL), kontrolnih životinja izloženih obogaćenim uvjetima, fizičkoj i mentalnoj aktivnosti (CTRL+EH), streptozotocinom tretiranih životinja (STZ) i streptozotocinom tretiranih životinja izloženih obogaćenom okolišu, fizičkoj i mentalnoj aktivnosti (STZ+EH). Prikaz reprezentativnih uzoraka s membrana s elektroforetskim razdvajanjem proteina obilježenih IDE protutijelom i detektiranih na 118 kDa (A i C) te pripadajućih uzoraka membrana obilježenih β -aktinom detektiranim na 42 kDa (A i C) u regijama HPC (A) i FC (C). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm SEM. Analizom statističkih značajnosti su dobiveni rezultati prikazani odgovarajućim oznakama: * $p < 0,05$ prema Mann-Whitney U-testu.

6. RASPRAVA

Izlaganje obogaćenim uvjetima, mentalnoj i fizičkoj aktivnosti (EH+PA) je u rezultatima ovog istraživanja jasno pokazalo značajan efekt u vidu bihevioralnih, kognitivnih i biokemijskih promjena u HPC i FC mozga štakorskog modela sAD tretiranog STZ-icv. Podvrgavanje STZ-icv tretiranih životinja EH+PA je rezultiralo prevencijom vidljivog kognitivnog deficita u obliku oštećenja sposobnosti prostornog učenja (Slika 3.) i formacije dugoročne memorije (Slika 4.). Razlika uočljiva u prvom tjednu testiranja između STZ grupe izložene EH+PA i kontrolne skupine se smanjuje na približno slične vrijednosti tijekom devetog tjedna (Slika 3., Slika 4.), što dozvoljava zaključak o uspješnoj prevenciji kognitivnog deficita uočnog u štakora tretiranih STZ-icv koji su bili izloženi EH+PA. Na temelju rezultata testova dizajniranih u svrhu evaluacije učinka STZ-icv i prevencije kognitivnog deficita uzrokovanog STZ-icv smo pokazali da EH+PA uzrokuje biokemijske promjene u vidu regulacije ekspresije proteina ključnih u inzulinskoj signalizaciji. Promjene u ekspresiji IR u hipokampusu kao odgovor na mentalni trening i njihov utjecaj na daljnju aktivaciju genske ekspresije su već prepoznate ranijim istraživanjima na STZ-icv tretiranim štakorima (Zhao i sur., 1999, Zhao i Alkon, 2001) i sukladne su rezultatima prikazanim u ovom istraživanju. EH+PA je ostvario preventivni utjecaj na pad ekspresije IR koji je primijećen u STZ-icv tretiranim štakorima u odnosu na kontrolnu skupinu u HPC-u (Slika 5.) Poznato je više molekularnih unutarstaničnih puteva posljedičnih aktivaciji IR-a, od kojih je prepoznat i put protein kinaze B (pKB) kojim dolazi do inaktivacije GSK3 i njegove fosforilacije koja ima daljnju ulogu u regulaciji tau patologije (Wang i sur., 2007). Kompleksna mreža međudjelovanja brojnih kinaza aktiviranih IR-om i drugih puteva regulacije GSK3 (Kremer i sur., 2011, Medina i Wandosell, 2011) bi mogla biti odgovorna za nedostatak poveznice rezultata ostvarenih ovim istraživanjem između inaktivacije GSK3 β (Slika 6.), regulacije ekspresije IR (Slika 5.) i fosforilacije tau proteina (Slika 7.). Jedan od mogućih razloga neusklađenosti promjena aktivnosti IR i tGSK3 bi mogla biti i potencijalna uloga drugog signalnog puta koji je reguliran IR-om, odnosno/MAPK. (De Meyts, 2016.) Karakterističan porast fosforilacije tau proteina je uočen u HPC-u u grupi administriranoj STZ-icv (Slika 7.) u odnosu na kontrolu. Sličan obrazac je također utvrđen prethodnim studijama (Grünblatt i sur., 2007, Osmanović- Barilar i sur., 2015) i dodatno utemeljuje model primjenjivanja STZ-icv u životinjskih modela u svrhu imitiranja patofiziologije sAD, obzirom na ponovno dokazanu povezanost kognitivnog deficita STZ-icv skupine u odnosu na kontrolu u kognitivnim testovima (Slika 4.) s promjenama ekspresije IR (Slika 5.) i fosforilacije tau proteina (Slika 7.) koji su prikazani ovim istraživanjem. Budući da podaci ukazuju na preventivni efekt EH+PA na porast fosforilacije tau proteina u HPC-u (Slika 7.), održavajući razinu fosforilacije sličnu kontroli, možemo ukazati na moguću povezanost izostanka tau patologije s preventivnim efektom EH+PA na kognitivne sposobnosti životinjskih modela. Velik broj dokaza ukazuje na nedvojbenu ulogu tau proteina u patologiji AD (Blue i sur., 2000; Mandelkow i Mandelkow, 1994) i ukazuju na mogućnost usmjeravanja ciljne terapije na njegov metabolizam kao obećavajuću strategiju u liječenju AD (Gong i sur., 2008), međutim, problem ostaje nepoznanica egzaktnog patološkog puta koji rezultira navedenom tau patologijom. Rezultati upućuju na različit, pa čak i suprotan

efekt STZ-icv i EH+PA na ekspresiju IR-a i fosforilaciju tau proteina u HPC-u i FC-u. Unatoč ulozi FC-a u izvršavanju motoričkih zadataka, radnoj memoriji, ulozi u obradi i vađenju informacija epizodičke memorije (Elhalal i sur., 2014) i činjenici da navedene funkcije bivaju zahvaćene progresijom AD, vrlo je malo studija koje obraćaju pozornost na moguć doprinos patološkom razvoju AD i direktno istražuju molekularne i biokemijske procese koji se odvijaju u patogenezi sAD. Zanimljiv podatak je da se električkom stimulacijom medijalnog prefrontalnog korteksa koji je prepoznat kao centar radne memorije, ostvarilo značajno poboljšanje radne memorije i kognitivne disfunkcije u životinjskih modela tretiranih streptozotocinom (Wu i sur., 2017) dodatno upućujući na znatnu ulogu FC-a u simptomatologiji kognitivnog deficita. Dodatni mehanizam koji potencijalno utječe na patogenezu AD je ekspresija IDE. Literatura je po pitanju mehanizma djelovanja ovog enzima oprečna, gdje određeni izvori ukazuju na negativni utjecaj hipofunkcije IDE na razgradnju A β i kognitivne funkcije (Farris i sur., 2003, Knezović, 2015), dok drugi upućuju na pogoršanje kognitivnih funkcija i taloženja A β pri višim razinama ekspresije IDE i razlikuju utjecaj IDE ovisno o težini bolesti AD, ukazujući na potencijalni bivalentan učinak IDE (Delikaya i sur., 2019). Naši rezultati su pokazali također oprečne podatke o razinama IDE u HPC-u i FC-u u pojedinim skupinama. U hipokampusu je administracija STZ-icv utjecala na snižavanje razine IDE u odnosu na kontrolu (Slika 8.) što ide u prilog rezultatima detektiranog kognitivnog deficita na provedenim kognitivnim testovima (Slika 4.) i dokazano je na istom modelu ranijim istraživanjima (Knezović, 2015, Osmanović Barilar i sur., 2015). Primjena EH+PA nije pokazala statistički značajan utjecaj na alteraciju ekspresije IDE u HPC-u u STZ-icv štakora iako je primijećen odgovarajući trend povećanja ekspresije u odnosu na samo STZ-icv tretirane subjekte. Međutim, u regiji FC-a je došlo do značajnog povećanja ekspresije IDE u STZ-icv skupini izloženoj EH+PA, dok je razina ekspresije IDE u kontrolnoj skupini koja nije izložena EE+PA, suprotno rezultatima u HPC-u, značajno niža. Potonje bi moglo upućivati na suprotne mehanizme patogeneze i utjecaja EH+PA pa i samog IDE u HPC-u i FC-u. Dok je u HPC-u izražen dominantan utjecaj IR-a i tau patologije, patogeneza procesa u FC-u bi mogla imati podlogu u promjenama ekspresije IDE.

S obzirom na ulogu regulacije aktivnosti IR-a u mehanizmima aktivacije brojnih daljnjih signalnih puteva, odabir egzaktnog puta odgovornog za konačni efekt fosforilacije tau proteina i razvoja simptomatologije AD zaista predstavlja izazov. S ciljem boljeg razumijevanja učinka EH+PA na molekularni mehanizam djelovanja u kognitivnoj simptomatologiji je u budućnosti planirano istražiti druge molekularne biokemijske puteve aktivacije inzulinske signalizacije i potencijalan učinak razina A β , te međusobne odnose s trenutnim rezultatima u svrhu uspostavljanja konkretnije uzročno-posljedične veze. Također bi valjalo istražiti potencijalnu reverziju već razvijenih simptoma primjenom EH+PA. Mišljenja smo da navedeni rezultati mogu uvelike doprinijeti razjašnjavanju mehanizma olakšavanja simptoma kognitivnog deficita, pri tome ukazujući na metaboličke i signalne puteve koji bi se mogli oponašati pri dizajniranju potencijalnih budućih lijekova za efikasniju terapiju i prevenciju Alzheimerove bolesti.

7. ZAKLJUČCI

- 1) Administracija STZ-icv utječe na pojavu značajnog kognitivnog deficita u odnosu na kontrolnu skupinu.
- 2) Podvrgavanje EH+PA ima preventivni učinak na razvoj kognitivnog deficita u STZ-icv tretiranih štakora u odnosu na kontrolnu skupinu.
- 3) Tretman STZ-icv uzrokuje na biokemijske promjene u HPC-u koje se očituju promjenama u inzulinskoj signalizaciji vidljive kao značajni pad ekspresije IR-a, porast fosforilacije tau proteina te pad ekspresije IDE u odnosu na kontrolnu skupinu.
- 4) EH+PA značajno povećavaju ekspresiju IR-a u HPC-štakora tretiranih sa STZ-icv u odnosu na skupinu tretiranu samo STZ-icv.
- 5) STZ i EH+PA imaju suprotan učinak u HPC-u i FC-u i očituju se kao različit obrazac promjene fosforilacije tau proteina i ekspresije IDE.
- 6) EH+PA djeluje na pad fosforilacije tau proteina u STZ-icv tretiranoj grupi u odnosu na STZ grupu koja nije izložena obogaćenim uvjetima u HPC-u.
- 7) Značajan utjecaj na pojačanu ekspresiju IDE u FC ima utjecaj izlaganja EH+PA skupine tretirane STZ-icv u odnosu na grupu tretiranu samo STZ-icv.

8. ZAHVALE

Želim se ovim putem zahvaliti svojoj divnoj mentorici doc. dr. sc. Jeleni Osmanović-Barilar na beskrajnoj količini truda, povjerenja i vremena, te prije svega vedrine koja je uljepšala sve provedeno vrijeme u savladavanju znanstvene metodologije i usmjeravanju u dio istraživačke medicine koji sam iznimno zavoljela.

Hvala prof. dr. sc. Meliti Šalković-Petrišić, voditeljici laboratorija za molekularnu neurofarmakologiju na pruženom povjerenju i prilici da kao studentica imam dopuštenje izučavati i istraživati u njezinom laboratoriju.

Hvala i svim ostalim članovima iz laboratorija za molekularnu neurofarmakologiju i djelatnicima Zavoda za farmakologiju na brojnim savjetima i pomoći, te Josipu Paviću na iznimnoj tehničkoj pomoći pri izvođenju pokusa.

9. LITERATURA

- Alzheimer's Disease International. 2019. World Alzheimer Report 2019
- Ahmed, F., Ansari, J. A., Ansari, Z. E., Alam, Q., Gan, S. H., Kamal, M. A., & Ahmad, E. (2014). A molecular bridge: connecting type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *CNS & neurological disorders drug targets*, 13(2), 312–321.
- Beauquis, J., Roig, P., De Nicola, A. F., & Saravia, F. (2010). Short-term environmental enrichment enhances adult neurogenesis, vascular network and dendritic complexity in the hippocampus of type 1 diabetic mice. *PloS one*, 5(11), e13993.
- Begić, D., Jukić, V., Medved, V. Psihijatrija. Medicinska naklada, Zagreb, 2015.
- Ballard, C., Gauthier, S., Corbett, A., Brayne, C., Aarsland, D., & Jones, E. (2011). Alzheimer's disease. *Lancet (London, England)*, 377(9770), 1019–1031. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61349-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61349-9)
- de la Monte, S. M., & Wands, J. R. (2008). Alzheimer's disease is type 3 diabetes-evidence reviewed. *Journal of diabetes science and technology*, 2(6), 1101–1113. <https://doi.org/10.1177/193229680800200619>
- De Meyts P. The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network. [Updated 2016 Apr 27]. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK378978/>
- Elhalal, A., Davelaar, E. J., & Usher, M. (2014). The role of the frontal cortex in memory: an investigation of the Von Restorff effect. *Frontiers in human neuroscience*, 8, 410. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2014.00410hardy>
- Farris, W., Mansourian, S., Chang, Y., Lindsley, L., Eckman, E. A., Frosch, M. P., Eckman, C. B., Tanzi, R. E., Selkoe, D. J., & Guenette, S. (2003). Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), 4162–4167. <https://doi.org/10.1073/pnas.0230450100>
- Graham, M.L., Janecek, J.L., Kittredge, J.A., Hering, B.J., Schuurman, H.J. The streptozotocin-induced diabetic nude mouse model: differences between animals from different sources. *Comp Med*. 2011;61(4):356–360.
- Gong, C. X., & Iqbal, K. (2008). Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau: a promising therapeutic target for Alzheimer disease. *Current medicinal chemistry*, 15(23), 2321–2328. <https://doi.org/10.2174/092986708785909111>
- Grünblatt, E., Salkovic-Petrisic, M., Osmanovic, J., Riederer, P., & Hoyer, S. (2007). Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. *Journal of Neurochemistry*, 101(3), 757–70. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04368.x>
- Hardy, J. A., and Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256, 184–185. doi: 10.1126/science.1566067
- Higaki, A., Mogi, M., Iwanami, J., Min, L. J., Bai, H. Y., Shan, B. S., Kukida, M., Kan-No, H., Ikeda, S., Higaki, J., & Horiuchi, M. (2018). Predicting outcome of Morris water maze test in vascular dementia mouse model with deep learning. *PloS one*, 13(2), e0191708. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191708>
- Hooper, C., Killick, R., & Lovestone, S. (2008). The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*, 104(6), 1433–1439. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05194.x>

- Jankowsky, J. L., Melnikova, T., Fadale, D. J., Xu, G. M., Slunt, H. H., Gonzales, V., Younkin, L. H., Younkin, S. G., Borchelt, D. R., & Savonenko, A. V. (2005). Environmental enrichment mitigates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(21), 5217–5224. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5080-04.2005>
- Kametani, F. and Hagesawa, M. (2018) Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Front. Neurosci.* 12(25), 1-11. doi=10.3389/fnins.2018.00025
- Kang, E. B., Cho, J. Y., (2014). Effects of treadmill exercise on brain insulin signaling and β -amyloid in intracerebroventricular streptozotocin induced-memory impairment in rats. *Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry*. 18 (1): 89-96. doi:10.5717/jenb.2014.18.1.89.
- Katzman, R. (1993); Education and the prevalence of dementia and Alzheimer's disease. *Neurology*. 43(1):13-20.
- Kim, J., Chakrabarty, P., Hanna, A., March, A., Dickson, D. W., Borchelt, D. R., et al. (2013). Normal cognition in transgenic BRI2-Abeta mice. *Mol. Neurodegener.* 8, 15. doi: 10.1186/1750-1326-8-15
- Knezovic, A. (2015). Kolinergički sustav u mozgu štakorskog modela eksperimentalne Alzheimerove bolesti izazvane streptozotocinom; dizertacija (Zagreb, Hrvatska)
- Knezovic, A., Osmanovic-Barilar, J., Curlin, M., Hof, P. R., Simic, G., Riederer, P., & Salkovic-Petrisic, M. (2015). Staging of cognitive deficits and neuropathological and ultrastructural changes in streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 122(4), 577–92. <http://doi.org/10.1007/s00702-015-1394-4>
- Kremer, A., Louis, J. V., Jaworski, T., & Van Leuven, F. (2011). GSK3 and Alzheimer's Disease: Facts and Fiction.... *Frontiers in molecular neuroscience*, 4, 17. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2011.00017>
- Lannert, H., Hoyer, S. (1998) Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. *Behav Neurosci* 112:1199-1208
- Lista, S., O'Bryant, S.E., Blennow, K., et al. Biomarkers in Sporadic and Familial Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2015;47(2):291–317. doi:10.3233/JAD-143006
- Mandelkow, Eva-Maria & Mandelkow, Eckhard. (1994). Tau protein and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*. 15. 85–86. 10.1016/0197-4580(94)90178-3.
- Medina, M., & Wandosell, F. (2011). Deconstructing GSK-3: The Fine Regulation of Its Activity. *International journal of Alzheimer's disease*, 479249. <https://doi.org/10.4061/2011/479249>
- Neumann, K.F., Rojo, L., Navarrete, L.P., Farías, G. and Maccioni, R.P. (2008) Insulin Resistance and Alzheimer's Disease, Molecular Links & Clinical Implications. *Current Alzheimer Research*, 5, 438-447. <https://doi.org/10.2174/156720508785908919>
- Osmanović Barilar, J., Knezović, A., Grünblatt, E., Riederer, P., and Šalković-Petrišić, M., (2015) *Nine-month follow-up of the insulin receptor signalling cascade in the brain of streptozotocin rat model of sporadic Alzheimer's disease*. *Journal of Neural Transmission*, 122 (4). pp. 565-576. ISSN 0300-9564
- Osmanović, J., Šalković-Petrišić, M., Hoyer, S., Riederer, P., Environmental enrichment and mental training improve cognition in rat model od sporadic alzheimer's disease// Abstracts of the 9th International Conference AD/PD ""Alzheimer's and Parkinson's Diseases: Neurodegenerative Diseases 6 (2009) (S1) (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

- Ostrowitzki, S., Deptula, D., Thurfjell, L., et al. Mechanism of Amyloid Removal in Patients With Alzheimer Disease Treated With Gantenerumab. *Arch Neurol.* 2012;69(2):198–207. doi:10.1001/archneurol.2011.1538
- Price, J. L., McKeel, D. W., Buckles, V. D., Roe, C. M., Xiong, C., Grundman, M., ... Morris, J. C. (2009). Neuropathology of nondemented aging: Presumptive evidence for preclinical Alzheimer disease. *Neurobiology of Aging*, 30(7), 1026–1036. <http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.04.002>
- Rai, S., Kamat, P.K., Nath, C., Shukla, R. A study on neuroinflammation and NMDA receptor function in STZ (ICV) induced memory impaired rats. *J Neuroimmunol.* 2013;254:1–9.
- Rampon, C., Tang, Y. P., Goodhouse, J., Shimizu, E., Kyin, M., & Tsien, J. Z. (2000). Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nature neuroscience*, 3(3), 238–244. <https://doi.org/10.1038/72945>
- Salkovic-Petrisic, M., Hoyer, S. Central insulin resistance as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: an experimental approach. *J Neural Transm Suppl.* 2007;(72):217–233. doi:10.1007/978-3-211-73574-9_28
- Salkovic-Petrisic, M., Knezovic, A., Hoyer, S., & Riederer, P. (2013). What have we learned from the streptozotocin-induced animal model of sporadic Alzheimer's disease, about the therapeutic strategies in Alzheimer's research. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 120(1), 233–52. <http://doi.org/10.1007/s00702-012-0877-9>
- Saxena, G., Patro, I.K., Nath, C. (2011) ICV STZ induced impairment in memory and neuronal mitochondrial function: A protective role of nicotinic receptor. *Behav Brain Res* 224:50-57
- Stern, Y., Gurland, B., Tatemichi, T. K., Tang, M. X., Wilder, D., & Mayeux, R. (1994). Influence of education and occupation on the incidence of Alzheimer's disease. *JAMA*, 271(13), 1004–1010.
- van Praag, H., Kempermann, G., & Gage, F. H. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nature reviews. Neuroscience*, 1(3), 191–198. <https://doi.org/10.1038/35044558>
- Verret, L., Krezymon, A., Halley, H., et al. (2013). Transient enriched housing before amyloidosis onset sustains cognitive improvement in Tg2576 mice. *Neurobiol Aging*. 34(1):211–225. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2012.05.013
- Wang, J. Z., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (2007). Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *The European journal of neuroscience*, 25(1), 59–68. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05226.x>
- White, L., Katzman, R., Losonczy, K., Salive, M., Wallace, R., Berkman, L., Taylor, J., Fillenbaum, G., & Havlik, R. (1994). Association of education with incidence of cognitive impairment in three established populations for epidemiologic studies of the elderly. *Journal of clinical epidemiology*, 47(4), 363–374. [https://doi.org/10.1016/0895-4356\(94\)90157-0](https://doi.org/10.1016/0895-4356(94)90157-0)
- Wu, Y. J., Lin, C. C., Yeh, C. M., Chien, M. E., Tsao, M. C., Tseng, P., Huang, C. W., & Hsu, K. S. (2017). Repeated transcranial direct current stimulation improves cognitive dysfunction and synaptic plasticity deficit in the prefrontal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats. *Brain stimulation*, 10(6), 1079–1087. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2017.08.007>
- Wu, J., & Yan, L. J. (2015). Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic β cell glucotoxicity. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy*, 8, 181–188. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S82272>
- Zhao, W.Q., Alkon, D.L. (2001). Role of insulin and insulin receptor in learning and memory. *Mol Cell Endocrinol.*;177(1-2):125–134. doi:10.1016/s0303-7207(01)00455-5

- Zhao, W., Chen, H., Xu, H., Moore, E., Meiri, N., Quon, M. J., & Alkon, D. L. (1999). Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. *The Journal of biological chemistry*, 274(49), 34893–34902. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.49.34893>
- Zhang, M.Y., Katzman, R., Salmon, D., Jin, H., Cai, G.J., Wang, Z.Y., Qu, G.Y., Grant I., Yu, E., Levy, P.A. (1990). The prevalence of dementia and Alzheimer's disease in Shanghai, China: impact of age, gender, and education. *Neurol.*7(4):428-37.

10. SAŽETAK

OPORAVAK INZULINSKE SIGNALIZACIJE I FOSFORILACIJE TAU PROTEINA U MOZGU ŠTAKORSKOG MODELA SPORADIČNOG OBLIKA ALZHEIMEROVE BOLESTI POSREDOVAN JE OBOGAĆENIM OKOLIŠEM I FIZIČKOM AKTIVNOŠĆU

Kamelija Horvatović

Demencija uzrokovana sporadičnim oblikom Alzheimerove bolesti (sAD) pokazuje zabrinjavajuće rastući trend u općoj populaciji. Karakterizirana je simptomatologijom kognitivnog deficita, progresivnim gubitkom pamćenja i postepenim napredovanjem bolesti rezultirajući preuranjenom smrću. Neuropatološka obilježja su pojava netopljivih izvanstaničnih agregata β -amiloida (A β) u obliku senilnih plakova i intraneuronskih neurofibrilarnih snopića (NFT) od hiperfosforiliranog tau proteina. Patofiziologija sAD je karakterizirana pojavom centralne inzulinske rezistencije i hipometabolizma glukoze. Intracerebrovaskularna administracija streptozotocina (STZ-icv) u štakorskim modela se povezuje s desenzitizacijom inzulinskog receptora (IR) i biokemijskim promjenama sličnima onima zabilježenim u sAD, pa je stoga predložena kao prigodan model za istraživanje određenih patoloških osobitosti sAD. U novije vrijeme raste broj dokaza o efektima koje obogaćeni uvjeti i pojačana fizička i mentalna aktivnost (EH+PA) pružaju u olakšavanju simptomatologije AD, no istraživanja se većinom baziraju na transgeničnim životinjskim modelima familijarnog oblika bolesti (fAD) koji je puno manje zastupljen u općoj populaciji. Ovim istraživanjem smo ispitali kognitivne i biokemijske promjene u štakorskim modelima sAD tretiranim STZ-icv i podvrgnutima EH+PA. Provedena je western blot analiza alteracije ekspresije IR i promjena u daljnjem putu inzulinske signalizacije u vidu fosforilacije enzima glikogen sintaze kinaze 3 β (GSK3 β) i posljedične hiperfosforilacije tau proteina, te ekspresije enzima razgradnje inzulina (IDE) u frontalnom korteksu (FC) i hipokampusu (HPC). Rezultati pokazuju značajan zaštitni efekt EH+PA na kognitivne sposobnosti i ukazuju na moguću biokemijsku podlogu u alteraciji inzulinske signalizacije.

Ključne riječi: Alzheimerova bolest, inzulinska signalizacija, metabolizam, obogaćeni uvjeti, streptozotocin

11. SUMMARY

AMELIORATION OF INSULIN SIGNALING AND TAU PROTEIN PHOSPHORYLATION IN A BRAIN OF A RAT MODEL OF SPORADIC ALZHEIMER'S DISEASE IS MEDIATED BY ENRICHED ENVIRONMENT AND PHYSICAL ACTIVITY

Kamelija Horvatović

Dementia caused by sporadic form of Alzheimer's disease (sAD) shows an alarming trend of incidence growth in general population. The symptomatology is marked by cognitive deficit, progressive memory loss and gradual deterioration leading to premature death. Neuropathological hallmarks are findings of extracellular aggregates of β -amyloid (A β) forming senile plaques and intraneuronal neurofibrillary tangles (NFT) consisting of hyperphosphorylated tau protein. Pathophysiology is associated with central insulin resistance and glucose hypometabolism. Intracerebrovascular administration of streptozotocin (STZ-icv) in rat animal models is affiliated with insulin receptor (IR) desensitization and biochemical alterations similar to those reported in sAD, which is why it has been proposed as a adequate model for research of some pathological features of sAD. A growing body of evidence suggests enriched environment and physical activity having an ameliorating effect on AD symptomatology, but research has only been conducted on transgenic animal models of familial form of Alzheimer's disease (fAD) which has minor prevalence in general population. Cognitive and biochemical changes are documented in our research on STZ-icv treated rat models who have undergone EH+PA. Western blot analysis is conducted for finding of IR expression alteration, together with changes in tau phosphorylation, glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) phosphorylation and modification of insulin degrading enzyme (IDE) expression in frontal cortex (FC) and hippocampus (HPC). Results show significant protective effect on cognitive abilities and suggest possible underlying biochemical alteration in insulin signaling.

Keywords: Alzheimer's disease, enriched environment, insulin signaling, metabolism, streptozotocin