



Središnja medicinska knjižnica

Osmanović Barilar, Jelena (2013) *Inzulinski sustav mozga u eksperimentalnom štakorskom modelu sporadične Alzheimerove bolesti [Insulin signaling in the brain of experimental sporadic Alzheimer disease rat model]. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.*

<http://medlib.mef.hr/1878>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Jelena Osmanović Barilar

**Inzulinski sustav mozga u
eksperimentalnom
štakorskom modelu sporadične
Alzheimerove bolesti**

DISERTACIJA



Zagreb, 2013.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Jelena Osmanović Barilar

**Inzulinski sustav mozga u
eksperimentalnom
štakorskom modelu sporadične
Alzheimerove bolesti**

DISERTACIJA

Zagreb, 2013.

Pokusi ove disertacije izvedeni su na Zavodu za farmakologiju i Hrvatskom institutu za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, te na Zavodu za Neurokemiju Klinike za psihijatriju i psihoterapiju u Würzburgu u Njemačkoj.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Melita Šalković-Petrišić

Pokusi su financijski pomognuti od strane Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta RH (voditelj projekta: prof. dr. sc. Melita Šalković-Petrišić) i od strane DAAD.

Od sveg srca se zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Melita Šalković-Petrišić na velikoj potpori, motivaciji za rad, razumjevanju, te na pomoći onda kada mi je najviše trebalo. Bez njene velike pomoći bilo bi puno teže.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Peteru Riedereru na suradnji i prilici da radim u njegovom laboratorij u Würzburgu. Posebna zahvala tehničkoj pomoćnici gdji Božici Hržan na nesebičnoj pomoći pri izvođenju pokusa. Zahvaljujem se svima koji su mi dali podršku tijekom izrade ove disertacije, posebno šefu Zavoda za farmakologiju prof. dr. sc. Vladi Bradamante, kao i drugim djelatnicima Zavoda za farmakologiju, Medicinskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.

Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji na strpljenju, razumjevanju i podršci tijekom izrade ove disertacije, sve je ljepše kada su oni uz mene.

SADRŽAJ:

Kratice

1.UVOD	1
1.1.Alzheimerova bolest	2
1.1.1.Patofiziologija	2
1.1.2. Histološka obilježja AD	3
1.1.3. Kognitivne promjene u AD-u	5
1.1.4. Terapija AD	6
1.2.Učenje i pamćenje	7
1.2.1.Različiti oblici učenja i pamćenja	7
1.2.2.Bazični mehanizmi učenja i pamćenja	8
1.3.Inzulin i inzulinski receptor u mozgu	8
1.3.1.Inzulin	8
1.3.2.Inzulinski receptor	9
1.3.3.Inzulin/IR signalni put	9
1.3.3.1.Regulacija inzulina/IR signalnog puta	13
1.3.4.Fiziološki učinci inzulina/IR u mozgu	15
1.3.5.Inzulin/IR signalni put u mozgu u Alzheimerovoj bolesti	18
1.4.Eksperimentalni modeli Alzheimerove bolesti	20
1.4.1.Eksperimentalni modeli sAD temeljeni na mutacijama gena	20
1.4.2.STZ-icv eksperimentalni model sAD	22
1.4.2.1.Kemijska građa	22
1.4.2.2.Mehanizam djelovanja streptozotocin	22
1.4.3.Dosadašnja istraživanja eksperimentalnog modela s intracerebroventrikularnom primjenom streptozotocina (STZ-icv model)	24
1.4.3.1.Bihevioralne promjene	24
1.4.3.2.Biokemijske promjene u mozgu	25
1.4.3.3.Strukturne promjene u mozgu	29
1.4.4.lijekovi koji utječu na promjene izazvane STZ-icv primjenom	29
2.HIPOTEZA I CILJEVI ISPITIVANJA	32
3.MATERIJALI I METODE	34
3.1.Životinje	34
3.2.Intracerebroventrikularna primjena streptozotocina	35
3.3.Korištene kemikalije, reagensi i antitijela	35
3.4.Biokemijske metode	37
4.4.1.SDS-PAGE elektroforeza i Western blot analiza	37
4.4.2.Imunohistokemija	39
4.4.3.Kongo red bojanje	40
3.5.Metode ispitivanja spoznajnih funkcija učenja i pamćenja	41
4.5.1.Test plivanja u labirintu (Morris water maze swimming test)	41
4.5.2. Test pasivnog izbjegavanja elektrošoka (Passive avoidance test)	42

3.6.Statistička obrada podataka	43
4.REZULTATI	
4.1. Spoznajne funkcije učenja i pamćenja	45
4.1.2.Test plivanja u labirintu (Morris water maze swimming test)	45
4.2.3. Test pasivnog izbjegavanja elektrošoka (Passive avoidance test)	46
4.2. SDS-PAGE elektroforeza i Western blot	48
4.2.1.Ekspresija inzulin receptora u hipokampusu, parijetalnom korteksu, frontalnom korteksu i hipotalamusu jedan, tri i šest mjeseci nakon STZ-icv primjene	48
4.2.2.Ekspresija protein kinaze B u hipokampusu, parijetalnom korteksu, frontalnom korteksu i hipotalamusu jedan, tri i šest mjeseci nakon STZ-icv primjene	51
4.2.3.Ekspresija ukupnog glikogen sintaze kinaze -3 alfa enzima u hipokampusu, parijetalnom korteksu, frontalnom korteksu i hipotalamusu jedan, tri i šest nakon STZ-icv primjene	53
4.2.4.Ekspresija ukupnog glikogen sintaze kinaze -3 beta enzima u hipokampusu, parijetalnom korteksu, frontalnom korteksu i hipotalamusu jedan, tri i šest nakon STZ-icv primjene	54
4.2.5.Ekspresija fosforiliranog glikogen sintaze kinaze -3 alfa enzima u hipotalamusu, parijetalnom korteksu, frontalnom korteksu i hipotalamusu jedan, tri i šest mjeseci nakon STZ-icv primjene	56
4.2.6.Ekspresija fosforiliranog glikogen sintaze kinaze -3 beta enzima u hipotalamusu, parijetalnom korteksu, frontalnom korteksu, hipotalamusu jedan, tri i šest mjeseci nakon STZ-icv primjene	57
4.2.7.Ekspresija omjera fosforiliranog/ukupnog glikogen sintaze kinaze-3 alfa enzima hipotalamusu, parijetalnom korteksu, frontalnom korteksu i hipotalamusu jedan, tri i šest mjeseci nakon STZ-icv primjene	59
4.2.8.Ekspresija omjera fosforiliranog/ukupnog glikogen sintaze kinaze -3 beta enzima hipotalamusu, parijetalnom korteksu, frontalnom korteksu i hipotalamusu jedan, tri i šest mjeseci nakon STZ-icv primjene	60
4.2.9.Ekspresija tau proteina u hipokampusu, parijetalnom korteksu, frontalnom korteksu i hipotalamusu jedan, tri i šest mjeseci nakon STZ-icv primjene	61
4.2.10.Ekspresija fosforiliranog tau proteina u hipokampusu, parijetalnom korteksu, frontalnom korteksu i hipotalamusu jedan, tri i šest mjeseci nakon STZ-icv primjene	63
4.3. Histologija	66
5.3.1. Imunohistokemija A β 1-42	66
5.3.2. Kongo red bojanje	68
5.RASPRAVA	70
6.ZAKLJUČCI	78

7.SAŽETAK	80
8.SUMMARY	82
9.LITERATURA	84
10.ŽIVOTOPIS	105

Kratice:

Aβ	-amiloid-beta
AD	-Alzheimerova boleť
ADAS-cog	-Alzheimer □s disease assesment scale –cognition
Ach	-acetilkolin
AchE	- acetilkolinesteraze
Akt/PKB	-protein kinaza B
AMPA	- α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolepropionska kiselina
APP	- amiloidi prekursorski protein
ATP	-adenozin-trifosfat
AUC	- air under the curve
CAT	-katalaza
Cdk5	- ciklin ovisna kinaza -5
CDR	-Clinical Dementia Rating
ChAT	- kolin acetiltransferaze
COX-2	- ciklooksigenaza-2
DA	-dopamin
FC	-frontalni korteks
GFAP	- glial fibrillary acidic protein
GLP-1	- glukagonu sliĉan peptid-1
GLUT	-nosaĉ za glukozu
GSK-3α/β	-glikogen sintaza kinaza 3alfa/beta
HPC	-hipokampus
HPT	-hipotalamus
5-HT	-serotonin
icv	-intracerebroventrikularno
IDE	-insulin degrading enzyme
IGF-I	- inzulinu sliĉni ĉimbenik rasta-I
IGF-I	- receptor za inzulinski ĉimbenik rasta
IL-6	-interleukin -6
IL-8	- interleukin -8
IR	-inzulinski receptor
IRS	-inzulin receptor supstrat
LDP	- long term depression
LTP	-long term potentiation
MAPK/ERK	- mitogen associated protein kinase/ extracellular-signal-regulated kinase
MCI	-mild cognitive impairment
MDA	-malonaldehyd
MWM test	- Morris water maze test
NA	-noradrenalin
NAD	-nikotinamid adenin dinukleotid
NIA-AA	- National institute on Aging-Alzheimer's Association
NMDA	- N-metil D-aspartat
NO	- dušikov oksid
PA test	-Passive avoidance test

PC	-parietalni korteks
PHF-1	-tau protein fosforiliran Ser 396/404
PKC	-protein kinaza C
pGSK3α/β	-fosforilirana glikogen sintaza kinaza 3alfa/beta
PI-3K	- fosfatidil-inozitol-3 kinaze
PIP-3	- fosfo- inozitl-3 fosfata
PP2A	-protein fosfataza 2A
PTEN	-fosfatase and tensin homolog
PTPs	-protein tirozin fosfataza
p-tau	-fosforilirani tau protein
ROS	-reaktivnih oksidativnih spojeva
sAD	-sporadična Alzheimerova bolest
SDS-PAGE	- Sodim Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
Shc	-Src homology collagen
SOD	-dismutaza
STZ	-streptozotocin
Tau	-tau protein
TBARS	- kisele tiobarbiturne reaktivne grupe
TNF-α	-tumor necrosis factor α

1.UVOD

1.1. ALZHEIMEROVA BOLEST

Alzheimerova bolest (*Alzheimer's disease* - AD) je neurodegenerativna bolest s definiranim kliničkim i neuropatološkim obilježjima, koja se u današnje vrijeme sve češće pojavljuje među bolestima starije populacije (1). Učestalost AD raste s godinama života, te je u Europi učestalost između 65-69 godine života 1,6 %, a u populaciji starijoj od 90 godina 41% (2). U Sjedinjenim Američkim Državama nađena je učestalost od 13% u osoba \geq 65 godina te 43% nakon 85. godine (3). U Hrvatskoj nema službenog registra oboljelih od Alzheimerove bolesti, no podaci Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo upućuju na evidentan porast stope hospitalizacija zbog Alzheimerove bolesti u razdoblju od 1995. godine (broj hospitalizacija 38) do 2002. godine (broj hospitalizacija 286). Obzirom na to da smo populacijski stara zemlja, realno bi bilo za pretpostaviti da je učestalost u Hrvatskoj slična onoj u Europi (4). Bolest je dobila naziv po njemačkom neurologu dr. Aloizu Alzheimeru koji je njena obilježja detaljno opisao 1907. godine u 51-godišnje bolesnice Auguste D (5). Iako opisana početkom prošlog stoljeća te je o AD do sada prikupljeno puno novih spoznaja, ova bolest i dalje ostaje neriješeni misterij modernog doba.

1.1.1. Patofiziologija AD

Premda je na kliničkoj razini u svih bolesnika dominantan simptom progresivna demencija, a na neuropatološkoj nalaz plakova i neurofibrilarnih snopića, na patofiziološkoj osnovi razlikuju se dvije vrste AD; familijarna AD (manje od 5% svih slučajeva) koja je autosomalni dominantni oblik bolesti s pojavom u ranijoj dobi i sporadična AD (sAD) (95% svih slučajeva) s pojavom u kasnijoj dobi (1,6). U familijarnom tipu AD nalazimo mutacije tri gena: gena za presenilin-2 na kromosomu 1, gena za presenilin-1 na kromosomu 14 ili gena za amiloidi prekursorski protein (APP) na kromosomu 21, koje uzrokuju poremećaje razgradnje APP-a beta i gama sekretazom te nastanak amiloid-beta ($A\beta$) proteina koji se smatra glavnim pokretačem bolesti (Slika 1) (6). S druge strane, etiopatogeneza sporadičnog tipa AD još je nedovoljno poznata (1,6). Postoji više hipoteza o nastanku AD, no prema do nedavno najprihvaćenijoj klasičnoj amiloidnoj hipotezi, etiologija svih oblika AD povezana je s $A\beta$ patologijom kao primarnim događajem koji vremenom dovodi i do drugih neurokemijskih, strukturnih te posebno kognitivnih poremećaja (6).

Amiloidnom je hipotezom lako objasniti nastanak familijarne AD, dok je takva hipoteza teško primjenjiva na sAD uzevši u obzir da gustoća plakova slabo korelira sa stupnjem demencije (7). U razumijevanju etiopatogeneze sAD-a značajnu bi ulogu mogli imati rizični čimbenici

za nastanak ove bolesti. (8,9). Jedan od najznačajnijih rizičnih čimbenika je dob; istraživanja su pokazala da u dobi od 65. do 85. godine prevalencija raste gotovo eksponencijalno (2,3). Slijedeći značajni rizični čimbenici su posjedovanje jednog ili oba alela za apolipoprotein E $\epsilon 4$ (www.molgen.ua.ac.be/ADMutations/default.cfm), zatim pozitivna obiteljska anamneza te u najnovije vrijeme dijabetes tipa II i hipertenzija (10,11,12).

Posljednjih se godina kao jedan od mogućih uzroka sAD-a javlja poremećaj metabolizma glukoze i inzulinske signalizacije u mozgu (13,9). U prilog tome idu PET-sken (pozitronska emisijska tomografija) analize moždanog tkiva u oboljelih od sAD-a uz pomoć koje je nađeno smanjeno iskorištavanje glukoze, koje je koreliralo sa stupnjem demencije (14). Također je nađena smanjena koncentracija inzulina u cerebrospinalnom likvoru u bolesnika oboljelih od sAD-a praćena sa smanjenom gustoćom inzulinskog receptora kao i njegove tirozin kinazne aktivnosti (15,16). Nadalje, istraživanja su pokazala da intranazalna primjena inzulina dovodi do poboljšanja kognitivnih funkcija u oboljelih od sAD-a (17,18)

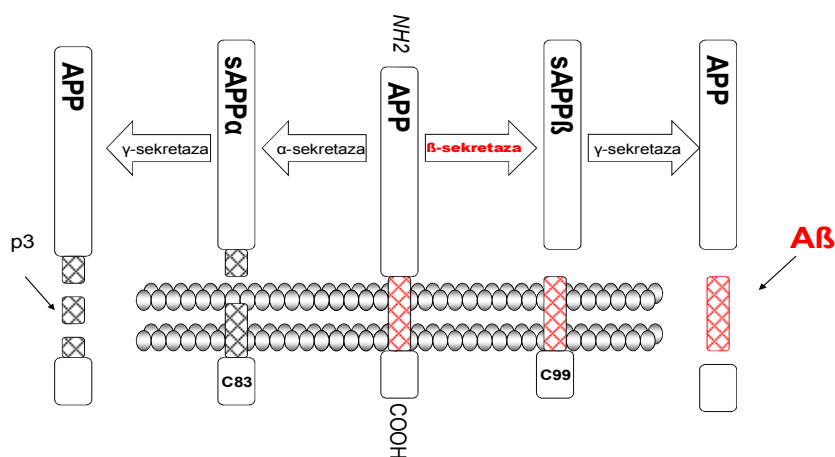
U posljednje vrijeme sve je više neurokemijskih istraživanja postmortalnog tkiva mozga bolesnika oboljelih od sAD-a koji upućuju da inzulin i inzulinski receptori u mozgu igraju važnu ulogu u metabolizmu glukoze, APP-a i nastanku A β , te da su važni u održavanju ravnoteže između fosforiliranog i nefosforiliranog oblika tau proteina (8,9,19).

1.1.2. Histopatološka obilježja AD

S neuropatološkog stanovišta, glavne promjene u AD-u su senilni plakovi, neurofibrilarni snopići i izražena atrofija mozga zbog gubitka neurona i sinapsi (20,21). Neurofibrilarni snopići su unutarstanične nakupine hiperfosforiliranog oblika tau proteina. Tau proteini pripadaju strukturnim mikrotubularnim proteinima koji se u fiziološkim uvjetima vežu za tubulin i stimuliraju nastajanje te stabilizaciju mikrotubula i kontroliraju aksonalni transport (22,23). Međutim u AD-u dolazi do abnormalne hiperfosforilacije tau proteina što uzrokuje stvaranje sparenih uzvojitih filamenata čime se gubi funkcije ovih proteina (23). S druge strane u mozgu oboljelih od AD-a nalazimo izvanstanične nakupine A β peptida koje u konačnom stadiju bolesti formiraju tzv. senilne plakove. Osim što tvori plakove, A β ima i neke druge potencijalne funkcije, te su istraživanja pokazala da ima sposobnost aktivacije kinaza (24), štiti od oksidativnog stresa (25,26), sudjeluje u transportu kolesterola (27,28), djeluje kao transkripcijski čimbenik (29). U mozgu i likvoru nalazimo različite dužine A β peptida od 36-42/43 aminokiseline koji nastaju cijepanje APP-a (30). APP je transmembranski protein kojeg cijepaju tri proteaze, a to su α -, β - i γ -sekretaza. Cijepanjem APP-a s α -sekretazom u konačnici nastaje p3 nepatogeni peptid. A β peptid nastaje kada se

APP prvo cijepa s β -sekretazom pri čemu nastaje veliki topivi N-terminalni segmenti sAPP β , te mali C-terminalni segment C99. Membranski vezani fragment C99 dalje podliježe razgradnji γ -sekretazom, te dolazi do nastajanja neurotoksičnog A β _{1-42/43} (Slika 1) (1,31). A β prvenstveno nastaje u neuronima, a tako nastali A β monomer izlučuje se u izvanstanični prostor odakle može ponovo ući u stanicu (32). Međutim u AD-u dolazi do povećanog nakupljanja A β monomera te njihovog posljedičnog spajanja u oligomere (32). Istraživanja su pokazala da takvi topivi oligomeri unutar stanice i izvan stanice imaju izrazito neurotoksično djelovanje (33,34,35). Postoji više teorija na koji način oligomeri dovode do propadanja neurona no točan mehanizam još nije poznat, (35,36). Topivi oligomeri se spajaju gradeći protofibrile koji tvore fibrile, a fibrili plakove (32,33,30). Iz ljudskih plakova izolirani su prvenstveno dimeri A β _{1-42/43} koji u kulturi neurona u niskim koncentracijama (nmol) imaju izrazito neurotoksično djelovanje (34,30). Ovo otkriće važno je za daljnje istraživanje i traženje nove terapije u smislu inhibitora oligomerizacije (35).

Osim neurofibrilarnih snopića i senilnih plakova u AD-u dolazi do gubitka neurona i sinapsi koji je regionalno specifičan i puno većeg intenziteta u usporedbi s normalnim starenjem (20,21). Najosjetljiviji putevi koji i prvi propadaju u AD-u su perforatni put koji povezuje entorinalni korteks i hipokampus te duge kortiko-kortikalne projekcije. (37). Za razliku od normalnog starenja gdje nalazimo smanjenje veličine i neznatno smanjenje broja neurona, u AD-u nalazimo izraženi gubitak neurona od oko 30% u entorinalnom korteksu i neokorteksu te gubitak sinapsi u neokorteksu od oko 45 % (21). Također je u AD-u nađen gubitak neurona od oko 68% u CA1 regiji hipokampusu (38). Daljna su istraživanja pokazala da gubitak sinapsi dobro korelira s napredovanjem demencije i rezultatima dobivenim kognitivnim testovima, što nije slučaj s amiloidnim plakovima koji se mogu naći i u mozgu osoba bez demencije (39).



Slika 1. Metabolizam APP proteina. Cijepanjem APP-a s α - ili β -sekretazom nastaju *sAPP α* i *sAPP β* (topivi N-terminalni segmenti), te C-terminalni segmenti C83 i C99. Oba membranski vezana fragmenta C83 i C99 dalje podliježu razgradnji γ -sekretazom, te dolazi do nastajanja p3 peptida i A β (neurotoksični A β _{1-42/43}).

1.1.3. Kognitivne promjene u AD-u

Prema novim National institute on Aging-Alzheimer's Association (NIA-AA) kriterijima objavljenim 2011, AD se u grubo dijeli na pretklinički stadije AD, blago kognitivno oštećenje (MCI-mild cognitive impairment) i AD (40,41,42,43). Nove smjernice za dijagnozu **pretkliničke AD** usmjerene su na razdoblje od 10 godina prije pojave prvih kliničkih simptoma i zasnovane su samo na patofiziološkim promjenam u odsutnosti kognitivnih promjena (42). Dijagnoza **MCI-a** se uz patofiziološke promjene postavlja na osnovu kliničke slike vezano uz smanjenje kognitivnih funkcija (pamćenja, učenja, koncentracije, govora, vizualne orijentacije). Bolesnici mogu i dalje samostalno normalno funkcionirati, ali pri tome rade više grešaka no nema znakova demencije (42,43). Kognitivna i bihevioralna oštećenja obuhvaćaju: a) poremećaj pamćenja: nemogućnost pohranjivanaj novih podataka i progresivno propadanje pamćenja iz nedavne prošlosti; b) pogrešne procijene i odluke; c) gubitak prostorne i vremenske orijentacije: nemogućnost prisjećanja koji je dan, mjesec ili godina, nemogućnost pronalaženja puta kući; d) poremećaj govornih funkcija, e) promjene osobnosti, raspoloženja i ponašanj (40,44). Za postavljanje dijagnoze **AD** mora postojati oštećenje od minimalno dva gore navedena kognitivna i bihevioralna područja koja utječu na obavljanje svakodnevnih aktivnosti, anamnestički podatak o progresivnom slabljenju pamćenja, te odsutnost drugih sistemskih poremećaja (40,44). Dijagnoza kognitivnog

oštećenja postavlja se korištenjem jednog ili više psihometrijskih testova: MMSE (mini mental state examination), ADAS-cog (Alzheimer's disease assesment scale –cognition), BDS (Blessed Dementia Scale), CDR (Clinical Dementia Rating), BVRT (Bentov test vidne retencije), BNVFT (Boston naming verbal fluency) (40,41,42,43).

1.1.4. Terapija AD

Terapija AD je simptomatska, te se može podijeliti na farmakološku i nefarmakološku. S obzirom da ne postoji lijek koji liječi AD najidealnije bi bilo kombinirati ove dvije metode (45). Nefarmakološka terapija obuhvaća: stimulacijski orijentiranu (npr. vježbanje, aromaterapija, terapija dodirrom, terapija muzikom, terapija jakim svjetlom), emocionalno orijentiranu (npr. prikazivanje video zapisa članova obitelji), kognitivno orijentiranu (npr. poticanje mentalne aktivnosti koristeći vježbe za mozak), bihevioralno orijentiranu, okolišno orijentiranu terapiju (npr. veće i bolje opremljene sobe, manji broj pacijenata u sobi) (46). Neke su studije pokazale pozitivan učinak nefarmakološkog liječenja na daljne napredovanje AD (46,47)

1.1.4.1. Lijekovi odobreni za liječenje AD

Farmakološka terapija s do sada odobrenim lijekovima obuhvaća: **inhibitore kolinesteraze i antagonist glutamanergičkih N-metil D-aspartat (NMDA) receptora -memantin**. U inhibitore kolinesteraza koji se koriste u terapiji AD spadaju donepezil, rivostigmin, galantamin i takrin (48). Ovi lijekovi inhibirajući razgradnju acetilkolina (Ach) dovode do povećanja njegove razine, međutim ne dovode do poboljšanja nego samo uspravaju napredovanje bolesti (35,49). Takvo stanje relativne stabilnost može trajati par godina, nakon toga zbog daljnog propadanja neurona dolazi do pogoršanja (48,49). Memantin se veže na glutamatne NMDA receptore i inhibira njihovu pretjeranu neurotoksičnu aktivnost (35,48,50). Za liječenje depresije i iritabilnosti mogu se koristiti inhibitori ponovnog unosa serotonina, a za agitaciju i psihoze lijekovi iz skupine atipičnih neuroleptika. Lijekove koje koristimo u terapiji AD ne liječe uzrok bolesti nego samo usporavaju napredovanje bolesti, a pritom izazivaju i neželjene reakcije i jako su skupi (35,48).

1.1.4.2. Lijekovi koji bi mogli imati povoljan učinak mjenjajući tijek AD

U tijeku je veliki broj pretkliničkih i kliničkih istraživanja novih lijekova koji bi mogli mjenjati tijek bolesti, a najviše ih je vezano uz promjene metabolizma A β i fosforilacije tau proteina.

Lijekovi s pretežnim djelovanje na A β metabolizam. Lijekovi s ovim djelovanjem usmjereni su tako da smanjuju stvaranje A β ili tako da potiču razgradnji A β . Istraživanje su

pokazala da inhibitori γ -sekretaze i β sekretaze smanjuju A β u plazmi, a A β imunizacija (pasivna ili aktivan) smanjuje plakove u mozgu (51,52). Međutim niti jedna od ovih terapija ne dovodi do kognitivnog poboljšanja, a ima izražene nuspojave (51,52). Postoje i druge stepenice u metabolizmu A β na koje se može djelovati, a to su inhibicija vezanja γ -sekretaze za APP, povećanje ekspresije α sekretaze ili spriječavanje oligomerizacije A β (53).

Lijekovi s djelovanje na tau protein. U zadnje vrijeme sve je više istraživanja fokusiranih na lijekove koji utječu na metabolizam tau proteina. U ovu skupinu spadaju: inhibitori agregacije tau proteina kao što je metilensko modriko (54), inhibitori tau fosforilacije kao što je litij koji je GSK-3 β inhibitor (55), stabilizatori mikrotubula (56), te lijekovi koji smanjuju ukupni tau proteina kao što je dihidropiridin (57). Povoljan učinak inhibitora agregacije tau proteina, inhibitora fosforilacije tau, te stabilizatora mikrotubula ispituje se u kliničkim istraživanjima dok su lijekovi koji smanjuju ukupni tau protein tek u fazi pretkliničkih istraživanja (55).

1.2. UČENJE I PAMĆENJA

1.2.1. Različiti oblici učenja i pamćenja

Mozak obavlja mnoge komplicirane funkcije, ali jedna od najintragantnijih je mogućnost učenja novih podataka i njihovo pohranjivanje u svjesnom i podsvjesnom pamćenju (58).

Postoje dva kvalitativno različita načina pohrane informacija koji se nazivaju deklarativno i nedeklarativno pamćenje. **Deklarativno pamćenje (eksplicitno)** naučeno je svjesnim naporom i na isti svjesni način ga prizivamo iz sjećanja (58,59). U ovu vrstu memorije spadaju vlastiti životni događaji i uspomene vezane uz njih nazivamo **epizodično pamćenje** (55). Drugi dio eksplicitnog pamćenja u koji pohranjujemo opće znanje o pojmovima i činjenicama nazivamo **semantičko pamćenje** (59). Moždane strukture značajne za deklarativno pamćenje smještene su u medijalnom temporalnom režnju, koji obuhvaća: hipokampus i susjedna mezokortikalna područja, te različite djelove korteksa (58,59). Ova područja prva propadaju u AD-u što i odgovara kliničkoj slici gubitka deklarativnog pamćenja. S druge strane **nedeklarativno (implicitno, proceduralno)** je naučeno podsvjesno, s vremenom smo naučili navike i vještine za koje ne znamo kako smo ih naučili (58,59). Pogledamo li kliničku sliku AD, proceduralno pamćenje propada u zadnjem stadiju bolesti jer su strukture zadužene za proceduralno pamćenje (mali mozak i striatum) očuvane do samog kraja bolesti (58).

Druga podjela pamćenja se odnosi na vremenski slijed kojim koristimo informacije. Postoje tri glavne grupe: **trenutačno** (dio sekunde), **kratkoročno** (radna memorija-sekunde, minute), **dugoročno** pamćenje (dani, mjeseci) (58).

1.2.2 Bazični mehanizmi učenja i pamćenja

Bitna pojava na kojoj se temelji učenje i pamćenje je sinaptička plastičnost. Plastičnost neurona podrazumijeva strukturalne i funkcionalne promjene neurona, što je bitno svojstvo koje ih razlikuje od drugih stanica u organizmu (59,60). Jedan od brojnih mehanizama sinaptičke plastičnosti, koji na kraju svi dovode do trajne promjene učinkovitosti sinapsi, je pojava dugoročne potencijacije (*LTP-long term potentiation*) i dugoročna depresija (*LDP-long term depression*). LTP i LDP najbolje su proučeni u hipokampusu, djelu mozga bitnom za deklarativno pamćenje, te se LTP i LDP smatraju glavnom podlogom eksplicitnog pamćenja i asocijativnog učenja (58,59,60).

1.3. INZULIN I INZULINSKI RECEPTOR U MOZGU

1.3.1. Inzulin

Inzulin je peptidni hormon čije je prisustvo u mozgu dokazano prije gotovo 30 godina, ali su zapravo inzulinski sustav mozga te fiziološka i patofiziološka uloga inzulina još uvijek prilična zagonetka (61,62). Smatra se da je veći dio inzulina u mozgu podrijetlom s periferije. Periferni inzulin se sintetizira u gušterači te krvlju dolazi do krvo-moždane barijere gdje se transportiran u mozak putem regionalno specifično smještenog inzulinskog nosača (63). Inzulinski nosač je protein čiji aktivni transport podliježe saturaciji (63). Brzina prijenosa inzulina putem nosača u mozak nije konstantna nego se mijenja ovisno o potrebama organizma, a nađeno je njeno smanjenje u AD (63). S druge strane, male količine inzulina mogu se sintetizirati i u mozgu (64). Ekspresija gena za inzulin u mozgu je regionalno specifična, prisutna u većoj mjeri u piramidalnim stanicama hipokampusa, stanicama prefrontalnog, entorinalnog i peririnalnog korteksa, talamusa, granularnog sloja olfaktornog bulbusa i stanicama hipotalamusa (64). Za razliku od neurona, u glija stanicama nije nađena sinteza inzulina (64) Inzulin se sintetizira u obliku proinzulina u endoplazmatskom retikulumu, zatim prolazi kroz Golgijevo tjelešce i na kraju se pohranjuje u vezikule. Proinzulin je građen je od C-peptida i inzulina. Inzulin je građen od A-lanca s 21 aminokiselinom i B-lanca s 30 aminokiselina koji su međusobno povezani s disulfidnim vezama. Odvajanje C-peptida od inzulina se vrši pomoću proteaza koje se nalaze u

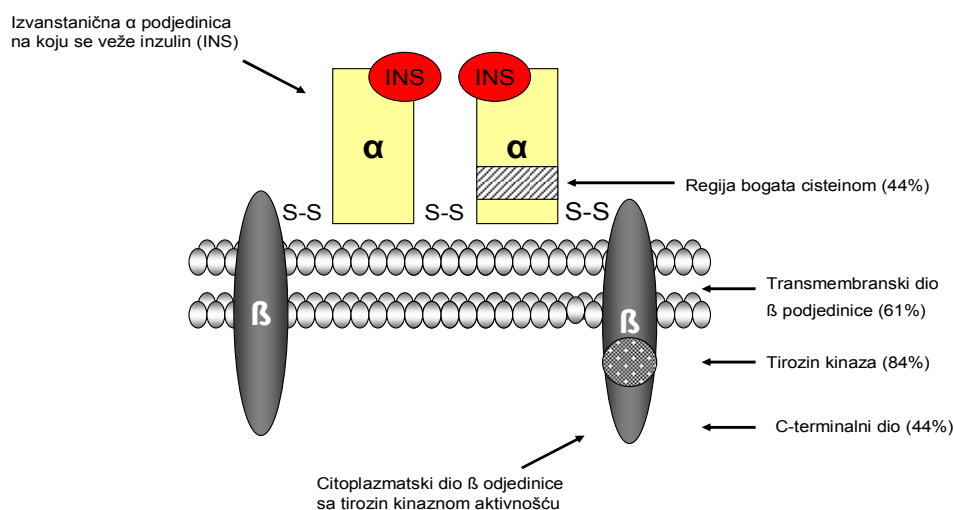
vezikulama. Za razliku od periferije u mozgu je nađeno da se veći dio sintetiziranog inzulina odmah izlučuje, a samo se vrlo mali dio pohranjuje u vezikule (64).

1.3.2. Inzulinski receptor

U mozgu se inzulin kao i na periferiji veže na inzulinske receptore (IR) čija je rasprostranjenost u mozgu regionalno specifična i slijedi uzorak rasprostranjenosti inzulina, čija je ekspresija nađena u piramidalnim stanicama hipokampusa, stanicama prefrontalnog, entorinalnog i peririnalnog korteksa, talamusa, granularnog sloja olfaktornog bulbusa i stanicama hipotalamusa (64,19). Najveće koncentracije IR u mozgu nađene su u olfaktornom bulbusu, hipotalamusu, cerebralnom korteksu, cerebelumu i hipokampusu (19). Unutar mozga IR se nalaze u neuronima, ali i u glija stanicama, za razliku od samog inzulina čija je mRNA i sinteza nađena samo u neuronima (64,65) IR je heterotetramerni protein građen od 2 α i 2 β podjedinice koje su međusobno povezane disulfidnim vezama (Slika 2). IR u središnjem živčanom sustavu se po građi razlikuje od perifernog IR po veličini α i β podjedinice, a funkcionalno po tome što središnji IR ne podliježe negativnoj regulaciji od strane inzulina (66,67). Periferni IR ima malo veću α podjedinicu $M_r \approx 125$ kDa, dok je veličina središnje α podjedinice nešto manja i iznosi $M_r \approx 115$ kDa. Također je i β podjedinica perifernog IR nešto veća $M_r \approx 90$ kDa u usporedbi s centralnom β podjedinicom $M_r \approx 83$ kDa (66). IR pripada skupini tirozin-kinaznih receptora (65,67,68). Na α podjedinici, koja je izvanstanični dio receptora, nalazi se vezno mjesto inzulina (67,68)(Slika 2). Kapacitet vezanja inzulina na IR iznosi 1.1-1.5 mol inzulina/mol receptora (68). Većim dijelom α podjedinica je hidrofилna s po kojim hidrofobnim dijelom (68). Tirozin kinazna aktivnost IR vezana je uz β podjedinicu i V_{max} kinazne aktivnosti iznosi 80 mmol/min/mg supstrata (68). β podjedinica može se podijeliti na tri dijela (Slika 2). Središnji transmembranski dio β podjedinice sadrži slijed od 23-26 hidrofobnih aminokiselina i djeli β podjedinicu; na kraći izvanstanični dio koji je disulfidnim vezama vezan na α podjedinicu i duži citoplazmatski dio s tirozin kinaznom aktivnošću (68) (Slika 2). Na citoplazmatskom dijelu β podjedinice nalazi se vezno mjesto za ATP, koji je glavni izvor fosfata potrebnih za autofosforilaciju β podjedinice i fosforilaciju inzulina receptor supstrata (IRS) (69,70,71). Tirozin kinazni dio β podjedinice sastoji se od katalitičke i aktivacijske petlje (70,71). Aktivacijska petlja sadrži tri tirozinska ostatka 1158, 1162 i 1163 koja podliježu autofosforilaciji nakon vezanja inzulina i ATP-a na receptor. Katalitička petlja zapravo je kinaza koja vrši fosforilaciju supstrata. Hidroksilna grupa nefosforiliranog tirozinskog ostatka 1162 vodikovim je vezama vezana za Asp 1132 i Arg 1136 ostatke unutar katalitičke petlje. Tako vezan tirozinski ostatak 1162 blokira aktivni dio

kinaze djelujući kao autoinhibitor (70,71). Vezanjem inzulina na IR dolazi do konformacijske promjene receptora, što omogućava vezanje ATP za β podjedinicu. Zatim slijedi ukrižena autofosforilacija tirozinskih ostataka 1158, 1163 i 1162. Tako fosforilirana aktivacijska petlja stabilizirana je u novu konformaciju koja pomiče tirozinski ostatak 1162 s aktivnog dijela katalitičke petlje omogućavajući vezanje IRS za β podjedinicu IR. (70,71,72) Osim autofosforilacije ova tri tirozinska ostatka, dolazi do fosforilacije jukstamembranskog tirozinskog ostatka 972 koji je važan za stabilizaciju veze između β podjedinice i IR supstrata (69). Autofosforilacija tirozinskih ostataka 1328 i 1334 na C terminalnom kraju β podjedinice važna je za mitogenu aktivnost inzulina/IR signalnog puta (69,70).

Osim na IR, inzulin se može vezati i na receptor za inzulinski čimbenik rasta (IGF-IR) s afinitetom koji je puno manji od afiniteta inzulinu sličnog čimbenika rasta-I (IGF-I) ($K_D(\text{IGF-I})=1\text{nM}$, $K_D(\text{inzulina})=100\text{ nM}$) (68,73). U mozgu odraslog čovjeka mRNA IGF-IR nađena je u koroidnom pleksusu, cirkumventrikularnom području, gornjim olivarnim jezgrama te u piramidnim i granularnim neuronima korteksa (74) IGF-IR također je tirozin kinazni receptor, građen od dvije α podjedinice i dvije β podjedinice, koje su u nekim djelovima slične IR podjedinicama (73,75).



Slika 2. Prikaz grade inzulinskog receptora (IR). Postocima je izražena sličnost IR sa IGF-IR. *INS*-inzulin, *S-S*- disulfidna veza.

1.3.3. Inzulin/IR signalni put

Da bi inzulin djelovao unutar stanice mora se vezati na IR. Na periferiji se inzulin veže na IR visokim afinitetom ($K_D \sim 1.0$ nM) (68). Međutim otkriveno je da se afinitet vezanja inzulina na periferiji mijenja sa zasićenošću IR, što je više receptora zauzeto inzulinom to je afinitet vezanja manji i obrnuto, afinitet vezanja inzulina raste kako pada zauzetost IR (68). Molekularni mehanizam promjene afiniteta nije poznat, ali se pretpostavlja da razlog te promjene leži u promjeni konformacije samog IR (76). Takva negativna sprema vezanja inzulina-zasićenost IR nije nađena u mozgu (77). Vezanje inzulina za IR je ireverzibilno nakon čega dolazi do endocitoze inzulin/IR kompleksa (68). Nakon endocitoze slijedi razgradnja inzulina, a IR se reciklira i vraća natrag na membranu ili se i on razgrađuje u lizosomima (78,79).

Inzulin/IR signalni put započinje vezanjem inzulina na α -podjedinicu IR što uzrokuje autofosforilaciju unutarstaničnih β -podjedinica te posljedično aktivaciju tirozin kinaze (Slika 3) (69). Supstrati koji se vežu za aktivirani IR su IRS proteini, Shc (*Src homology collagen*) i APS (adaptor protein sa SH2 (*Src Homology 2*) skupinom) (72). Skupina IRS proteina sastoji se od četiri međusobno slična proteina (IRS 1-4) te novo otkriveni IRS5/DOK4 i IRS6/DOK5 (69,80). Različite su studije pokazale da sva četiri IRS proteina imaju određenu ulogu u daljnjem prijenosu inzulinskog signala, ali je IRS-1 taj koji je važan za daljni prijenos signala uključenih u regulaciju metabolizma glukoze te procesa učenja i pamćenja (69). Vezanjem IRS-1 za aktiviranu β -podjedinicu IR dolazi do fosforilacije njegovih tirozinskih ostataka čime je omogućeno vezanje različitih staničnih proteina bogatih SH2 skupinama na IRS-1. Dalje slijedi aktivacija načelno dviju glavnih signalnih puteva, jednog, vezanog uz aktivaciju fosfatidil-inozitol-3 kinaze (PI-3K) (koji je predmet ovog istraživanja) i drugog, vezanog uz aktivaciju Sch/Grb 2 (*Growth factor receptor-bound protein-2*)/MAP/ERK-kinaza sustava (*mitogen associated protein kinaze/extracellular-signal-regulated kinases*) (72,80). Aktivacija MAP-kinaznog sustava vezana je uz stanični rast i regulaciju sinteze proteina i nije predmet ovog istraživanja.

Citoplazmatski enzim PI-3K je heterodimerni protein građen od regulatorne (50-85 kDa) i katalitičke (110 kDa) podjedinice (69,80,81). Regulatorna podjedinica bogata je SH2 skupinama te omogućuje vezanje PI-3K za fosforilirani IRS-1 protein (80,81). PI-3K se aktivira vezanjem za IRS-1 te fosforilira inozitolski prsten fosfoinozitola na D3 poziciji što dovodi do stvaranja PI-3 fosfata (PIP-3) (69,80,81). Na PIP-3 vežu se različite serin/treonin kinaze (protein kinaza B (Akt/PKB), protein kinaza C (PKC), fosfatidil inozitol-ovisna protein kinaza PDK-1 i dr.) te tirozin kinaze (Src, Burtonova tirozin kinaza Btk) (69,81). Od

PIP-3 ovisnih serin/treonin kinaza za regulaciju metabolizma glukoze najznačajnija je Akt/PKB (81,82). Akt/PKB se veže PH (*Pleckstrin homology*) skupinom na PIP-3 te biva fosforilirana na Thr308 poziciji od strane PDK-1 i Ser 473 od strane mTORC2 (*mammalian target of rapamycin*) (80,81,82). Tako aktivirana Akt/PKB dalje fosforilira različite proteine: FOXO (*forkhead box O*), proto-onkogeni protein WNT-1, GSK-3 (glikogen sintaza kinazu 3), TSC-2 (*tuberoses complex 2*), PRAS40 (prolinom bogati Akt supstrat 40kD) koji su uključeni u regulaciju stanične proliferacije, migracije i preživljenja (81,82). Međutim jedna od najvažnijih uloga Akt/PKB je da sudjeluje u regulaciji staničnog metabolizma potičući ulazak glukoze u stanicu (82). Nakon što inzulin aktivira Akt/PKB dolazi do mobilizacije nosača za glukozu 4 (Glut4) na staničnu membranu. Mehanizam kojim Akt/PKB potiče mobilizaciju Glut4 još uvijek je relativno nejasan (82). Pretpostavlja se da Akt/PKB fosforilira protein AS160 (*TBC1 domain family member 4*) i tako inhibira njegovu gvanozin trifosftaznu aktivnost (GTP) omogućavajući aktivaciju Rab GTP-aze i translokaciju Glut4 na površinu membrane (82). Za razliku od Glut4, Glut1 ekspresija nosača za glukozu na membrani regulirana je genskom ekspresijom. Istraživanja su pokazala da Akt/PKB preko TSC-2 i PRAS40 potiče ekspresiju gena za Glut1, te na taj način povećava njegovu ekspresiju na membrani (82).

Od svih proteina koje Akt/PKB fosforilira za ovo istraživanje posebno je važan GSK-3. GSK-3 je višefunkcionalna serin/treonin kinaza koja se pojavljuje u dvije izoforme GSK-3 α i GSK-3 β (83,84). Iako dva različita gena kodiraju ove dvije GSK-3 izoforme, one pokazuju veliku sličnost od 98% u kinaznom dijelu (83). Regulacija GSK-3 kinaze vrlo je složena. GSK-3 posjeduje bazalnu aktivnost koja je uvjetovana fosforilacijom na Tyr 216 za GSK-3 β ili Tyr 279 za GSK-3 α (83,84). Kinaza koja vrši fosforilaciju na tim mjestima je nepoznata. Tako aktivirani GSK-3 ima 100-1000 puta veći afinitete za supstrate koji su prethodno fosforilirani (pre-fosforilirani) (83). Akt/PKB fosforilira GSK-3 α na Ser21 ili GSK-3 β na Ser9 ostatku i tako inhibira njihovu aktivnost (83,84). Zanimljivo je da dovoljna količina pre-fosforiliranog supstrata može nadvladati inhibiranost GSK-3 od strane Akt/PKB (83). Suprotno učinku Akt/PKB, protein fosfataza 2A (PP2A) izravno defosforilira GSK-3 α/β na Ser 21/9 ostatku te ih tako ponovo aktivira (83,84). Vezano uz hipotezu o značaju moždanog inzulina u patofiziologiji sAD, značajna je spoznaja da GSK-3 α izoforma između ostalog sudjeluje u metabolizmu A β proteina, dok GSK-3 β izoforma između ostalog regulira fosforilaciju tau proteina (85-88). U normalnim uvjetima fosforilacija tau proteina je u homeostazi zahvaljujući antagonizmu kinaza (GSK-3 β , ciklin ovisna kinaza -5 (Cdk5), extracellular signal-related kinase-1 and -2, MAP kinaze, p38 kinaza, c-jun N-terminal kinaze) i fosfataza

(protein fosfataza 2A (PP2A), kalcineurin). Međutim, u sAD-u nalazimo povećanu fosforilaciju tau proteina na Ser202/Thr205 (AT8), Ser214/212 (AT100), Thr235 (TG3), Ser396/404 (PHF-1) (89,90,91). Tako hiperfosforilirani tau protein (p-tau) ne može više vršiti svoju funkciju te dolazi do destabilizacije mikrotubula i stvarane neurofibrilnih snopića (89,90). Glavni enzim koji fosforilira tau protein na mjestima karakterističnim za AD su GSK-3 β i Cdk5 kinaze, osim toga Cdk5 može prefosforilirati tau protein čineći ga primamljivijim supstratom za GSK-3 β (89,90,91). Nasuprot ovim kinazama nalazi se PP2A koja vrši defosforilaciju p-tau, održavajući tako fosforilaciju/defosforilaciju tau proteina u homeostazi (89,90). Fosforilirana GSK-3 α sudjeluje u metabolizmu A β tako što pogoduje nastajanju amiloidnih plakova (87). Točan mehanizam ovog učinka nije poznat, ali kada se GSK-3 inhibira s litijem dolazi do povećanog nastajanja A β (87). Takvo povećanje nastajanja A β povezano je s povećanom aktivnosti γ -sekretaze, pa se pretpostavlja da GSK-3 α aktivira γ -sekretaze potičući pri tome amiloidni put razgradnje APP (87,88). Na drugoj strani vage nalazi se enzim koji razgrađuje inzulin (*IDE-insulin degrading enzyme*) koji također razgrađuje i A β te je važan za održavanje homeostaze A β metabolizma (90). IDE je cink metaloproteinaza koju inzulin aktivira preko IP-3K/Akt puta dok A β inaktivira IDE tako što tvori s IDE ireverzibilni kompleks i kada ovaj nije aktivan (90).

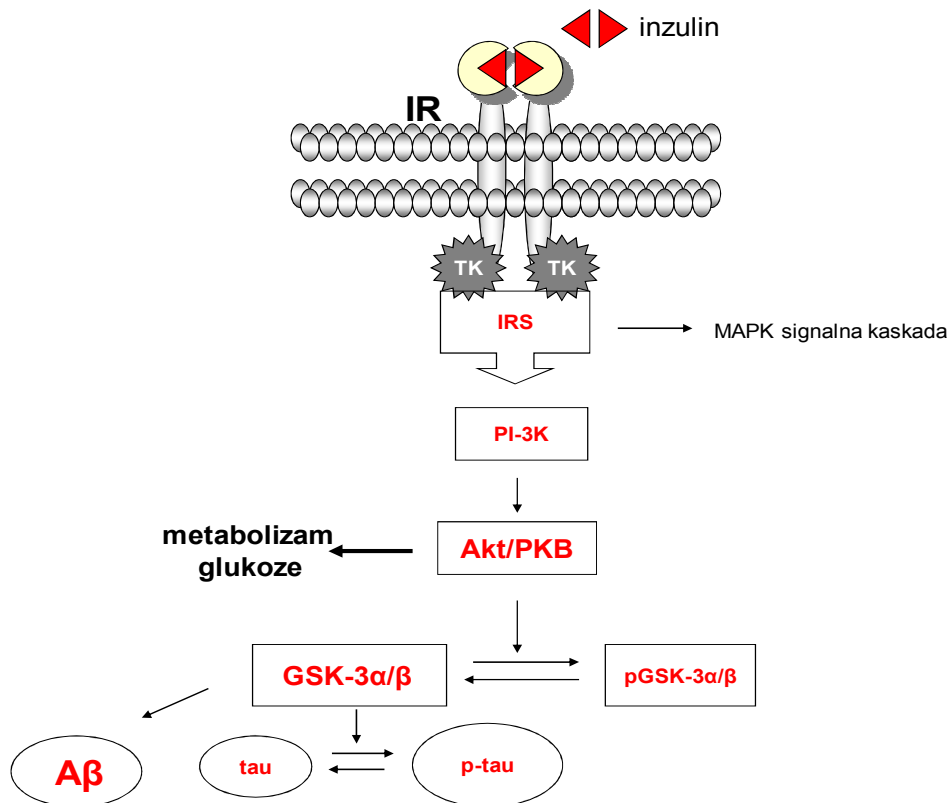
Inzulinski sustav, dakle, igra važnu ulogu u regulaciji metabolizma dvaju etiološki najvažnijih proteina, tau i A β , vezanih uz patofiziologiju sAD.

Regulacija inzulin/IR signalnog puta u mozgu

IR/inzulinski sustav podliježe regulaciji na više načina. U perifernom tkivu opće prihvaćeni način je smanjenje IR kao posljedica fiziološkog učinka samog inzulina (92). No, u mozgu IR ne podliježe ovakvoj negativnoj regulaciji od strane inzulina. U mozgu je nađeno da razgradnju cijele molekule inzulina vrši **IDE**, o čijoj se regulaciji aktivnosti malo zna (93). Istraživanja su pokazala da sam inzulin utječe pozitivno na aktivaciju IDE preko IR/IPK-3 puta (94), međutim i druge tvari utječu na IDE. Jedna od tih tvari je ATP koji može povećati aktivnost IDE za 300%, pa se pretpostavlja da bi kod manjka ATP došlo do pada aktivnosti IDE (93). S druge strane se nalaze tvari i procesi koji inhibiraju IDE najvjerojatnije tako što potiču njegov prijelaz u zatvorenu konformaciju, a to su slobodne masne kiseline, oksidativni stres i endogeni peptidni inhibitori (ubikvitin) (93). Osim na količinu inzulina može se utjecati i na aktivnost IR. Da bi se aktivirala tirozin kinazna aktivnost, IR se prvo mora autofosforilirati (72). Na autofosforilaciju IR može se utjecati tako da se spriječi sama autofosforilacija ili da se defosforilira već autofosforilirani IR (72). Izravni blokator

autofosforilacije IR na periferiji je **PC-1** (*Plasma cell membrane glycoprotein 1*)(72,93). Nađeno je da se PC-1 veže na dio IR od 485-599 aminokiseline, te tako sprečava konformacijsku promjenu β -podjedinice nakon vezanja inzulina za IR (72,94). Bez konformacijske promjene β -podjedinice ne dolazi do autofosforilacije te se time razvija inzulinska rezistencija (72,94). U hipokampusu je nađena najjača ekspresija PC-1 pa je za pretpostaviti da ima sličnu ulogu i u mozgu (95). Defosforilaciju IR vrše **protein tirozin fosfataze (PTPs)** te tako dovode do inhibicije kinazne aktivnosti IR. PTP-1B je fosfataza koja se specifično veže uz defosforilaciju IR (72,96). PTP-1B se veže za IR ukoliko su fosforilirani tirozinski ostatci 1158, 1162, 1163 β -podjedinice IR (72,97). Nakon vezanja PTP-1B za IR dolazi do defosforilacije kinaznog dijela β -podjedinice IR što dovodi do inaktivacije IR (72,97). S druge strane lipidna i proteinska tirozin fosfataza (PTEN-*Phosphatase and tensin homolog*) koja na periferiji inaktivira inzulinsku signalizaciju u mozgu je potiče, a pretpostavlja se da to radi na način da inhibira inhibirajuće djelovanje ERK (MAP-kinaza) na inzulinsku signalizaciju (98) Osim fosfataza i **serin/treonin kinaze** utječu na inzulinsku signalizaciju (98) Osim fosfataza i **serin/treonin kinaze** utječu na inzulinsku signalizaciju (72,99). Protein kinaza C (PKC) fosforilira veći broj serinskih i treoninskih ostataka na IR te tako inhibira njegovu kinaznu aktivnost (72,80,99). Osim PKC inzulinsku rezistenciju mogu izazvati TNF- α (*tumor necrosis factor α*) fosforilacijom IRS-1 na serinskom ostatku 307 i interleukin -6 (IL-6) koji fosforilira IRS-1 na serinskom ostatku 318 (80,72). Tako fosforilirani IRS-1 ne može se vezati za IR te dolazi do smanjene aktivacije inzulinske signalnog puta (80,72). **GSK-3** je konstitutivno aktivna serin/treonin kinaza koja fosforilira IRS-1 na serinskim ostacima te inhibira njegovo vezanje za IR i posljedično desenzitizaciju IR, također je nađeno da GSK-3 β fosforilira PS-1 koji zatim inhibira ekspresiju IR (72,100,101). Oksidacijski stres dovodi do stvaranja **H₂O₂** radikala koji mogu dovesti do inzulinske rezistencije (102). Istraživanja su pokazala da povećane količine H₂O₂ dovodi do smanjenja tirozinske fosforilacije IR kao i IRS-1 supstrata. Također je nađeno da H₂O₂ potiče aktivaciju PKC te i na taj način pogoduje razvoju inzulinske rezistencije (102). Na povećano stvaranje H₂O₂ utječe TNF- α te tako na neizravni način dovodi do inhibicije IR/inzulinske kaskade (102). Toksična razina glukoze dovodi do **O-glikolizacija** IR što uzrokuje smanjeno vezanje IRS-1 za IR i time desenzitizacije IR (72,80),. Također veliki utjecaj na funkciju IR imaju **glukokortikoidi** (GC). Istraživanja su pokazala da GC djeluje na dvije razine, s jedne strane smanjuje sintezu IR (103), dok s druge strane mijenja strukturu IR dovodeći do inhibicije autofosforilacije tirozinskog dijela i time desenzitizacije IR-a (slika 5) (104). Uz glukokortikoide i **kateholamini** dovode do desenzitizacije IR-a, tako što aktiviraju cAMP kinazu koja zatim fosforilira serin/treoninski dio receptora (slika 5) (105).

Regulacija IR/inzulin signalnog puta vrlo je složen proces koji se odvija na više razina. Da bi se održala normalna funkcija IR/inzulin signalnog puta vrlo je važno da sve ove tvari djeluju zajedno u homeostazi jer ako dođe do poremećaja u funkciji nekih od gore navedenih tvari može doći do razvoja inzulinske rezistencije.



Slika 3. Inzulinska signalna kaskada. Vezanjem inzulina za α -podjedinicu **IR** (inzulin receptor) dovodi do autofosforilacije unutarstaničnih β -podjedinica aktivacije tirozin kinaze te zatim posredstvom **IRS** (proteina inzulini receptor supstrata) do aktivacije **PI-3K** (fosfatidil-inozitol-3 kinaze) i **MAPK** (mitogen associated protein - MAP) signalne kaskade. **PI-3K** fosforilira i time aktivira **Akt/PKB** (protein kinazu B). Zatim aktivirana **Akt/PKB** fosforilira **GSK-3** (glikogen sintaza kinazu 3) i time ju inaktivira. Nefosforilirane izoforme **GSK-3 α** i **GSK-3 β** su aktivne i sudjeluju u metabolizmu **A β** proteina i regulaciji fosforilacije tau proteina.

1.3.4. Fiziološki učinci inzulina/IR u mozgu

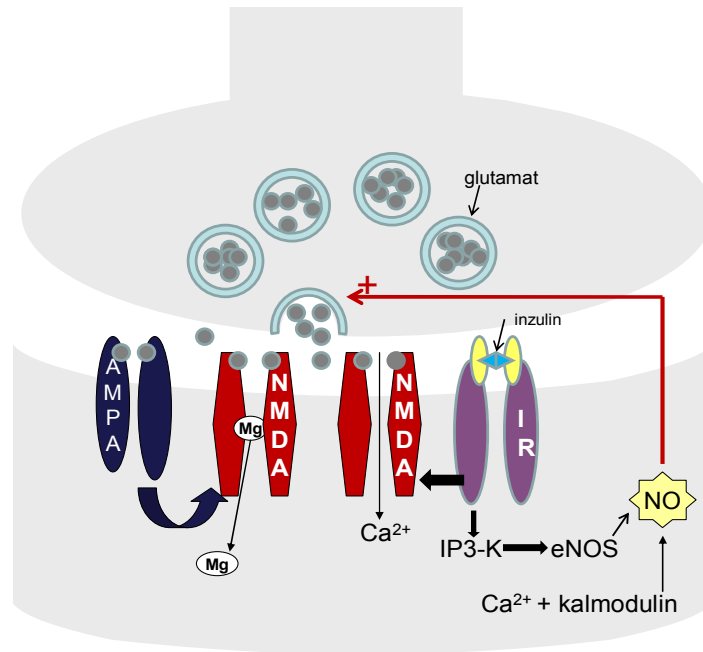
Pokazalo se da inzulin u mozgu ima višestruku ulogu, između ostalog u regulaciji energetske homeostaze te također u regulaciji kognitivnih funkcija, učenja i pamćenja (106,62).

Glukoza kao glavni izvor energije u mozgu prolazi krvnomoždanu barijeru uz pomoć inzulina neovisnog GLUT-1 nosača, koji se nalazi na endotelnim stanicama krvo-moždane barijere (107,108). U većinu neurona glukoza ulazi preko također inzulina neovisnog GLUT-3 nosača (107,108). Međutim, brze promjene u metabolizmu glukoze odvijaju se preko inzulina ovisnog GLUT-4 nosača (109). Značajno je da je ekspresija gena za GLUT-4 nosač nađena u hipotalamusu, korteksu i hipokampusu te da pokazuje sličnu distribuciju kao i ekspresija gena za inzulina i IR (107,108). Istraživanja su pokazala da pri povećanoj potrebi za glukozom, što se događa u procesu učenja i pamćenja, inzulina potiče premještanje unutarstaničnog GLUT-4 nosača na membranu neurona hipokampusa (110). GLUT-8 je novije otkriven nosač glukoze ovisan o inzulinu koji se nalazi u tijelu i proksimalnim dendritima neurona hipokampusa te se također smatra važnim za metabolizam glukoze pri povećanoj potrebi za energijom (107). U bazalnim uvjetima nosač je smješten u citoplazmi i endoplazmatskom retikulumu neurona, a pri povećanoj energetske potrebi neurona inzulina potiče njegov premještanje na endoplazmatski retikulum (107). S druge strane, GLUT-2 nosač najvažniji je nosač za metabolizam glukoze na periferiji, dok je u mozgu slabo istražen (107,108). Imunohistokemijska istraživanja su pokazala da se GLUT-2 nosač nalazi u hipokampusu, temporalnom i peririnealnom korteksu, amigdali, talamusu i jako puno u hipotalamusu (107,108). GLUT-2 nosač se nalazi u neuronima i glija stanicama s najjačom gustoćom u području sinapsi što upućuje na njegovu važnost prilikom otpuštanja neurotransmitera (107,108). Pretpostavlja se da je GLUT-2 nosač uključen u regulaciju metabolizma glukoze i lučenja inzulina u mozgu, slično kao i na periferiji u β stanicama, jer je njegova ekspresija nađena na tzv. neuronima osjetljivim na glukozu (111). Neuronima osjetljivim na glukozu su fenotipski slični β stanicama pankreasa te na površini uz GLUT-2 nosač imaju receptore za sulfonilureju, ATP osjetljivi kalijev kanal, također je u tim neuronima nađena i ekspresija glukokinaze (111,108). U prilog ovoj pretpostavci ide otkriće da je otpuštanje inzulina iz sinaptosoma potaknuto glukozom (112). Inzulina/IR aktivacijom IP-3K/Akt signalnog puta potiče **metabolizam glukoze**, a preko heksozamina metaboličkog puta glukoze dolazi do nastajanja UDP-N-acetilglukozamina (UDP-GlcNAc) (113). UDP-GlcNAc dalje služi kao supstrat za enzim N-acetilglukozaminil transferaze (OGT) u procesu O-glikozilacije proteina. O-glikozilaciju proteina je ključna za degradaciju nekih proteina, za međusobnu interakciju proteina te igra važnu ulogu u transkripciji proteina te njihovoj lokalizaciji u stanici (113). O-glikozilaciju proteina se vrši na serin/treonin ostacima proteina te se na taj način natječe s procesom fosforilacije proteina (113). Smanjen ulazak glukoze u stanicu zbog inzulinske rezistencije, te posljedično smanjenog metabolizma glukoze dovodi do smanjenja O-glikozilacije proteina čime se otvara

mjesto za povećanu fosforilaciju proteina (113). Glukoza također u stanici podliježe glikolizi pri čemu nastaje piruvat iz kojeg zatim oksidativnom dekarboksilacijom nastaje Acetil-CoA. Acetil-CoA je neophodan za sintezu neurotransmitera acetilkolina koji je važan u procesu učenja i pamćenja. (114). Osim što je važan za sintezu acetilkolina, Acetil-CoA ulazi u ciklus limunske kiseline pri čemu nastaje energetski najbogatiji metabolit glukoze adenzin trifosfat (ATP). ATP je izvor energije u nizu staničnih procesa kao što je transport i razgradnja proteina (115) kao i metabolizmu APP i tau proteina (116,117). Po ovome se da naslutiti da bi nedostatak glukoze doveo do drastičnog pada ATP-a u stanici tj. do manjka energije. Radi nedostatka glukoze, kao supstrat za stvaranje ATP-a se koriste membranski lipidi, pri čemu dolazi do stvaranje slobodnih masnih kiselina kao izvora energije (118). Međutim prilikom metabolizma masnih kiselina dolazi do stvaranja reaktivnih oksidativnih spojeva (ROS). Povećano stvaranje ROS dovodi do oksidativnog stresa, koji nastaje jer je došlo do poremećaja ravnoteže između oksidansa i antioksidansa. ROS oštećuju DNA, proteine i lipide te na kraju može dovesti do degeneracije i smrti neurona (118).

Već sama lokalizacija inzulina u korteksu i hipokampusu upućuje na njegovu važnost u **regulaciji kognitivnih funkcija**. To je i potvrđeno *in vivo* istraživanjem gdje je interhipokampalna mikroinjekcija inzulina dovela do poboljšanja kognitivnih funkcija (119,62). Iako točan mehanizam kojim inzulin utječe na kognitivne funkcije nije poznat, u literaturi se navodi nekoliko mogućih mehanizama (120,67,62). Jedan se temelji na utjecaju inzulina na metabolizam glukoze, a drugi su vezani na utjecaj inzulina na neurotransmisiju (120,115,67,62). Obzirom da u hipokampusu postoji kolokalizacija inzulina, IR i o inzulinu ovisnog GLUT2 nosača, a glukoza je neophodan izvor energije u procesu učenja i pamćenja, manjak inzulina bi doveo do manjka energije i poremećaja u procesu učenja i pamćenja (108,115,120). S druge strane, novija istraživanja upućuju na važnost inzulina u modulaciji sinaptičke plastičnosti prilikom učenja i pamćenja djelujući na NMDA i AMPA glutamatne receptore (slika 4) (62,67). Vežući se na svoje receptore u hipokampusu inzulin potiče aktivnost glutamatnih NMDA receptora. Istraživanja su pokazala da inzulin regulira NMDA receptore na dva načina; tako što potiče njihovu ekspresiju na staničnoj membrani, te tako što povećava fosforiliranost NR2A i 2B podjedinice NMDA receptora (120,121). Oba mehanizma na kraju dovode do pojačane aktivnosti NMDA receptora što uzrokuje pojačani utok Ca^{2+} iona potičući nastanak LTP-a (120,67). Inzulin također uječe i na ekspresiju AMPA receptore na staničnoj membrani (67). Uz izravno djelovanje na same glutamatne receptore, inzulin preko inozitol-3-kinaznog puta aktivira endotelnu sintazu dušikovog oksida (eNOS) povećavajući koncentraciju NO i time indirektno presinaptičku egzocitozu glutamata

povećavajući vjerojatnost nastanka LTP-a (Slika 3.) (122). Sve ovo upućuju da je normalna IR/inzulin signalizacija važna za normalno odvijanje procesa učenja i pamćenja.



Slika 4. Nastanak dugotrajne potencijacije u hipokampusu. Aktivacijom glutamatnih AMPA (α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolepropionska kiselina) receptori koji dovode do djelomične depolarizacije postsinaptičke membrane dolazi do iskakanja Mg^{2+} iona iz kanala NMDA (N-methyl D-aspartate) -receptora, tako otvoreni kanali NMDA-receptora na kojima je vezan glutamat sada propuštaju Ca^{2+} ione. NO (dušikov oksid) ima ulogu retrogradnog glasnika koji u presinaptičkom aksonu potiče egzocitozu glutamata, a njegovu sintezu u postsinaptičkom neuronu potiče Ca^{2+} kalmodulin kompleks. Inzulin vežući se na IR (inzulinski receptor) u hipokampusu potiče aktivnost glutamatnih NMDA receptora te tako pojačava utok Ca^{2+} iona. Također inzulin preko IP3-K (inozitol-3-kinaznog) puta aktivira eNOS (endotelnu sintazu dušikovog oksida) povećavajući koncentraciju NO i time indirektno presinaptičku egzocitozu glutamata povećavajući vjerojatnost nastanka LTP-a

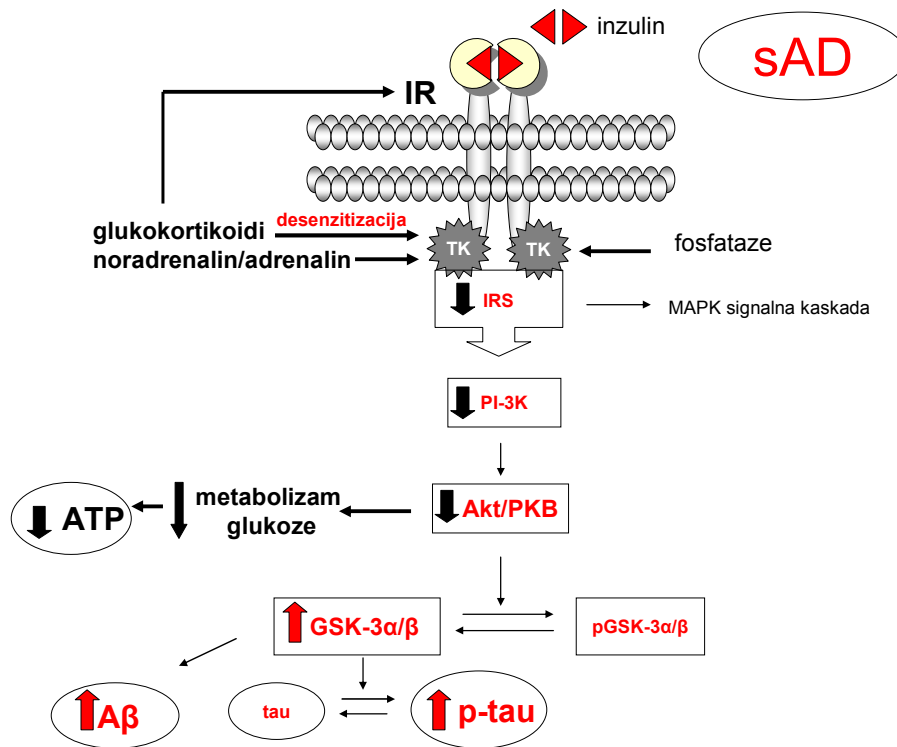
1.3.3 Inzulin/IR signalni put u mozgu u Alzheimerovoj bolesti

Sve veći broj studija povezuje hipoenergozu i poremećaj inzulina/IR u mozgu s razvojem demencije u oboljelih od sAD (9,13,14,61,67,105,115,123,124,125). Inzulinska rezistencija u mozgu može se razviti na razini receptora ili na postreceptornoj razini što u oba slučaja dovodi do poremećaja inzulin/IR signalne kaskade (124,125). Dosadašnjim istraživanjima na postmortalnom moždanom tkivu bolesnika oboljelih od sAD-a (Braak stadij V-VI) nađena je

smanjenjena ekspresija mRNA inzulina i mRNA IR u hipokampusu (HPC) i hipotalamusu (HPT) te frontalnom korteksu (FC) gdje je smanjenje ekspresija progrediralo s napredovanjem bolesti, pa je u Braak stadiju VI nađeno 80% smanjenje mRNA IR i 85% smanjenje mRNA inzulina (126, 127). Također je nađeno smanjenje tirozin kinazne aktivnosti inzulinskog receptora u FC-u, HPT-u i HPC-u i smanjeno specifično vezanje inzulina za IR u FC-u (19,127,128). U cerebrospinalnom likvoru nađena je smanjena koncentracija inzulina praćena sa smanjenim omjerom koncentracije inzulina u cerebrospinalnom likvoru/plazmi, što se povezuje sa smanjenim ulazom inzulina u mozak kroz krvo-moždanu barijeru (128). S druge strane imunohistokemijski je nađeno da je gustoća IR u hipokampusu oboljelih od sAD povećana, što uz smanjenu tirozin-kinaznu aktivnost IR i nepromijenjenu koncentraciju inzulina upućuje na razvoj inzulinske rezistencije (19,9,123). Nemogućnost inzulina da aktivira inzulinski signalni put u oboljelih od sAD-a povezuje se između ostaloga s promjenama koncentracije kortizola i noradrenalina/adrenalina (Slika 5). Bazalna koncentracija kortizola povećana je u plazmi i cerebrospinalnom likvoru bolesnika sa sAD-om (129,130,131). Takvo povećanje vjerojatno je posljedica hipereaktivnosti HPA-osovine (osovina hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žljezda) nađene u oboljelih od sAD-a (132). U likvoru bolesnika sa sAD-om nađeno je povećanje koncentracije noradrenalina/adrenalina, koje je raslo s napredovanjem bolesti (133). U sAD-u su nađene promjene na postreceptorskoj razini u obliku smanjene ekspresija mRNA IRS-1 u FC-u, HPC-u i HPT-u te smanjene ekspresije mRNA IRS-2 u HPC-u (126,127). U oboljelih od sAD nađeno je smanjenje kompleksa p85 podjedinice PI3-K i ekspresije IRS u HPC-u i HPT-u, što neizravno upućuje na smanjenju aktivaciju PI3-K/Akt puta (127). Nadalje, Akt/PKB čiji nalaz nepromijenjene ekspresije ukupnog proteina, ali snižene ekspresije fosforiliranog oblika (tirozin 308) u HPC-u i HPT-u, neizravno, upućuje na smanjenu aktivnost Akt/PKB enzima (85,127). Sukladno tome nađen je nepromijenjeni ukupni GSK-3 β i smanjena fosforilacija GSK-3 β , odnosno povećana aktivnost GSK-3 β u istim regijama mozga (134,135). Nasuprot tome u temporalnom korteksu (TC) oboljelih od sAD nađena je povećana fosforilacija obje GSK-3 izoforme te povećanja aktivnost Akt/PKB, što upućuje da su promjene u sAD regionalno specifične (136). U FC-u i TC-u bolesnika sa sAD nađena je smanjena ekspresija PP2A kao i smanjena aktivnost tog enzima (137-139). Ravnoteža između aktivnosti GSK-3 i PP2A igra ključnu ulogu u održavanju normalne razine fosforiliranog tau proteina. Snižena razina IDE proteina kao i smanjena ekspresija IDE mRNA nađena je u hipokampusu bolesnika oboljelih od sAD (140, 141). Za regulaciju nastanka A β važna je i sama količina APP proteina, tako je u HPC-u, HPT-u i FC-u oboljelih od sAD nađena je povećana ekspresija APP mRNA (127).

Osim samog inzulina, u mozgu oboljelih od sAD nađena je smanjena ekspresija mRNA IGF-I i receptora za IGF-I (126, 127).

Postoje, međutim, poteškoće u sagledavanju vremenskog slijeda svih navedenih promjena inzulina i IR signalizacije u bolesnika sa sAD-om, obzirom da se tkivo analizira tek nakon smrti i češće u odmaklom stadiju bolesti (Braka V-VI).



Slika 5. Promjene inzulinske signalizacije u sporadičnoj Alzheimerovoj bolesti. Smanjenje sadržaja inzulina kao i smanjenje aktivnosti IR (inzulinskog receptora) nađena je postmortalno u bolesnika oboljelih od sAD (sporadične Alzheimerove bolesti). PI-3K (fosfatidil inozitol -3-kinaza) također je nađena u smanjenim količinama kao i fosforilirani Akt/PKB. Ove promjene vode smanjenju omjera fosforiliranog/nefosforiliranog oblika u korist aktivnog (nefosforiliranog) oblika GSK-3 (glikogen sintetaza kinaza 3) te je sukladno tome nađena povećana aktivnost GSK-3. Povećanjem aktivnosti GSK-3β dolazi do narušavanja ravnoteže između fosforiliranog i nefosforiliranog tau proteina u korist fosforiliranog oblika, dok povećanja aktivnost GSK-3α dovodi do neravnoteže u nastajanju i razgradnji Aβ peptida. Također je u oboljelih od sAD nađen smanjen metabolizam. Smanjena aktivnost IR u oboljelih od sAD-a povezuje se s povećanom koncentracijom kortizola i noradrenalina/adrenalina, te defosforilacijom tj. inaktivacijom IR, uz pomoć fosfotirozin fosfataza.

1.4. EKSPERIMENTALNI MODELI ALZHEIMEROVE BOLESTI

1.4.1. Eksperimentalni modeli sAD temeljeni na mutacijama gena

Obzirom na specifičnu prirodu bolesti kao što je Alzheimerova bolest, vrlo je teško napraviti eksperimentalni model koji bi vjerno odgovarao bolesti u ljudi. Eksperimentalni modeli opisani u literaturi uglavnom se temelje na genetskim mutacijama i predstavljaju reprezentativniji model za familijarni tip AD nego za sAD (142). Ove eksperimentalne modele možemo podijeliti na modele s mutacijom gena za APP, mutacijom gena za presenilin, mutacijom gena za tau protein te modele s različitim kombinacijama ovih mutacija. Od modela vezanih za mutaciju APP gena najučestaliji u istraživanjima su transgenični Tg2576 miševi koji zbog mutacije imaju pojačanu ekspresiju humanog APP te progresivno razvijaju A β plakove u hipokampusu (143,144). Zanimljivo je napomenuti da su u ovom modelu te u kombinacijama ovog modela i mutacije gena za PS1 (A246E) nađene bihevioralne promjene prije formiranja plakova, što ukazuje na to da promjene u A β metabolizmu nisu uzrok kognitivnih deficita. (145). Kako je ovdje primarni supstrat patološka promjena A β , ovaj model nije prikladan za ispitivanje sporadičnog oblika AD-a te posebno inzulinske hipoteze etiopatogeneze sAD. No, u pokusima gdje se radilo o kombinaciji transgeničnih modela i neke od oblika inzulinske rezistencije nađene su promjene IR/IPK-3 signalnog puta u mozgu (146-151). Pokusi na Tg2576 miševima koji su podvrgnuti masnoj dijeti pokazali su da u cerebralnom korteksu ovih životinja dolazi do smanjene autofosforilacije IR β podjedinice, smanjene ekspresija IPK-3 p85 podjedinice, nepromijenjene ekspresije IR β podjedinice, smanjene aktivnosti Akt/PKB, te posljedično i smanjena fosforilacije GSK-3 β / α , kao i smanjene ekspresije i aktivnosti IDE, u usporedbi s Tg2576 miševima na običnoj prehrani (146,147). U cerebralnom korteksu Tg2576 miševa na masnoj dijeti nađeno je povećanje veličine plakova, a u HPC-u povećanje količine A β _{1-40/42} u usporedbi s Tg2576 miševima na običnoj prehrani (146,147). U pokusu na Tg5xFAD miševima koji su dodatno tretirani sa streptozotocinom (STZ) intraperitonealno (STZ ip) nađeno je smanjenje inzulina te nepromijenjena ekspresija IR i IDE u mozgu u usporedbi s Tg5xFAD miševima (148). Pokus u kojem je transgenični modela APP751 kombiniran sa STZ ip pokazao je da u APP751 miševa tretiranih sa STZ ip dolazi do smanjene fosforilacije IR, nepromijenjene ekspresije IR, smanjene fosforilacije GSK-3 β , nepromijenjene ekspresije GSK-3 β i smanjene ekspresije IDE. Posljedično tome, nađeno je povećanje fosforiliranog tau proteina i brojeva plakova u usporedbi s APP751 miševima (149). Kombinacija Tg2576 miševa i primjene STZ intracerebroventrikularno (icv) pokazala je da u mozgu ovih životinja dolazi do smanjena

GSK-3 α/β omjera, povećanog nakupljanja A β , povećanja ukupnog tau proteina te povećanje kongofilnih amiloidnih depozita u mozgu u usporedbi s Tg2576 miševima koji nisu dobili STZ-icv (150). Ovi pokusi upućuju na to da inzulinska rezistencije pridonosi nastajanju plakova i neurofibrilnih snopića.

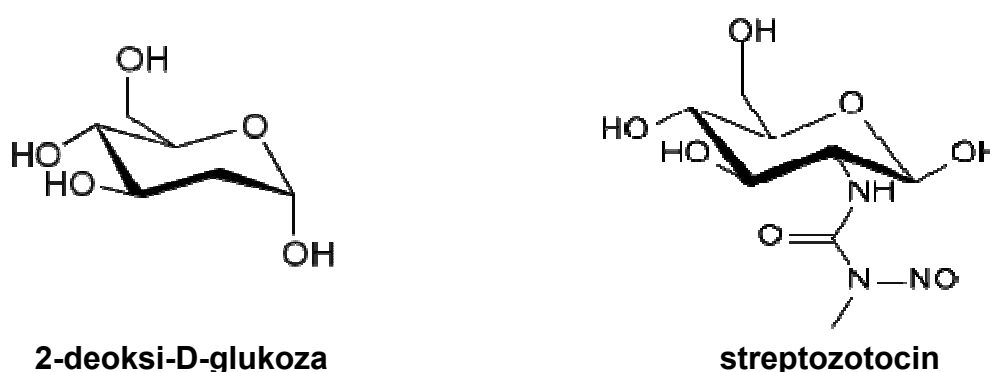
1.4.2 STZ-icv experimentalni model sAD

Prema novijim literaturnim podacima u sAD-u dolazi do nastanka inzulinske rezistencije u mozgu (124). Sukladno tome, štakori kojima se u lateralne moždane komore (intracerebroventrikularno–icv) injicira betacitotoksična tvar streptozotocin (STZ) čine se prikladnijim eksperimentalnim modelom za humani sAD, poglavito onaj fenotip u kojem je izražena inzulinska rezistencija, od modela temeljenih na genetskim mutacijama (9,151).

1.4.2.1. Kemijska građa

STZ (2-deoksi-2-(3-(metil-3-nitrozou Reid)-D-glukopiranoza) je derivat nitrozoureje koji je prvobitno izoliran iz *Streptomyces achromogenes*, dok se danas dobiva sintetskim putem. Molekularna struktura odgovara 2-deoksi-D-glukoznoj molekuli koja na C₂ mjestu ima vezanu N-metil-N-nitrozourejnu grupu (Slika 6).

STZ se svrstava u grupu alkilirajućih antitumorskih lijekova i građom je sličan karcinogenoj skupini nitrozamina. Nitrozamini se dodaju hrani da bi ostala što duže svježja, da bi zadržala privlačnu boju ili za poboljšanje okusa (152,153).



Slika 6 Molekularna struktura 2-deoksi-D-glukoze i streptozotocina

1.4.2.2. Mehanizam djelovanja streptozotocina

Intraperitonealna primjena visokih doza STZ dovodi do uništenja β -stanica gušterače pri čemu se razvija eksperimentalna šećerna bolest, tipa I (154,155). S druge strane, višestruka primjena nižih intraperitonealnih doza STZ dovodi do razvoja eksperimentalne šećerne bolesti

tipa II (154,155). Kod parenteralne primjene manje doze ne dolazi do uništenja β -stanica gušterače, već do razvoja eksperimentalne inzulinske rezistencije (156) tako što se smanjuje autofosforiliranost IR (157) dolazi do povećanja ukupnog broja IR, ali sa malom promjenom ukupne fosforilacije IR β podjedinice (158).

Nakon otkrića inzulina i IR u mozgu (159,160) razvila se ideja da bi središnja intracerebroventrikularna (icv) primjena STZ mogla utjecati na sintezu i/ili sekreciju inzulina i signalizaciju IR u mozgu (161,162). Prvi rezultati o STZ-icv primjeni datiraju iz 1990. godine od kada se STZ primjenjuje icv u dozama do 100 puta manjim (0,5-3 mg/kg) od one pri perifernoj primjeni, u jednoj dozi ili podjeljeno u nekoliko doza u oba ili smo u jedan lateralni ventrikul (161,162). Pri takvoj središnjoj primjeni niskih doza STZ u štakora ne dolazi do razvoja sistemskih promjena hiperglikemije nego dolazi do kognitivnih, neurokemijskih i strukturnih promjena u mozgu tretiranih životinja (151,163).

Konkretan mehanizam djelovanja STZ u mozgu nije još utvrđen te se može jedino pretpostaviti da se radi o sličnom mehanizmu djelovanja kao i na periferiji (154,151). Obzirom da je molekularna građa STZ slična glukozi, STZ na periferiji ulazi u stanice preko GLUT-2 nosača za glukozu, te je selektivno toksičan za stanice koje imaju ekspresiju GLUT-2 nosača na membrani. Na periferiji se GLUT-2 nosači najviše nalaze na β -stanicama gušterače, a u manjim količinama prisutni su i u mozgu (154,107,108). In vitro ispitivanja na kulturi β -stanica pokazala su da STZ ovisno o dozi također dovodi do smanjene ekspresije GLUT-2 protein bez utjecaja na mRNA GLUT-2 (155). U mozgu je nađena ekspresija GLUT-2 koja pokazuje regionalno specifičnu distribuciju u hipokampusu, temporalnom i peririnealnom korteksu, amigdali, talamusu i jako puno u hipotalamusu (108). Temeljem toga, može se pretpostaviti da bi također i promjene nađene u mozgu nakon STZ-icv primjene mogle bi biti posljedica njegovog ulaska u ciljne stanice putem GLUT-2. Neuronalna lokalizacija GLUT-2 slična je lokalizaciji glukokinaze. Glukokinaza i GLUT-2 nalaze se u β -stanicama gušterače i sudjeluju u metabolizmu glukoze djelujući kao senzori za glukozu pa se pretpostavlja da imaju sličnu ulogu u mozgu gdje je prema nekim istraživanjima nađena njihova kolokalizacija u istim stanicama (107,111). Međutim, obzirom da se neuronalna lokalizacija GLUT-2 ne podudara uvijek s lokalizacijom glukokinaze te da se GLUT-2 nalazi na sinapsama, pretpostavlja se da GLUT-2 igra ulogu i u otpuštanju neurotransmitora (165,166). Rezultati *in vitro* istraživanja pokazali su da STZ ulaskom u stanicu dovodi do izravnog oštećenja DNK alkilacijom što posljedično dovodi do aktivacije poli-ADP-ribosilacije i smanjenja ATP i NAD⁺ (152,154). Razgradnjom STZ u stanici dolazi do stvaranja slobodnih radikala koji dodatno oštećuju DNK stanice dovodeći do smrti stanice

apoptozom ili nekrozom. Kemijska građa STZ upućuje na to da metabolizam STZ u stanici stvara NO i H₂O₂ koji pridonose nastajanju oksidativnog stresa te daljnjem smanjenju ATP-a i NAD⁺ u stanici (Slika 7) (154). Smanjenje ATP-a i povećanje oksidativnog stresa nađeno je u mozgu životinja nakon STZ-icv primjene, što dodatno upućuje na sličnosti perifernog i centralnog mehanizma djelovanja STZ-a (151). S druge strane, za pretpostaviti je da će takvo sniženje ATP-a dovesti i do smanjene autofosforilaciju IR jer vezanje samo inzulina bez ATP-a za IR neće dovesti do aktivacije inzulinske signalne kaskade. No točan mehanizam djelovanja STZ u mozgu tek treba razjasniti.

1.4.3 Dosadašnja istraživanja eksperimentalnog modela s intracerebroventrikularnom primjenom streptozotocina (STZ-icv model)

Uz rijetke iznimke, u literaturi su najčešće promatrane promjene (kako kognitivne tako i morfološke i biokemijske) do 1 mjeseca nakon STZ-icv primjene i to uglavnom u samo jednom vremenskom odsječku.

1.4.3.1. Bihevioralne promjene

Kognitivne promjene

Prema podacima u literaturi, simptomi kognitivnog deficita učenja i pamćenja nađeni 2 tjedna nakon STZ-icv tretmana (151,164), imaju tendenciju progresije a praćeni su najkasnije do 12 tjedana nakon STZ-icv tretmana (151,164). U svrhu testiranja kognitivnih funkcija korišteni su „holebord“ test, test pasivnog izbjegavanja (151) i test plivanja u labirintu (Morris water maze /MWM test) (164). U holebord testu je nađeno da je 2 tjedna nakon STZ icv primjene došlo do pad radne memorije na 41% i referetne memorije na 72% , tendencija pada se i dalje nastavila tako da je 60 dana nakon zadnje doze STZ-icv vrijednost obje memorije pala na 18% od početne (prije tretmana) (151). Test pasivnog izbjegavanja također je pokazao progresivno propadanje kognitivnih funkcija jer je vrijednost postšok latencije STZ-icv tretiranih štakora sa 107±33.2 (dva tjedna nakon STZ-icv primjene) pala na 39±24.3(60 dan nakon STZ-icv primjene), dok je u kontrolnih štakora ista perzistirala približno na 300 min (maksimalno vrijeme testiranja) (151). MWM test pokazao je da su kognitivne promjene izraženije 3 mjeseca nakon STZ-icv tretmana (-46%) nego 1 mjesec nakon STZ-icv primjne (-33%) u usporedbi s kontrolom (164). Slični kognitivni deficit nađeni su u štakora koji su bili stari 3mj i 1-2 godine u vrijeme tretmana, što pokazuje da dob štakora ne utječe na njihov nastanak (151,161,164,167). Iako mehanizam kojim STZ dovodi do kognitivnog oštećenja

nije u potpunosti jasan može se pretpostaviti da tome pridonose morfološke i biokemijske promjene nađene u STZ-icv modelu.

Ne-kognitivne promjene

Osim kognitivnih promjene učenja i pamćenja na STZ-icv modelu su rađeni također testovi kojima su se testirale ne-kognitivne promjene. Lokomotorna sposobnost štakora u otvorenom polju (*open field task*) nakon STZ-icv primjene ostala je nepromjenjena (151,159). Anksioznost, koja se javlja u oboljelih od AD-a, testirana je u STZ-icv modelu pomoću povišenog labirinta (*elevated plus maze*) i svijetle-tamne komora (*light-dark box*) (167). U povišenom labirintu pokazano je da STZ-icv miševi provode manje vremena u otvorenom dijelu labirinta te da je broj ulazaka u otvoreni dio labirinta smanjen, dok je u pokusu svijetla –tamna komora latencija ulaska STZ-icv miševa u tamni dio komore bila smanjena (167). Ovi rezultati upućuju na to STZ-icv primjena u životinja dovodi do razvoja anksioznosti.

1.4.3.2. Biokemijske promjene u mozgu

Neurotransmiteri

U STZ-icv tretiranih štakora nađene su promjene u **kolinergičkoj signalizaciji** s posljedičnim kolinergičkim deficitom. Najranije promjene nađene su 1 tjedan nakon STZ-icv primjene u obliku smanjenje aktivnosti kolin acetiltransferaze (ChAT-enzima koji sintetizira acetilkolin iz acetil-CoA i kolina) u hipokampusu koja je bila praćena značajnim povećanjem aktivnosti acetilkolinesteraze (AChE-enzima koji razgrađuje acetilkolin u sinaptičkoj pukotini), a promjene su i dalje perzistirale 3 tjedna nakon STZ-icv primjene (163,168,170,171). U mozgu miševa tretiranih STZ-icv uz povećanje aktivnosti AChE nađeno je povećanje ekspresije mRNA AChE praćeno smanjenjem ekspresije mRNA α -7 nikotinskog receptora (172). Osim kolinergičkog sustava u STZ-icv modelu nađene su promjene glutamatergičkog kao i monoaminergičkog sustava (172,174,175). Promjene **monoaminergičkog sustava** u mozgu nađene su najranije 1 tjedan nakon STZ-icv karakterizirane povećanjem koncentracije dopamina (DA), noradrenalina (NA) i serotonina (5-HT), praćene smanjenjem metaboličkog prometa monoamina (162). Također je u strijatumu nađeno smanjenje gustoće dopaminskih D1 receptora, dok je gustoća D2 receptora i G-proteina (Gs i Gi) ostala nepromjenjena (176). Međutim 3 tjedna nakon STZ-icv primjene došlo je do pada koncentracije NA u strijatumu, frontalnom i entorinalnom korteksu, dok je koncentracije 5-HT bila smanjena uz povećani metabolički promet 5-HT-a u entorinalnom korteksu (177). Premda slabijeg intenziteta ekspresija mRNA nosača za dopamin i noradrenalin bila je značajno smanjena u STZ-icv životinja u odnosu na kontrolu, a ekspresija mRNA nosača za serotonin ostala je nepromjenjena 4 tj nakon STZ-icv primjene (178). U grupi A1 stanica moždanog debla

nađeno je povećanje ekspresije mRNA noradrenalina 1 i 4 tjedna nakon STZ-icv primjene (178). Promjene u **glutamatergičkom** sustavu u mozgu nađene su prvi puta 3 tjedna nakon STZ-icv tretmana u vidu smanjenja glutamata (-26%) (179). Četri tjedana nakon STZ-icv tretmana u HPC-u nađeno je smanjenje LTP koje je koreliralo sa smanjenjem ekspresije proteina NR2A i NR2B podjedinice glutamatnog NMDA receptora (180). Također je nađena smanjena mRNA ekspresija NR2B, dok je mRNA ekspresija NR2A i NR1 ostala nepromjenjena (180). U istom je pokusu 4 tjedna nakon STZ-icv promjene nađeno smanjenje učestalosti otvaranja kao i smanjeno vrijeme otvorenosti AMPAR glutamatnih receptora praćeno smanjenjem proteinske ekspresije GluR1 podjedinice, nepromjenjenom ekspresijom GluR2 podjedinice, dok je mRNA ekspresija obje podjedinice bila nepromjenjena (180). Šest tjedana nakon STZ-icv primjene nađeno je povećanje ekspresije mRNA nosača za glutamat, kao i GABA-A $\alpha 1$ podjedinice u korteksu dok je u strijatumu nađeno njihovo smanjenje (181).

Smanjenje aktivnosti ChAT i povećanje aktivnosti AchE dovode do smanjenja kolinergičke signalizacije u STZ-icv modelu, iste promjene nalazimo i u oboljelih od sAD-a, a povezuju se s nastankom demencije. Uzevši u obzir da inzulin preko IR potiče ekspresiju NMDA na staničnoj membrani, smanjenje ekspresije NMDA moglo bi se povezati s poremećaje inzulinske signalizacije nađene u STZ-icv modelu te posljedično poremećaju učenja i pamćenja (Slika 4) (180,120,121). Inzulin također ima utjecaj na monoaminsku signalizaciju, a obzirom da u STZ-icv modelu postoji poremećaj monoaminske signalizacije to govori u prilog oštećenja inzulinske signalizacije (182,151, 183).

Promjene inzulinskog sustva

Istraživanja inzulinske kaskade u eksperimentalnim modelima AD-a su rijetka, a posebno su rijetka ona u STZ-icv modelu. Naša preliminarna istraživanja pokazala su po prvi puta promjene inzulinskog sustava u mozgu STZ-icv štakora (164,184). U HPC-u i cerebralnom korteksu ekspresija IR nađena je smanjena, dok je u CA3 regiji HPC-a ekspresija gena za IR nađena snižena 3 tjedna nakon STZ-icv tretmana (186,187). Također je 3 mjeseca nakon STZ-icv primjene nađena smanjena ekspresija gena za IR te ekspresija gena za inzulin (Ins1 i Ins2) u HPC-u i PC-u (184). Ekspresija IR β -podjedinice bila je značajno smanjena u HPT-u dok je povećanja fosforiliranost IR β nađena u PC-u i HPT-u, a nepromjenjena u HPC-u (184). Tirozin kinazna aktivnost bila je nepromjenjena u PC-u i HPT-u, a povišena u HPC-u (184). Ovakve razlike u fosforiliranosti i kanznoj aktivnosti IR govore u prilog različitoj regionalnoj regulaciji IR signalnog puta. U IR-PI-3K signalnom putu u HPC-u nađena je smanjena fosforilacija IRS-1 3 tjedna nakon STZ-icv primjene i ekspresije Akt/PKB 2 i 3 tjedna te 3

mjeseca nakon STZ-icv tretmana (186,164,188), dok je 1 mjesec nakon STZ-icv primjene omjer fosforiliranog/nefosforiliranog oblika Akt/PKB ostao nepromjenjen (180). Također je nađena smanjena tirozinska fosforilacija regulatorne p85 podjedinice IP-3K i ERK1/2 u velikom mozgu 3 tjedna nakon STZ-icv primjene (189). Nadalje nađena je smanjena aktivnost GSK-3 β (-35%) (smanjeni omjer fosforiliranog/nefosforiliranog oblika GSK-3 β) u HPC-u 1 i 3 mjesec nakon STZ-icv primjene (180,164). 2 tjedna nakon STZ-icv tretmana nađeno je smanjenje IDE imunoreaktivnosti u dentatnom girusu i CA3 regiji hipokampusa (188). Nađene su također početne blage promjene povećane ekspresije ukupnog tau proteina u hipokampusu 1 i 3 mjeseca nakon STZ-icv primjene, te blago povišenje fosforiliranog tau proteina (PHF-1) 3 mjeseca nakon STZ-icv primjene (164,184). Načelno slične neurokemijske promjene IR-PI3-K signalnog puta nađene su u mozgu štakora koji su odmah po rođenju tretirani intrakortikalno niskim dozama STZ-a (185). Promjene su bile izraženije s dužim vremenom nakon STZ-icv tretmana, a promatran je period od 1 i 3 mjeseca. Ova progresivnost govori u prilog sličnosti s istima u ljudi sa sAD. Posebo je značajno, što su po prvi puta nakon 3 mjeseca nakon STZ-icv primjene nađena i strukturne promjene u smislu kongofilnih nakupina A β u stijenci meningealnih krvnih žila (164). Rezultati naših istraživanja kao i drugih istraživača upućuju na to da su promjene nađene nakon STZ-icv primjene vremenski i regionalno specifične.

Oksidativni stress

U hipokampusu, cerebralnom korteksu ili homogenatima cijelog mozga životinja tretiranih sa STZ-icv (štakori ili miševi) nađeni su znakovi izraženog oksidativnog stresa (190-202). Kao pokazatelji oksidativnog stresa korišteni su koncentracije malonaldehida (MDA), kisele tiobarbiturne reaktivne grupe (TBARS), glutationa, glutation reduktaze, katalaze (CAT), dismutaze (SOD), nitrita i reaktivnih oksidativnih skupina (ROS). MDA i TBARS nastaju tijekom lipidne peroksidacije i smatraju se kao dobri pokazatelj stvaranje slobodnih radikala. Glutation, CAT, SOD su, s druge strane, antioksidansi koji neutraliziraju slobodne radikale (190-202). U STZ-icv modelu značajno je povećana koncentracije MDA i snižena razina glutationa (190-192) u HPC-u ili homogenatima cijelog mozga od prvog dan te konstantno do 8 tjedana nakon STZ-icv primjene u dozi od 1,5-3mg/kg (187,190-196). Povećanje razine TBARS-a nađeno je u HPC-u i cijlom mozgu 2 tjedna nakon STZ-icv primjene u štakora i miševa (195,197-199), kao i povećanje koncentracije nitrita i ROS-a u cerebralnom korteksu i hipokampusu (200,201). Aktivnost endogenih antioksidanta CAT-a i SOD-a je nađeno smanjena u HPC-u i cijelom mozgu u STZ-icv štakora i miševa 2 do 4 tjedna nakon STZ-icv primjene (196,198,201).

Smanjenje antioksidativnog kapaciteta i povećano stvaranje slobodnih radikala dovodi do izraženog oksidativnog stresa koji zatim dovodi do oštećenja i propadanja neurona jedane od karakterističnih promjena u mozgu oboljelih od AD-a.

Lipidi

Povećanje koncentracije stearinske i palmitinske kiseline u temporalnom korteksu i povećanje palmitinske kiseline u entorinalnom korteksu nađeno je 3 i 6 tjedana nakon STZ-icv primjene (203,204). U prednjem dijelu hipokampusa nađeno je povećanje arahidonske, palmitinske i stearinske kiseline, u CA1 regiji nađeno je povećanje samo arahidonske kiseline, dok je u CA3 regiji koncentracija slobodnih masnih kiselina ostala nepromjenjena 3 tjedna nakon STZ-icv primjene (203). Smanjenje fosfatidiletanolamina i fosfatidilserina nađeno je u korteksu 3 tjedna nakon STZ-icv primjene (203). Promjene nađene u mozgu STZ-icv modela slične su promjenama za vrijeme hipoglikemije, no u ovom modelu koncentracija glukoze u arterijskoj krvi je normala, tako da se može pretpostaviti da su navede promjene u metabolizmu lipida posljedica smanjene aktivnosti inzulina/IR signalizacije (203).

Metabolizam glukoze

U STZ-icv modelu štakora također je, slično kao u ljudi oboljelih od sAD-a, nađeno smanjenje metabolizma glukoze u mozgu. Tri tjedna nakon STZ-icv primjene u štakora je nađeno povećanje glukoze, ADP-a i glikogena u cerebralnom korteksu (205) koje je bilo praćeno smanjenjem iskorištavanja glukoze (206). Šest tjedana nakon STZ-icv primjene smanjenje iskorištavanje glukoze i dalje je prisutno posebno u frontalnom, parietalnom, senzorno-motornom, auditornom i entorinalnom korteksu (207). Ovaj je nalaz praćen izrazito smanjenom aktivnosti enzima koji sudjeluju u procesu glikolize u korteksu i hipokampusu 3 i 6 tjedana nakon STZ-icv tretmana (9,207,208). Također je nađena smanjena ekspresija GLUT-1 i GLUT-3 u mozgu tri tjedna nakon STZ-icv primjene (189). Navedene promjene, slično kao i pri perifernoj primjeni STZ, dovode do smanjenja koncentracije ATP-a, kreatin fosfata i O-glikolizacije proteina u mozgu (151,209,189). Važno je napomenuti da inzulini u mozgu sudjeluje u regulaciji metabolizma glukoze te da nađene promjene nakon STZ-icv primjene indirektno upućuju na poremećenu funkciju inzulina i razvoj inzulinske rezistencije u mozgu (9,106).

Upalne promjene

U sAD-u su nađene upalne promjene u vidu mikroglioze te povećanja proinflammatoryh medijatora (citokina, kemokina) (210). U STZ-icv modelu slično sAD-u nađeno je povišenje upalnih parametara u smislu povećane ekspresije ciklooksigenaze-2 (COX-2), interleukina-8 (IL-8), inducibilne dušik oksid sintetaze (iNOS), te nuklearnog čimbenika-kB u HPC-u (198).

1.4.3.3. Strukturne promjene u mozgu

U mozgu štakora tretiranih sa STZ-icv nađene su morfološke promjene u obliku astroglioze već 1 tjedan nakon STZ primjene kada još nije bilo zabilježenih kognitivnih promjena (190,193). Pet tjedana nakon STZ-icv primjene astroglioza je i dalje prisutna (163). **Astroglioza** se javlja kada dolazi do jakog oštećenja neurona, a povećana ekspresija markera astroglioze, GFAP-a (*glial fibrillary acidic protein*), nađena je u homogenatima kao i parafinskim rezovima mozga (163,169). Imunohistokemijsko bojanje pokazalo je povišene vrijednosti GFAP-a u području oko ventrikula, septumu, fornixu, striatumu i hipokampusu, što upućuje na oštećenje neurona u ovim regijama nakon STZ-icv tretmana (169). U mozgu mladunčadi štakora nako intrakortikalne (ic) primjene STZ nađena je povišena ekspresija gena za GFAP i proteina specifičnih za mikrogliju (185). Osim astroglioze nađen je **gubitak neurona** u području forniksa, lateralnog septuma, striatuma, hipotalamusa, talamusa i hipokampusa praćeno povećanjem volumena ventrikula (169,211). Međutim, 1 tjedan nakon primjene STZ u dozi od 3mg/kg nije nađen gubitak kolinergičkih neurona (211). Na razini stanice nađeno je signifikantno povećanja Golgievog aparata u korteksu, koje izgledom ne odgovara promjenama Golgia u sAD-u što može biti posljedica direktnog štetnog djelovanja STZ (212). Na genetskoj razini nađena je smanjena ekspresija gena specifičnih za neurone, a povećanja ekspresija gena za gliju (213). Posebno je značajno, što su po prvi puta 3 mjeseca nakon STZ-icv primjene nađene i strukturne promjene u smislu **kongofilnih nakupina A β** u stijenci meningealnih krvnih žila, koje su i dalje bile prisute 6 i 9 mjeseci nakon STZ-icv primjene, te kongofilnih nakupina A β u stijenci krvnih žila unutar korteksa 6 i 9 mjeseci nakon STZ-icv primjene (164,214). Druga grupa istraživača našla je A β izvanstaničnu imunoreaktivnost u hipokampusu 21 dan nakon STZ-icv tretmana (188). Promjene poput astroglioze, gubitka neurona, povećanja ventrikula te kongofilnih nakupina A β također su nađene u mozgu oboljelih od sAD (20,21,37,193).

1.4.4. Lijekovi koji utječu na promjene izazvane STZ-icv primjenom.

Sve je više istraživanja koji potvrđuju sličnost promjena nađenih u STZ-icv modelu s promjenama u bolesnika sa sAD-om, pa je tako u zadnje vrijeme sve više radova u kojima se na ovom modelu testiraju novi lijekovi te proučava mehanizam djelovanje lijekova koji se već koriste u terapiji sAD-a (215).

Inhibitori kolinesteraze

U STZ-icv modelu kao i u sAD-u nađen je kolinergički deficit u mozgu (163,168,170,171), a do sada testirani inhibitori kolinesteraze u STZ-icv modelu doveli su do poboljšanja kognitivnih funkcija učenja i pamćenja. **Donepezil** (1 i 3 mg/kg/danu), ovisno o dozi, te **takrin** (5mg/kg) uspješno smanjenjuj aktivnosti AChE (216,217) kao i oksidativni stres izazvan STZ-icv primjenom (217). U miševa koji su dobivali donepezil (0.1 mg/kg i.p./15 dana) osim ovih biokemijskih poboljšanja, također je došlo do poboljšanja kognitivnih funkcije (218). **Ladostigil** (TV3326) je lijek koji posjeduje AChE inhibitornu aktivnost rivastigmina i selektivnu MAO-B inhibiciju rasagalina (219). Ovaj lijek dovodi do poboljšanja kognitivnih funkcija, te uspješno smanjuje oštećenje neurona i reaktivnu gliozu te normalizira parametre oksidativnog stres izazvanih STZ-icv primjenom u štakora (219,220).

Antagonist NMDA receptora-memantin

Nakon 2 tjedna memantina u (5mg/kg i.p) u STZ-icv štakora došlo je do poboljšanja kognitivnih funkcija koje nije bilo povezano s promjenama u fosforiliranosti GSK-3 β u HPC-u i FC-u (221). Iako u ovom radu nije istraživani glutaminički sustav autori smatraju da je poboljšanje kognitivnih funkcija posljedica promjene NMDA receptora u STZ-icv modelu (221).

Osim lijekova odobrenih za liječenje sAD u ljudi na STZ-icv modelu su se ispitivali i lijekovi čiji je mehanizam djelovanja povezan s inzulinom.

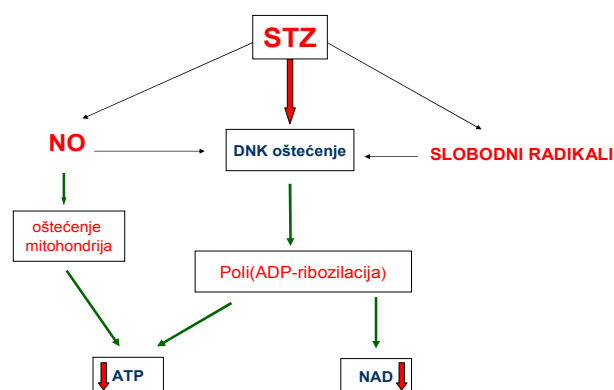
Dijabetes je jedan od rizičnih čimbenika za razvoj sAD pa je logično pomisliti da bi lijekovi u liječenju dijabetesa mogli imati povoljan učinak na patofiziologiju sAD. Na STZ-icv modelu, do sada je testiran PPAR- γ agonist pioglitazon i eksenatid agonist GLP-1 (glukagonu sličan peptid-1) receptora (221,222,223). **Pioglitazon** u oralnoj dozi od 30 mg/kg kroz kroz 14 dana doveo je do poboljšanja kognitivnih funkcija, što se povezuje s normalizacijom sniženih vrijednosti p-GSK-3 β u HPC-u, izazvanih STZ-icv primjenom (221). Utjecaj na normalizaciju p-GSK-3 koji je dio inzulinskog signalnog puta upućuje na to da bi ovaj lijek mogao imati povoljan učinak na inzulinsku rezistenciju u STZ-icv modelu. U još dva pokusa pioglitazon davan per os (10-30 mg/kg) kroz 14 dana dovodi do poboljšanja kognitivnih funkcija te do normalizacije oksidativnog stresa i sniženja povišene aktivnosti AChE (206,224). Svi ovi povoljni utjecaji pioglitazona na promjene izazvane STZ-icv primjenom bili su spriječeni pretretmanom s inhibitorom NO-sintaze L-NAME (L-N^G-Nitroarginin metil ester) što upućuje na to da bi neuroprotektivan učinak pioglitazona mogao biti povezan s inzulinskom, oksidativnom, kolinergičkom i NO signalizacijom.

Efekt različitih PPAR agonista (PPAR α , PPAR γ , PPAR δ) testiran je na mladunčadi štakora koji su dobili 40 μ g/kg S. Pokazalo se da PPAR agonisti imaju povoljan učinak na

neurodegenerativne promjene izazvane STZ-om, tako što povećavaju veličinu mozga, sprečavaju propadanje neurona koji ispoljavaju IR i IGF-IIR i normaliziraju inzulinsku signalizaciju, smanjuju p-tau/t-tau omjer i ekspresiju APP mRNA, te također povećavaju ChAT ekspresiju i smanjuju oksidativni stres. Poboljšanje strukturalnih i biokemijskih promjene praćeno je poboljšanjem kognitivnih funkcija učenja i pamćenja, a najbolji učinak imaju PPAR δ agonisti (225).

U STZ-icv štakora tretiranih s **eksenatidom** došlo je do poboljšanja kognitivnih funkcija učenja i pamćenja, a na histološkoj razini do smanjenog propadanja neurona u hipokampusu, dok je na biokemijskoj razini smanjena aktivnost GSK-3 β te posljedično smanjenja fosforiliranost tau proteina (222).

Osim navedenih na STZ-icv modelu testirano je i niz drugih lijekova s različitim mehanizmom djelovanja neovisno o inzulinu (215). Od velikog broja lijekova povoljan učinak na poboljšanje promjena izazvanih STZ-icv primjenom imali su: litij, antihipertenzivi (perindopril, candesartan i carvedilol), antilipemici (pitavastatin, simvastatin i ezetimibom), estradiol-17beta, valeril salicilat (selektivni COX-1 inhibitor), etorikoksib (selectivni COX-2 inhibitor) Alfa-lipoična kiselina (ALA), koenzim Q₁₀ (CoQ₁₀), vitamin E, melatonin sesamola, organoselenija resvertrol, kurkumin, quercetin, rutin, eritropoetin, indinavir, inhibitori fosfodiesteraze, aminogvanidin. Ostali lijekovi koji nisu utjecali na promjene izazvane STZ-icv primjenom su: fluvastatin, fenacetina, celekoksiba, Acetil-L-carnitin (215).



Slika 7. Mehanizam djelovanja streptozotocina (STZ). STZ djeluje na više načina; s jedne strane dovodi do alkilacije i izravnog oštećenja DNK, dok s druge strane dovodi također do nastajanja slobodnih radikala unutar stanice koji zatim doprinose oštećenju DNK. STZ je također i donor NO (dušikov oksid), koji oštećuje mitohondrije te dodatno i DNK. Svi ovi procesi dovode do drastičnog smanjenje ATP-a (adenozin trifosfat) i NAD (nikotinamid adenin dinukleotid)u stanici.

2. HIPOTEZA I CILJEVI RADA

HIPOTEZA

Model štakora sa središnjom primjenom streptozotocina (STZ-icv) predstavlja reprezentativan model eksperimentalne sporadične Alzheimerove bolesti za istraživanje inzulinskog sustava mozga kojim je moguće pokazati nastanak i razvoj te vremenski slijed promjena inzulina i signalnog puta inzulinskog receptora (IR-PI3-K) u mozgu. Promjene inzulina i IR-IP-3K signalnog puta u ovom modelu primarni su patološki događaj koji posljedično dovodi do promjena fosforilacije tau proteina i agregacije A β peptida.

CILJEVI ISPITIVANJA

- 1) Istražiti vremensku ovisnost promjena kognitivnih funkcija učenja i pamćenja u STZ-icv tretiranih štakora kao eksperimentalnog modela sAD-a
- 2) Istražiti neurokemijske promjene proteina/enzima u inzulinskom sustavu mozga u STZ-icv tretiranih štakora, poglavito one u IR-PI-3K signalnom putu (IR, Akt/PKB, pGSK-3 α/β , GSK-3 α/β , p-tau, tau), njihovu regionalnu rasprostranjenost, te ovisnost o vremenu proteklom nakon STZ-icv primjene
- 3) Istražiti strukturne promjene u mozgu STZ-icv tretiranih štakora, poglavito one u svezi nakupljanja A β (A β 1-42), te njihovu ovisnost o vremenu proteklom nakon STZ-icv tretmana

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Životinje

Istraživanje je provedeno na mužjacima Wistar soja štakora, starosti 3-6 mjeseci, uzgojenim na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. U svim pokusima na životinjama slijedila su se međunarodna načela (NIH Publication No.86-23, revised in 1985) i etičke smjernice Zakona o zaštiti životinja (Narodne novine 135/2006). Ova je disertacija dio istraživanja na projektu MZOŠ, za kojui je dobivena dozvola etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (04-1343-2006). Životinje su imale slobodan pristup vodi i hrani tijekom čitavog istraživanja. Za potrebe kirurških zahvata životinje su podvrgnute općoj anesteziji kloralhidratom u dozi od 300 mg/kg (i.p.). Životinje su žrtvovane dekapitacijom u razdoblju od 1, 3 i 6 mjeseci nakon icv primjene STZ i pufera. Odmah po žrtvovanju odstranjen je mozak koji je zatim na hladnoj podlozi podjeljen na lijevu i desnu polovicu iz kojih su pažljivo izvađene regije od interesa: hipokampus (HPC), frontalni korteks (FC), parietalni korteks (PC) i hipotalamus (HPT).

3.2 Intracerebroventrikularna primjena streptozotocina

U općoj anesteziji klorarhidratom (300 mg/kg, i.p.) napravi se rez kože i potkožnog tkiva prethodno očišane glave štakora u medijalnoj liniji duljine 1cm, te se električnom bušilicom s lijeve i desne strane napravi otvor (1-2 mm) u parijetalnoj kosti, 1,5-2 mm dijagonalno od križanja sagitalnog i koronarnog šava prema postupku prethodno opisanom u literaturi (226). STZ se aplicira u lateralne moždane komore (icv) vrlo finim i tankim injekcionim iglama u volumenu do 2 µl dvokratno u dozi od 1,5 mg/kg (ukupna doza 3 mg/kg) s razmakom od 2 dana između primjena. Kao otapalo se koristio citratni pufer. Nakon injiciranja rubovi kože spoje se kirurškim šavom, te se provodi uobičajena postoperativna skrb životinja do potpunog buđenja iz anestezije. Kontrolna skupina podvrgnuta je istom postupku kojim se primjenjuje samo otapalo (citratni pufer)

3.3 Korište kemikalije, reagensi i antitjela

Za izradu otopina u postupku **STZ icv primjene**, korišteni su: kloralhidrat (*Chloral hydrate*, Merck KGaA, Njemačka), limunska kiselina (Kemika, Hrvatska), natrij citrat (Merck, Njemačka). Otapalo pri izradi anestetika kloralhidrata je fiziološka otopina, a limunska kiselina i natrij citrat otapaju se u destiliranoj vodi.

Za izradu **gela i pufera u postupcima elektroforeze i Western blot analize**, te za izradu **pufera u postupku imunohistokemije**, korištene su sljedeće kemikalije: akrilamid (*Acrylamide*, Sigma, SAD), bisakrilamid (Sigma, SAD), amonij persulfat (Sigma, SAD), TEMED (*N, N, N', N'-tetrametiletilenamid*) (Sigma, SAD), NaCl (Kemika, Hrvatska), EDTA (*Etilendiamintetraoctena kiselina*, Kemika, Hrvatska), Tris (TRIZMA[®] base, Sigma, SAD), DTT (*DL-Dithiotheital*, Fulka, Švicarska), Natrij deoksikolat (AppliChem, Njemačka), natrij vanadat (Aldrich, USA), NP-40 (*Nonidet[™] P 40 Substitute*, Sigma, USA), inhibitori proteaza (Sigma, SAD), 2-merkptoetanol (MERCK-Schurcharadt, Njemačka), bromfenol modriilo (Sigma, SAD), glicerol (Fluka, Švicarska) metanol (Kemika, Hrvatska), apsolutni etanol (Kemika, Hrvatska), boja Ponceau (Sigma-SAD); deterdženti: SDS (*Sodium dodecil sulphate*, Sigma, SAD), Tween 20 (Sigma, SAD); standard za određivanje molekulskih masa (*MagicMark[™] XP Western Protein Standard*, Invitrogen, SAD). Korišteni su univerzalni razvijlač (FR-16) i brzi fiksir (FF-2) (Fotokemika, Hrvatska).

Za elektroforezu i Western blot analizu korištene su kadice Bio-Rad i Invitrogen te aparat (*PowerPack JR II Power supply*, Bio-Rad, SAD), nitrocelulozne membrane veličine pora 0,45 µm (Invitrogen, SAD), film za razvijanje (Ortho CP-G PLUS (medical X-ray film), AGFA, Belgija) ili je signal detektiran Chemi Doc kamerom (Bio-Rad, Njemačka).

Korišteni su sljedeći **reagensi (kitovi)**: u postupku **Western blot analize**: za **kemiluminescentnu detekciju proteina** *Lumi-Light^{PLUS} Western Blotting substrate* (Roche Diagnostics, Njemačka); u **imunohistokemiji**: za **otkrivanje antigena** korištena je 10% mravlja kiselina (Merck, Njemačka) za **blokiranje nespecifičnog vezanja** korišten je 10% *Non-Immune Goat Serum* (Invitrogen, SAD), za **vizualizaciju korišten** je *Multi link kit* (BioGenex, USA) a kao **kromogen** *Romulin AEC Chromogen* (Biocare, UK), te za **protubojanje** korišten je *Hemalaon eozin* (Merck, Njemačka)

U postupcima **Western blot** imunodetekcije, korištena su sljedeća **antitijela**: **primarna** 1. *Mouse Anti-Insulin receptor (β-subunit) Monoclonal Antibody* (Chemicon, International), 2. *Monoclonal Mouse (monoclonal) Anti-GSK-3α/β Antibody Unconjugated* (Biosource, USA), 3. *Akt Antibody* (Cell Signaling Technology, Incorporated), 4. *Phospho-GSK-3α (Ser21) Antibody* (Cell Signaling Technology, Incorporated), 5. *Phospho-GSK-3β (Ser 9) Antibody* (Cell Signaling Technology, Incorporated), 6. *Anti-phospho-tau 396* (Sigma, USA) ili *PHF-1 396/404* (donacija dr Mandelkov). 7. *Anti-tau Antibody* (DAKO, USA). Kao **kontrola za lodiranje** korištena su sljedeća primarna antitijela: 1. *Monoclonal Anti-β-Actin Clone AC-15* (Sigma, USA), 2. *Polyclonal Antibody to GAPDH* (Imogenex, USA). **Sekundarna**: *Anti-*

mouse IgG, HRP-linked Antibody and Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (Cell Signaling Technology, Incorporated)

U **imunohistokemiji** korišteno je primarno antitijelo *Anti-beta-Amyloid 42 Purified (SIGNET) Polyclonal Antibody, Unconjugated* (Convance, USA)

3.4 Biokemijske metode

Za potrebe **Western blot analize** u pokusima je korišten STZ (Streptozotocin®, Fluka, Švicarska) u dozi od 3mg/kg otopljen u 0,05 M citratnom puferu pH 4,5.

CITRATNI PUFER: 0.05 M citronske kiseline

0.05 M natrij citrata

otapalo H₂O

pH 4,5

Kontrolne uzorke činili su isti dijelovi mozgovia životinja tretiranih icv citratnim puferom. Tako izvađeni uzorci tkiva iz mozgovia STZ-icv i pufer-icv (kontrolna skupina) tretiranih životinja brzo su smrznuti u tekućem dušiku i pohranjeni na -80°C do homogeniziranja u Lysis puferu s dodatkom inhibitora proteaza.

3.4.1. SDS-PAGE elektroforeza i Western blot.

1. Homogeniziranje različitih regija mozga u Lysis puferu s dodatkom inhibitora proteaza.
2. Priprema donjeg i gornjeg SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) gela
3. Jednake količine proteina nanose se na SDS-PAGE gel odgovarajućeg postotka sukladno molekulskoj masi ispitivanog proteina.

KORAK	KEMIKALIJE	VRIJEME
1. Elektroforeza proteina na 150V	9%, 12% ili 15% SDS-PAGE gel, uz pufer za razdvajanje	60-90'
2. Prijenos na membrane na 100 V	Pufer za prijenos pH 8,8	60'
3. Bojanje membrana	Ponceau boja	1-3'
4. Ispiranje membrana	LSWB	3x5'
5. Blokiranje nespecifičnog vezanja	LSWB/5% nemasno mlijeko/0,5% Tween 20	60'
6. Ispiranje membrana	LSWB	3x5'

7. Inkubacija u odgovarajućem primarnom antitijelu:	Razrjeđenja antitijela u puferu za blokiranje:	
I. <i>Mouse Anti-Insulin receptor (β-subunit) Monoclonal Antibody</i>	1:500	2 sata sobna temperatura
II. <i>Monoclonal Mouse (monoclonal) Anti-GSK-3α/β Antibody Unconjugated</i>	1:1000	preko noći na +4°C
III. <i>Phospho-GSK-3α (Ser21) Antibody</i>	1:1000	
IV. <i>Phospho-GSK-3 β (Ser9) Antibody</i>	1:1000	
V. <i>Akt Antibody</i>	1:1000	
VI. <i>Anti-tau Antibody</i>	1:10 000	
VII. <i>Anti-phospho-tau</i>	1:200	
VIII. <i>Monoclonal Anti- β-Actin Clone AC-15</i>	1:10 000	
IX. <i>Polyclonal Antibody to GAPDH</i>	1:2500	
8. Ispiranje membrana	LSWB	3x5'
9. Inkubacija u odgovarajućem sekundarnom antitijelu	Razrjeđenje antitijela u puferu za blokiranje:	60'
I. <i>Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody</i>	1:2000	
II. <i>Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody</i>	1:5000	
10. Ispiranje membrana	LSWB	3x5' 3x10'
11. Izlaganje kemiluminescentu	Luminol	4'
12. Ekspozicija	Fiksiranje i razvijanje na film Detekcija Chemi Doc kamerom	5-10' 10-200"

Nakon što se proteini različite molekularne mase razdvoje putujući kroz gel, isti se prenose na nitroceluloznu membranu. Membrane se zatim blokiraju u 5% otopini nemasnog mlijeka kako bi se smanjilo nespecifično vezanje. Potom se membrane inkubiraju s odgovarajućim primarnim protutjelom za IR, Akt/PKB, pGSK-3 α / β , GSK-3 α / β , tau, p-tau preko noći na 4°C ili 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja membrane se inkubiraju na sobnoj temperaturi sa sekundarnim protutjelom te se ponovo ispiru. Dobiveni signal vizualizira se pomoću kemiluminiscentnog Western blot detekcijskog kita i bilježi video kamerom ili ekspozicijom na filmu.

LYSIS PUFER:

50mM Tris, pH 8
150mM NaCl
0.5mM EDTA
1mM DTT
0.01M Natrij vanadat
0.5% Natrij deoksikolat
1% NP-40
0.1% SDS

DONJI GEL (razdvajajući):

Tris Cl/SDS pH 8,8
30 % acrilamid/0,8% bisakrilamid

10 % amonij-persulfat
TEMED
H₂O₂

GORNJI GEL:

30% akrilamid/0,8% bisakrilamid
Tris Cl/SDS pH 6,8
10% amonij persulfat
TEMED

LSWB (Low salt washing buffer):

0,5 mM Tris baza
7,5 mM NaCl
pH 7,4

3.4.2. Imunohistokemija

Iz svakog od tri ispitivana vremenska razdoblja, dio STZ-icv i kontrolnih (pufer-icv) životinja neposredno prije žrtvovanja anestetiziran je klorahidratom (200 mg/kg i.p.). Za potrebe pripreme tkiva za imunohistokemijske analize životinje su u općoj anesteziji perfundirane fiziološkom otopinom nakon čega je slijedilo perfundiranje puferiranim 4 % formalinom, te su im pažljivo izvađeni mozgovi. Perfundirani mozgovi su zatim stavljeni u puferiranu otopinu 4% formalina, uklapani u parafinske kocke te naknadno podvrgnuti postupku imunodetekcije amiloid beta 1-42 i kongo red bojanju.

1. Fiksiranje mozgova u puferiranoj otopini formalina 24 sata
2. Uklapanje u parafinske kocke, rezanje i hvatanje na stakalca

KORAK	KEMIKALIJE:	VRIJEME:
1. Deparafinizacija	Xsilol 100% etanol 96% etanol 70% etanol Destilirana voda	2x10' 2x5' 2x5' 2x5' 2x10'
2. Otkrivanje antigena	Mravlja kiselina	1 sat
3. Ispiranje	dH ₂ O	2x10'
4. Inhibicija endogene peroksidaze	3%H ₂ O ₂ /dH ₂ O	20'
5. Ispiranje puferom	Tris pufer (TBS – Tris Buffered Saline)	2x5'
6. Blokiranje nespecifičnog vezanja	10% koziji serum	20'
7. Primarno antitijelo <i>Anti-beta-Amyloid 42 Purified (SIGNET) Polyclonal Antibody</i>	Razrjeđenja antitijela: 1:2000	preko noći na +4°C
8. Ispiranje	TBS	2x5'
9. Sekundarno antitijelo	Biotin-Anti-Rabbit IgG	30'

10. Ispiranje	TBS	2x5'
11. Tercijarno antitijelo	Streptavidin-peroksidaza (HRP)	30'
12. Ispiranje	TBS	2x5'
13. Kromogen	Romulin	4-10'
14. Zaustavljanje reakcije	dH ₂ O	
15. Kontrastno bojanje	Hemalaon eozin	1'
16. Ispiranje	Tekuća voda	10'
17. Dehidracija	70% etanol	2x3'
	96% etanol	2x3'
	100% etanol	2x3'
	Xsilol	do pokrivanja
<hr/>		
17. Pokrivanje uzoraka		

Serijski rezovi (8µm) se prvo deparafiniziraju kroz niz alkoholnih otopina postupno nižih koncentracija (Xsilol, 100% alkohol, 95% alkohol, 70% alkohol). Otkrivanje antigena provodi se stavljanjem rezova u 80% mravlju kiselinu kroz period od 1 sata. Nakon toga slijedi blokiranje endogenog vodikovog peroksida te ispiranje rezova u TBS puferu radi normalizacije pH. Nespecifično vezanje protutijela blokira se s 10% kozijim serumom. Dalje slijedi inkubacija s primarnim protutijelom za Aβ 1-42 preko noći na 4 °C. Slijedeći dan slijedi ispiranje s TBS puferom i inkubacija sa sekundarnim i nakon toga s tercijarnim protutijelom u trajanju od pola sata. Na kraju se dodaje kromogen koji razvija crvenu boju. Reakcija se zaustavlja s destiliranom vodom. Slijedeći je korak bojanje uzoraka sa Hemalaon eozinom da bi se razlučile stanične jezgre koje se boje plavo. Zadnji korak je hidracija rezova kroz niz alkoholnih otopina postupno viših koncentracija (70%, 96%, 100%, Xsilol).

TBS

0,5 mM Tris baza
7,5 mM NaCl
pH 7,6

3.4.3. Kongo red bojanje

Dio serijskih rezova se nakon deparafiniziranja obojao s Kongo crvenilom za vizualiziranje amiloida putem zelene autofluorescencije u polariziranom svjetlu mikroskopa (164).

KORAK	KEMIKALIJE:	VRIJEME:
1. Deparafinizacija	Xsilol	2x10'
	100% etanol	2x5'
	96% etanol	2x5'
	70% etanol	2x5'
2. Ispiranje	H ₂ O	2x5'
3. Farbanje	Kongo red otopina	20'

4. Ispiranje	dH ₂ O	5'
5. Razvijanje boje	Alkoholna otopina	Kratko 5-10 urona
6. Ispiranje	Tekuća voda	1'
15. Kontrastno bojanje	Hemalaun eozin	30"
16. Ispiranje	Tekuća voda	2'
17. Dehidracija	70% etanol	2x3'
	95% etanol	2x3'
	100% etanol	2x3'
	Xsilol	2x3'
17. Pokrivanje uzoraka		

Ovo modificirano Kongo bojenje koristi se za detekciju amiloida na parafinskim rezovima. Serijski se rezovi (8µm) prvo deparafiniziraju kroz niz alkoholnih otopina postupno nižih koncentracija, a zatim se nakon ispiranja u vodi inkubiraju 20 minuta u Kongo red otopini. Nakon inkubacije slijedi ispiranje u destiliranoj vodi i razvijanje crvene boje kratkim uranjem u alkoholnu otopinu. Slijedeći korak je ispiranje u tekućoj vodi te kontrastno bojanje hemalaon-eozinom. Amiloidne nakupine obojat će se crveno te će se potvrditi detekcijom zelene autofluorescencije u polariziranom svjetlu mikroskopa.

0.5% KONGO RED OTOPINA:

0.5 g Congo red
100 ml 50% Alkohol

1% NATRIJ HIDROKSID:

1 g Natrij hidroksid
100 ml Distilirane vode

ALKOHOLNA OTOPINA:

1ml 1% Natrij hidroksid
100 ml 50% alkohol

3.5 Metode ispitivanja spoznajnih funkcija učenja i pamćenja

Kognitivne funkcije testirane su pomoću dva testa:

- test plivanja u labirintu (Morris water maze /MWM/ swimming test)
- test pasivnog izbjegavanja elektrošoka (Passive avoidance test)

3.5.1. Test plivanja u labirintu (Morris water maze swimming test)

Kognitivne funkcije učenja i pamćenja ispitivane su putem testa plivanja u Morrisovom labirintu (*Morris Water Maze Swimming Test*) koji se već 30 godina uspješno primjenjuje u svrhu kognitivnog testiranja laboratorijskih štakora (227,228). Do sada je test doživio različite

modifikacije, ali je princip ostao isti. Eksperiment se izvodi u bazenu veličine 150x60 cm i dubokom 50 cm napunjenom vodovodnom vodom temperature $25\pm 1^{\circ}\text{C}$. Bazen je pregradama nepotpuno podijeljen u četiri (I-IV) jednaka odjeljka. U odjeljku IV nalazi se prozirno postolje, smješteno 2 cm ispod razine vode. 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 nalasku postolja, 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. U toku jednog dana pokus se ponavlja tri puta, pri čemu se svaka životinja tri puta stavlja u bazen sa startom iz svakog od 3 odjeljka (I-III), s odmorom od 30 minuta između pokusa, pri čemu se mjeri vrijeme potrebno životinji da dođe do postolja i broj ulazaka u odjeljke bez postolja (broj pogrešaka). Nakon četiri dana uvježbavanja postolje se ukloni te se mjeri vrijeme (sekunde) koje životinje provedu tražeći postolje u odgovarajućem odjeljku, kao i broj ulazaka (grešaka) u «pogrešne» odjeljke u kojima se nije nalazilo postolje.

Pokus se temelji na pretpostavci da će kontrolni štakori, koji nemaju poremećaje učenja i pamćenja brže naći postolje i provesti duže vrijeme u potrazi za postoljem u odgovarajućem odjeljku u usporedbi sa štakorima kojima je učenje i pamćenje oštećeno te će pri tome također napraviti manji broj pogrešaka tj. imat će manji broj ulazaka u «pogrešne» odjeljke.

3.5.2. Test pasivnog izbjegavanja elektrošoka (Passive avoidance test)

Kognitivne funkcije dodatno se testiraju još jednim od pasivnih testova izbjegavanja (*Passive avoidance test*) poput npr. “Step-through” testa kojim je u prethodnim istraživanjima STZ-icv modela u literaturi nađen kognitivni deficit (227). Test se izvodi na aparaturi sastavljenoj od dva odjeljka, prvi je osvijetljen i odvojen pomičnim vratima od drugog tamnog odjeljka čije je dno napravljeno od metalnih šipki i povezano sa strujom, a oba su odjeljka iste veličine. Test se provodi kroz tri dana i sastoji se od **habituacije, testiranja prije i nakon elektrošoka**, a maksimalno vrijeme testiranja je 300 s. *Prvi dan* se štakori habituiraju na okolinu, tako da se stave u osvijetljeni odjeljak, pomična vrata su cijelo vrijeme otvorena i štakoru je dozvoljen slobodan prolaz u tamni dio. Nakon što štakor uđe u tamni dio, ostavlja ga se 15 s da istražuje, nakon čega se vadi van. *Drugi dan* se štakori na isti način stavljaju u prvi osvijetljeni odjeljak, nakon latencije od 5 s se otvaraju pomična vrata koja ga dijele od tamnog odjeljka. Kada štakor uđe u tamni odjeljak podvrgnut je blagom elektrošoku jačine 0.5 mA i u trajanju

od 2s preko metalnog rešetkastog dna. Vrijeme potrebno da štakor uđe u tamni odjeljak predstavlja “pred-šok” latenciju. *Treći dan*, nakon 24 sata, postupak se ponavlja, ali bez izazivanja elektrošoka, samo što sada vrijeme potrebno da štakor uđe u tamni odjeljak predstavlja “post-šok” latenciju. Pokus se temelji na pretpostavci da će vrijeme “post-šok” latencije biti duže kod kontrolnih štakora koji nemaju poremećaj u učenju i pamćenju, jer su zapamtili da će ulaskom u tamni odjeljak dobiti elektrošok pa oni ne ulaze ili uđu nakon dužeg vremena.

3.6 Statistička obrada podataka

Rezultati mjerenja gustoće zapisa proteina kamerom ili na filmu nakon Western blot analize (N= 4-7 životinja po grupi) i parametara mjerenih pri tesu plivanja (vrijeme proteklo u traženju postolja, napravljeni broj grešaka pri traženju odgovorajućeg odjeljka, vrijeme potrebno da dođu do postolja) i test pasivnog izbjegavanja elektrošoka (post-šok latencija) (N=7-10 životinja po grupi) statistički će se obraditi primjerenim neparametrijskim (Mann-Whitney U test) testovima za testiranje razlike među ispitivanim grupama, pri razini značajnosti $p < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1 Spoznajne funkcije učenja i pamćenja STZ-icv štakorskog modela

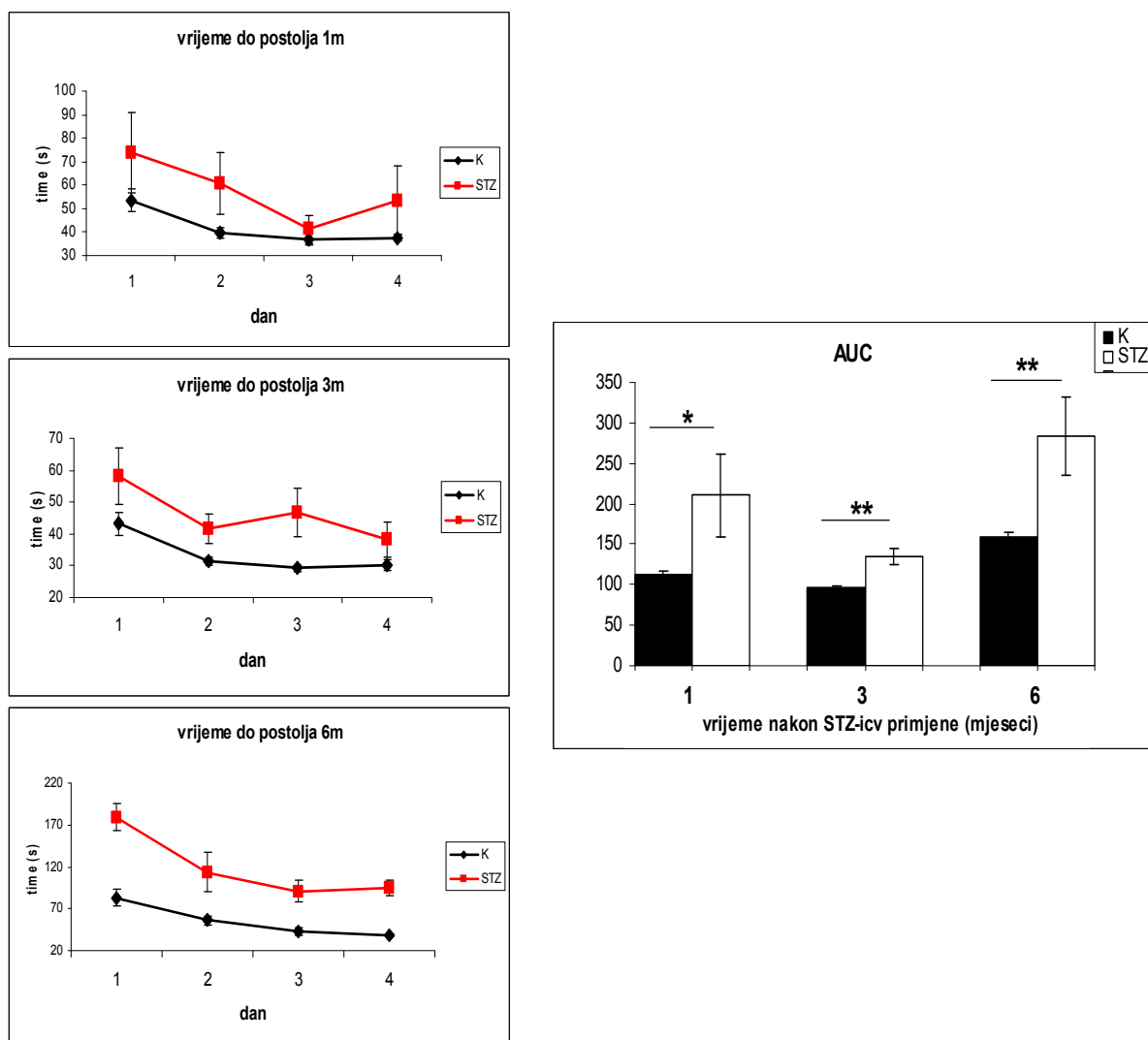
4.1.1 Test plivanja u labirintu (*Morris water maze swimming test*)

Test plivanja u labirintu pokazao je da nakon STZ-icv primjene u štakora dolazi do poremećaja prostornog učenja i pamćenja. STZ-icv štakori proveli su duže vremena u traženju postolja u usporedbi s kontrolnom skupinom u pokusu učenja kroz četiri uzastopna dana, što je vidljivo temeljem razmaknutosti krivulja dviju skupina te nalazom statistički značajne razlike u površinama ispod tih dvaju krivulja ($p < 0,05$) (Slika 8). Premda im je trebalo više vremena, STZ-icv štakori su ipak na kraju pronašli postolje što pokazuje da im je djelomično očuvana funkcija učenja. U prilog tome govori i nagib krivulje koji je strmiji od 1. do 4. dana kod STZ-icv štakora u usporedbi s kontrolnom skupinom (Slika 8A). Po završetku 4-dnevnog učenja i uklanjanja postolja, kontrolni štakori su proveli više vremena u potrazi za postoljem u odgovarajućem odjeljku u kojem se ono prethodno nalazilo, što potvrđuje da nemaju poremećaj prostornog pamćenja te da im je referentno pamćenje očuvano (Slika 9A). U usporedbi s kontrolom, STZ-icv štakori su proveli manje vremena u potrazi za postoljem u odgovarajućem odjeljku ($p < 0,05$) što upućuje na oštećenje referentnog pamćenja (Slika 9A). Deficit prostornog referentnog pamćenja (vrijeme provedeno u ciljnom odjeljku) u STZ-icv štakora u usporedbi s kontrolnom skupinom bio je relativno konstantan ($\approx 49\%$) tijekom 6 mjeseci (Slika 9A). Također su na dan testiranja naučenog, tj zapamćenog, STZ-icv štakori u usporedbi s kontrolnim štakorima napravili više pogrešaka ($p < 0,05$) ulazeći u odjeljke u kojima se prethodno nije nalazilo postolje (Slika 9B). Nasuprot vremenu u ciljnom odjeljku testiranje naučenog prostornog pamćenja pomoću mjerenja broja pogrešaka pokazalo je da u STZ-icv štakora dolazi do bifazičnih poremećaja, jačeg oštećenja pamćenja nakon 1 mjeseca (59%) praćeno manjim poboljšanjem nakon 3 mjeseca (30%), te zatim ponovnog pogoršanja nakon 6 mjeseci (52%) (Slika 9B).

4.1.2 Test pasivnog izbjegavanja elektrošoka (*Passive avoidance test*)

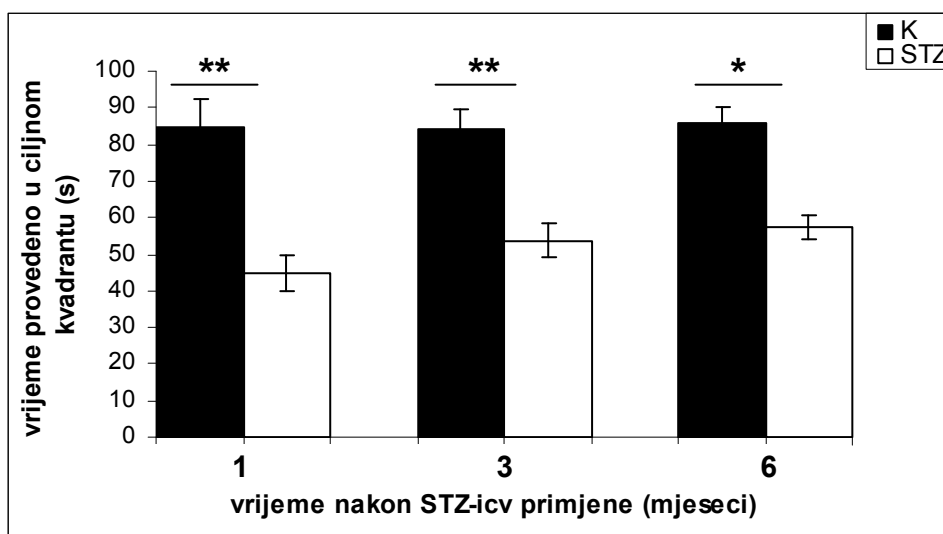
Kognitivne funkcije dodatno su testirane i pasivnim testom izbjegavanja elektrošoka. Test pasivnog izbjegavanja testira strahom motivirano pamćenje i učenje. U ovom je testu "post-šok" latencija u kontrolnih štakora bila značajno dulja u usporedbi sa STZ-icv štakorima ($p < 0,05$), što potvrđuje poremećaj i drugih oblika kognitivnih funkcija osim prostornog učenja i pamćenja u STZ-icv štakora. U ovom su testu kao i u testu plivanja, poremećaji pamćenja i učenja bili prisutni 1, 3 i 6 mjeseci nakon STZ-icv primjene, ali izraženiji nego u

testu plivanja (95% nakon 1 mj, 77% nakon 3 mj i 95% nakon 6 mj), pokazujući također bifazični uzorak kao i u testu plivanja u labirintu (Slika 10).

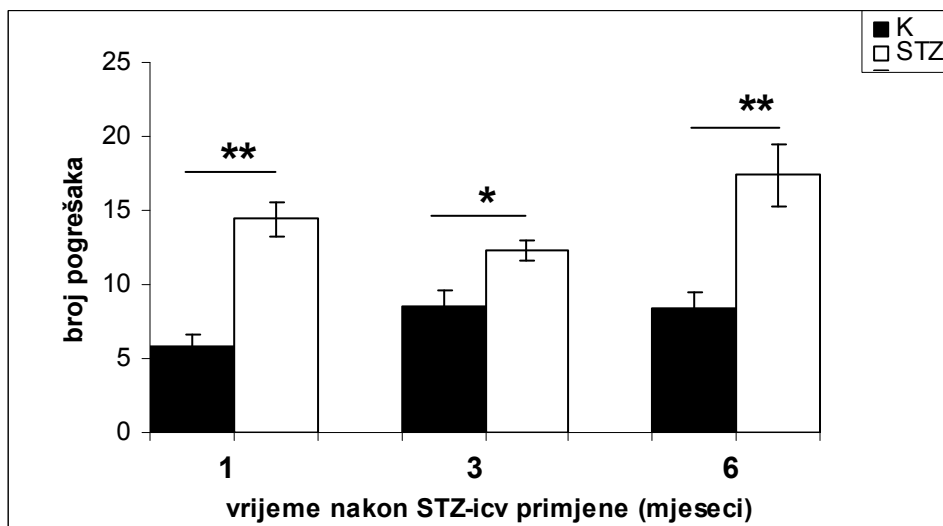


Slika 8. Testiranje naučenog nakon središnje primjene streptozotocina (STZ-icv) mjereno u testu plivanja u Morrisovom labirintu. Vrijeme potrebno da štakori dođu do postolja kroz četiri dana treninga, AUC-(air under the curve) područje ispod krivulje. Brži dolazak do postolja (manje područje ispod krivulje) te blaži nagib krivulje upućuju na očuvane funkcije učenja i obrnuto. **K**-kontrolna skupina, **STZ**-streptozotocin icv štakori. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SEM.; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ u usporedbi s odgovarajućom kontrolnom skupinom prema Mann-Whitney U-test-u.

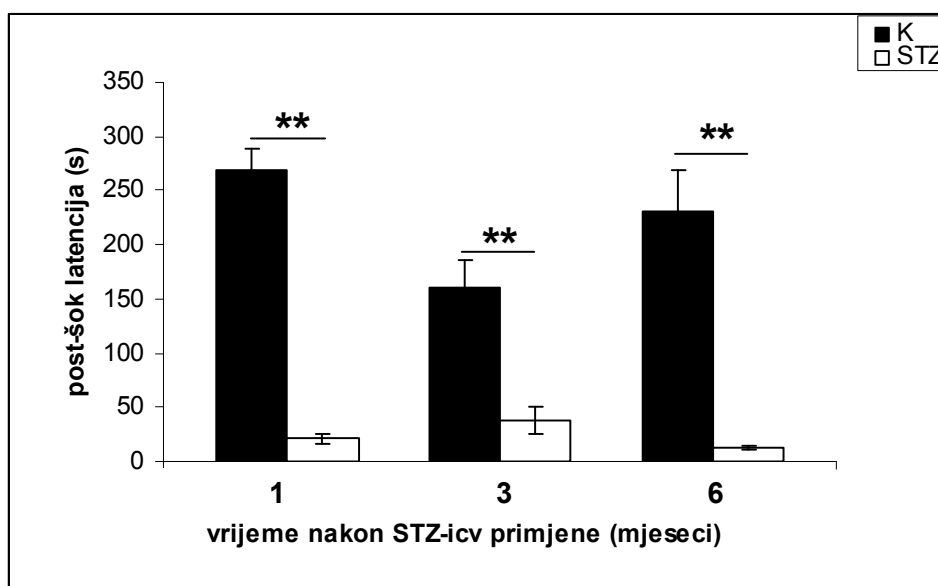
A



B



Slika 9. Testiranje zapamćenog nakon središnje primjene streptozotocina (STZ-icv) mjereno u testu plivanja u Morrisovom labirintu. A Vrijeme koje su štakori proveli u ciljnom odjeljku u potrazi za postoljem koje je prethodno uklonjeno. **B** Broj pogrešaka (ulazak u pogrešan odjeljak) koje su štakori napravili prilikom traženja ciljnog odjeljka u kojem je prethodno bilo postolje. Duži boravak u ciljnom odjeljku, i manji broj grešaka upućuju na očuvanu funkciju pamćenja i obrnuto. **K**-kontrolna skupina, **STZ**-streptozotocin icv štakori. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SEM.; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ u usporedbi s odgovarajućom kontrolnom skupinom prema Mann-Whitney U-test-u.



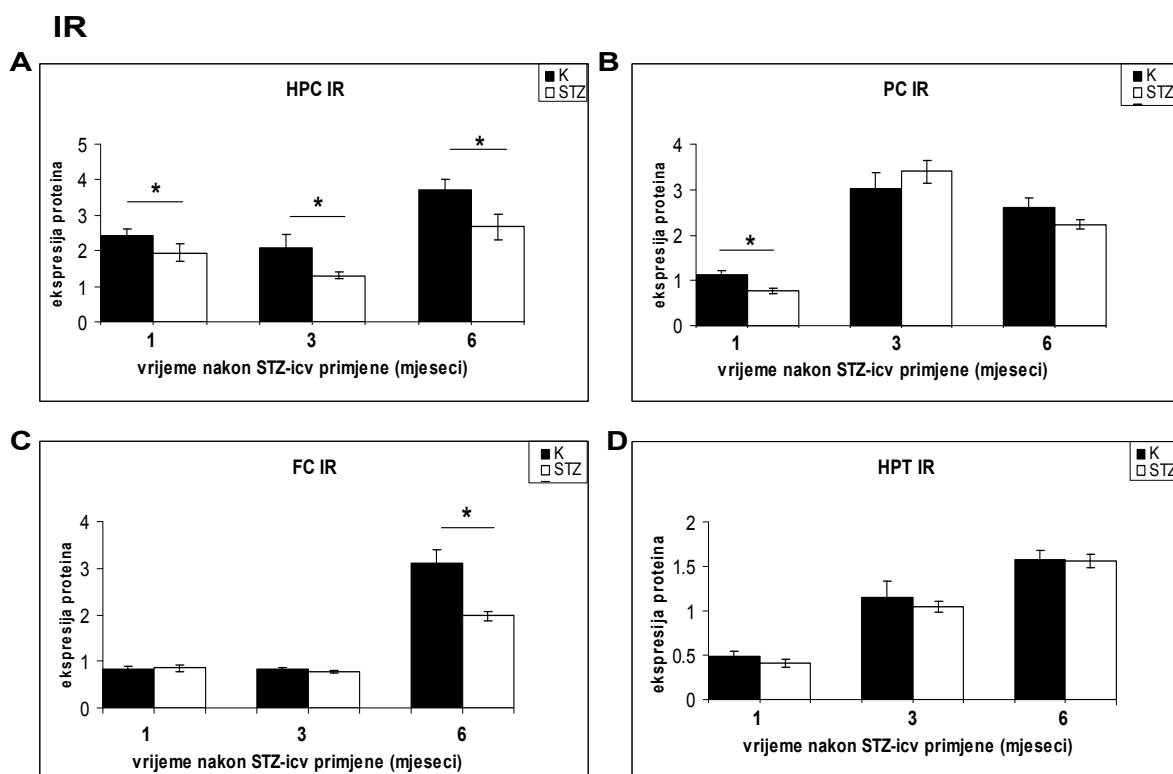
Slika 10. Funkcije učenja i pamćenja štakora nakon središnje primjene streptozotocina (STZ-icv) mjerene u pasivnom testu izbjegavanja elektrošoka. Niže vrijednosti post-šok latencija u usporedbi s kontrolnim štakorima, upućuju da STZ-icv štakori imaju oštećene funkcije učenja i pamćenja te se ne sjećaju da nakon ulaska u tamni odjeljak slijedi elektrošok. **K**-kontrolna skupina, **STZ**-streptozotocin icv štakori. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SEM.; ** $p < 0,01$ u usporedbi s odgovarajućom kontrolnom skupinom prema Mann-Whitney U-test-u.

4.2 SDS-PAGE elektroforeza i Western blot

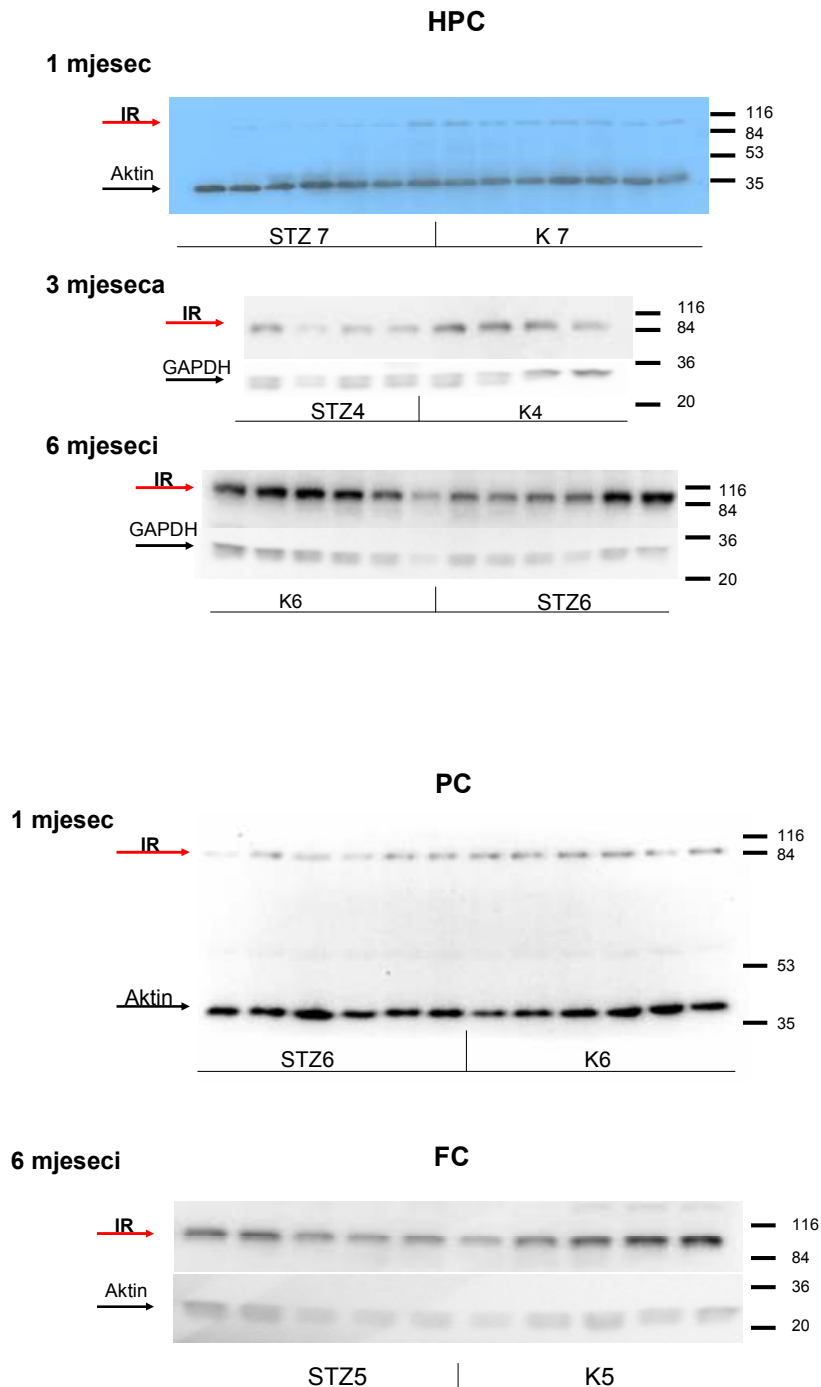
Western blot (WB) metodom su se istraživale neurokemijske promjene proteina/enzima u inzulinskom sustavu mozga u STZ-icv štakora, njihova regionalna rasprostranjenost, te ovisnost o vremenu proteklom nakon STZ-icv primjene. Imunodetekcija proteina WB metodom rađena je u slijedećim regijama mozga HPC, PC, FC i HPT, te je istraživana ekspresija slijedećih proteina: IR, Akt/PKB, t-GSK-3 α/β , p-GSK-3 α/β , t-tau i p-tau. Ekspresija svih proteina rađena je jedan (1mj), tri (3mj) i šest (6mj) mjeseci nakon STZ-icv primjene. Rezultati su prikazani u obliku grafova, a WB slike prikazane su samo za regije i razdoblja u kojih je nađena značajna promjenjena u ekspresiji proteina.

4.2.1 Ekspresija inzulin receptor proteina u hipokampusu, parijetalnom korteksu, frontalnom korteksu i hipotalamusu jedan, tri, šest mjeseci nakon STZ-icv primjene

Ekspresija IR proteina u HPC-u STZ-icv štakora bila je smanjena u odnosu na kontrolne životinje u sve tri ispitivane točke. Nakon 1 mjesec smanjenje je iznosilo 20% ($1,9 \pm 0,25$ nasuprot $2,42 \pm 0,02$ u kontroli, $p < 0,05$), nakon 3 mjeseca 38% ($1,3 \pm 0,11$ nasuprot $2,1 \pm 0,37$ u kontroli, $p < 0,05$), te je 6 mjeseci bilo 28% ($2,7 \pm 0,37$ nasuprot $3,7 \pm 0,33$ u kontroli, $p < 0,05$) (Slika 10A). Ekspresija IR proteina u PC-u STZ-icv štakora bila je samo akutno promjenjena, snižena za 32% u odnosu na kontrolne štakore ($0,78 \pm 0,05$ nasuprot $1,14 \pm 0,09$ u kontroli, $p < 0,05$) (Slika 11B). Nasuprot PC-u, ekspresija IR proteina u FC-u bila je snižena tek 6 mjeseci nakon STZ-icv tretmana za 36,4 % ($3,1 \pm 0,3$ nasuprot $1,9 \pm 0,1$ u kontroli, $p < 0,05$) (Slika 10C). Ekspresija IR proteina u HPT-u STZ-icv štakora nije bila promjenjena niti u jednom od ispitivanih vremenskih točaka.



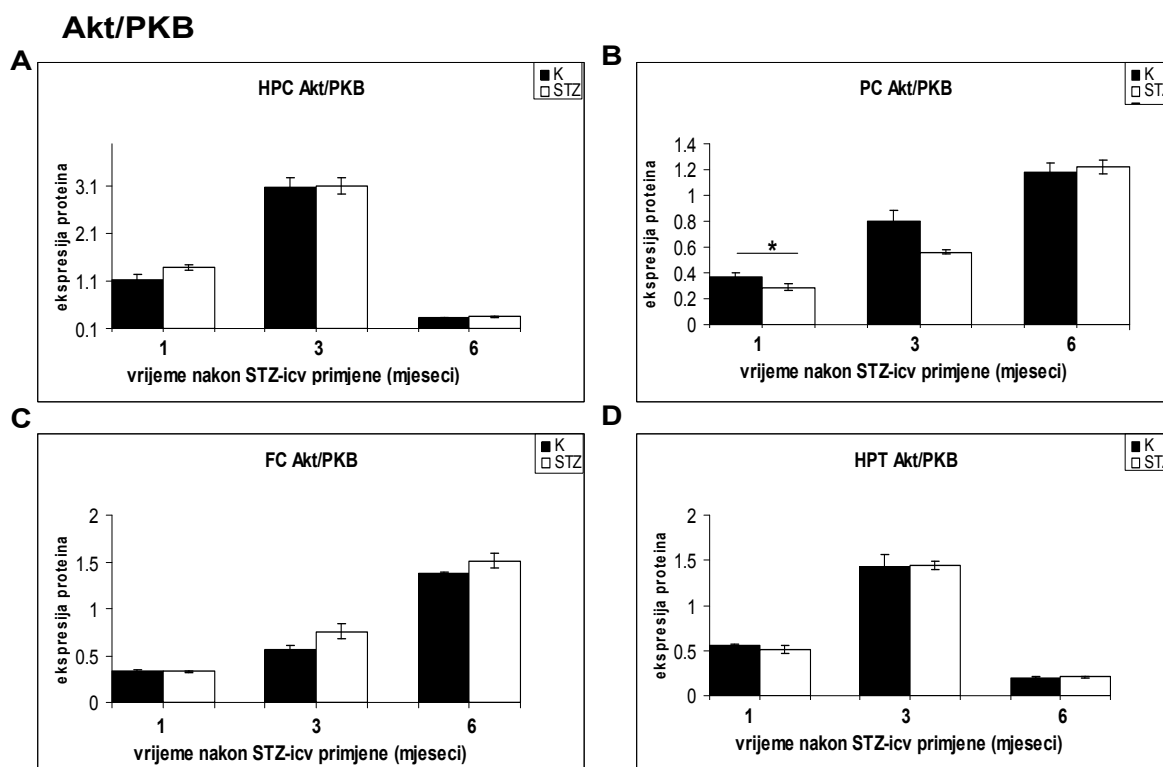
Slika 10. Ekspresija proteina inzulinskog receptora (IR) u hipokampusu (HPC), parijetalnom korteksu (PC), frontalnom korteksu (FC) i hipotalamusu (HPT) jedan, tri i šest mjeseci nakon STZ-icv primjene. A Ekspresija IR u HPC-u; B Ekspresija IR u PC-u; C Ekspresija IR u FC-u; D Ekspresija IR u HPT-u. K-kontrolna skupina, STZ-streptozotocin icv štakori. Broj štakora po grupi 4-7, rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SEM; * $p < 0,05$ u usporedbi s odgovarajućom kontrolnom skupinom prema Mann-Whitney U-test-u.



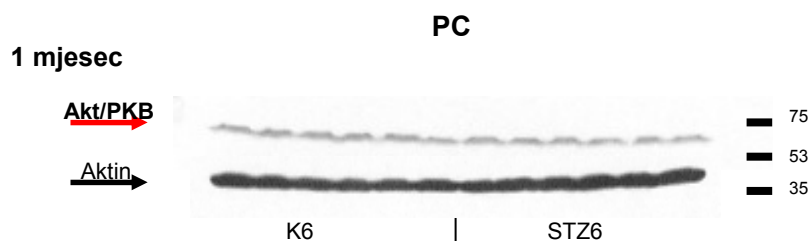
Slika 12. Prikaz Western blot slike korištene za analizu ekspresije inzulinskog receptora (IR) u hipokampusu (HPC), parijetalnom korteksu (PC) i frontalnom korteksu (FC). IR je protein koji se nalazi na ≈ 91 kDa. Aktin (≈ 51 kDa) i GAPDH (≈ 34 kDa) proteini su korišteni kao kontrola unesenog uzorka. K-kontrolna skupina, STZ-streptozotocin icv štakori. Brojevi s desne strane slike označavaju kiloDaltona.

4.2.2 Ekspresija protein kinaze B (Akt/PKB) u hipokampusu, parijetalnom korteksu, frontalnom korteksu i hipotalamusu jedan, tri, šest mjeseci nakon STZ-icv primjene

Ekspresija Akt/PKB proteina u HPC-u, FC-u i HPT-u STZ-icv štakora bila je nepromjenjena 1, 3 i 6 mjeseci nakon STZ-icv primjene u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 13 A,C i D). Ekspresija Akt/PKB proteina bila je akutno smanjena (21.6%) jedino u PC-u STZ-icv štakora 1 mjesec nakon STZ-icv primjene ($0,29 \pm 0,02$ naspram $0,37 \pm 0,03$ u kontrolnih štakora, $p < 0,05$). Tendencija sniženja nakon 3 mjeseca nije dosegla statističku značajnost (Slika 13B). Premda nije bilo značajne razlike između kontrolne i STZ-icv skupine ekspresija Akt/PKB proteina načelno je imala istu tendenciju promjena u HPC-u i HPT-u; porast nakon 3 mjeseca te sniženje nakon 6 mjeseci na vrijednosti niže od onih uočenih 1 mjesec nakon STZ icv primjene (Slika 13A i D). Nasuprot tome ekspresija Akt/PKB u obje kortikalne regije (FC, PC) pokazala je tendenciju porasta s porastom vremena nakon icv primjene u kontrolnih i u STZ-icv štakora (Slika 13B iC).



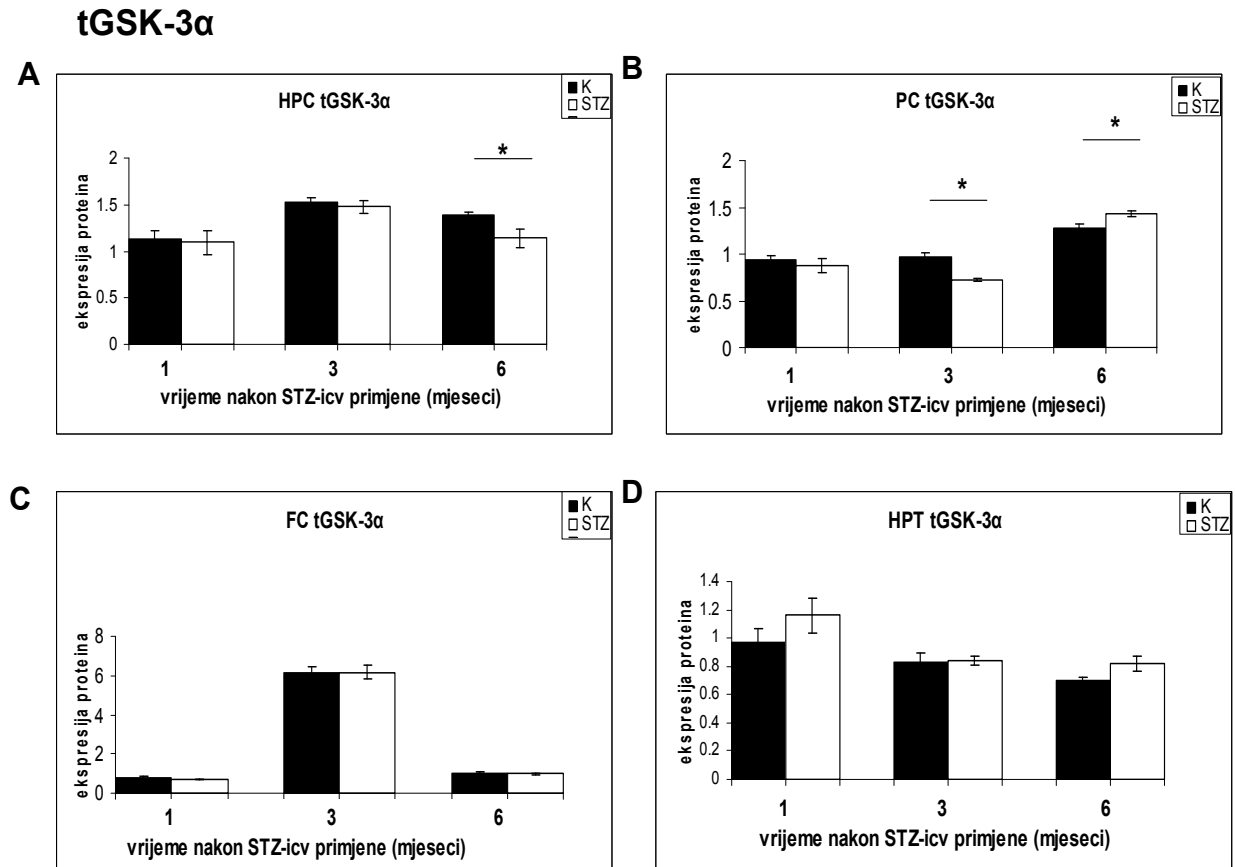
Slika 13. Ekspresija protein kinaze B (Akt/PKB) u hipokampusu (HPC) parijetalnom korteksu (PC), frontalnom korteksu (FC), hipotalamusu (HPT) jedan, tri i šest mjeseci nakon STZ-icv primjene. A Ekspresija Akt/PKB u HPC-u; B Ekspresija Akt/PKB u PC-u; C Ekspresija Akt/PKB u FC-u; D Ekspresija Akt/PKB u HPT-u. K-kontrolna skupina, STZ-streptozotocin icv štakori. Broj štakora po grupi 5-6, rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SEM; $*p < 0,05$ u usporedbi s odgovarajućom kontrolnom skupinom prema Mann-Whitney U-test-u.



Slika 14. Prikaz Western blot slike korištene za analizu ekspresije ekspresije protein kinaze B (Akt/PKB) u parijetalnom korteksu (PC) jedan mjesec nakon STZ-icv primjene. Kao kontrola unesenog uzorka korišten je aktin (≈ 51 kDa). K-kontrolna skupina, STZ-streptozotocin icv štakori. Brojevi s desne strane slike označavaju kiloDaltona.

4.2.3 Ekspresija ukupnog proteina glikogen sintaze kinaze -3 alfa enzima (tGSK-3 α) u hipokampusu, parijetalnom korteksu, frontalnom korteksu i hipotalamusu jedan, tri, šest mjeseci nakon STZ-icv primjene

Ekspresija tGSK-3 α proteina u HPC-u ostala je nepromjenjena nakon 1 i 3 mjeseca te smanjena za 18% nakon 6 mjeseci u STZ-icv tretiranih štakora ($1,14 \pm 0,1$) u usporedbi s kontrolom ($1,39 \pm 0,04$, $p < 0,05$) (Slika 15A). U odnosu na kontrolnu skupinu ekspresija tGSK-3 α proteina u PC-u STZ-icv štakora bila je smanjena (25%) nakon 3 mjeseca ($0,73 \pm 0,02$ naspram $0,97 \pm 0,05$ u kontroli, $p < 0,05$), te povišeno (13%) nakon 6 mjeseci ($1,43 \pm 0,05$ naspram $1,27 \pm 0,05$ u kontroli, $p < 0,05$) (Slika 15B). U ekspresiji tGSK-3 α proteina u FC-u i HPT-u STZ-icv štakora nije bilo promjena u usporedbi s kontrolnom skupinom niti u jednom od ispitivanih vremenskih razdoblja (Slika 15C i D). Međutim tendencija ekspresije tGSK-3 α u ove je dvije regije različita, u FC-u pokazuje porast ekspresije nakon 3 mjeseca te sniženje nakon 6 mjeseci na vrijednosti izmjerene 1 mjesec nakon icv primjene (Slika 15C). Nasuprot tome ekspresija tGSK-3 α u HPT-u pokazuje slične vrijednosti u svim promatranim vremenskim odsječcima (Slika 15D).



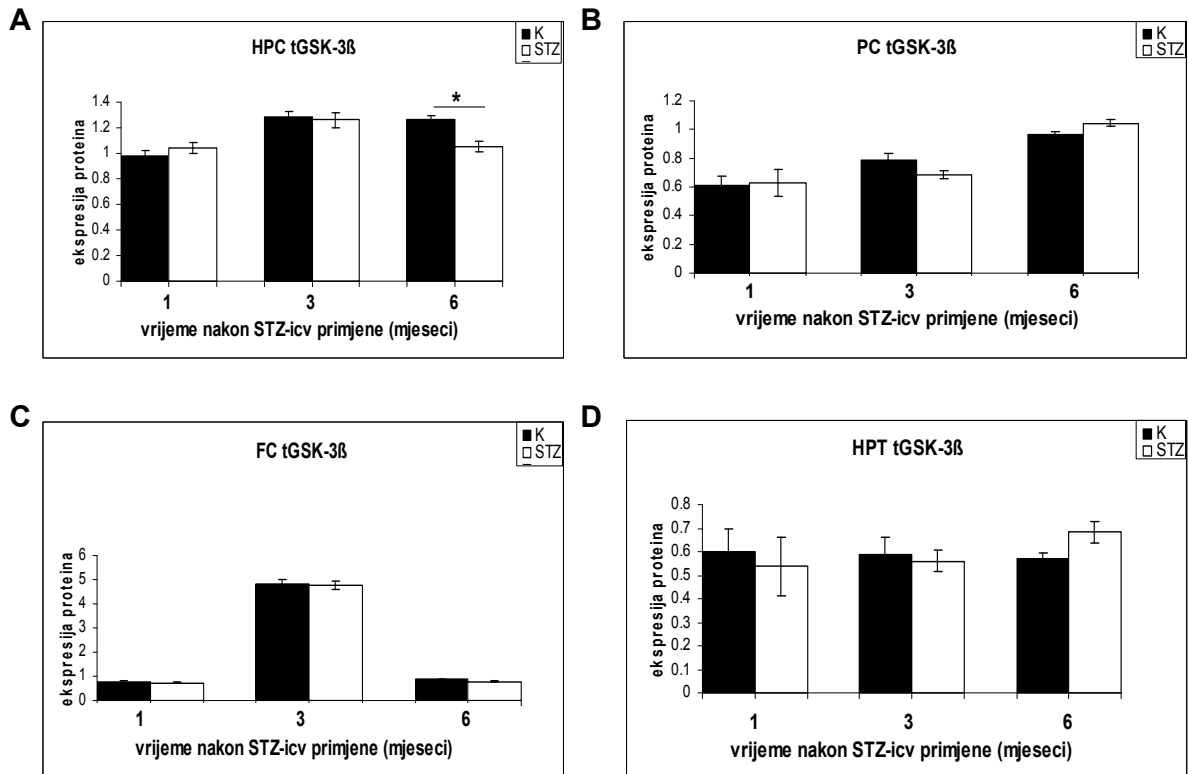
Slika 15. Ekspresija ukupnog proteina glikogen sintaze kinaze -3 alfa enzima (tGSK-3 α) u hipokampusu (HPC) parijetalnom korteksu (PC), frontalnom korteksu (FC), hipotalamusu (HPT) jedan, tri i šest mjeseci nakon STZ-icv primjene. **A** Ekspresija tGSK-3 α u HPC-u; **B** Ekspresija tGSK-3 α u PC-u; **C** Ekspresija tGSK-3 α u FC-u; **D** Ekspresija tGSK-3 α u HPT-u. **K**-kontrolna skupina, **STZ**-streptozotocin icv štakori. Broj štakora po grupi 5-6, rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SEM; * $p < 0,05$ u usporedbi s odgovarajućom kontrolnom skupinom prema Mann-Whitney U-test-u.

4.2.4 Ekspresija ukupnog proteina glikogen sintaze kinaze -3 beta enzima (tGSK-3 β) u hipokampusu, parijetalnom korteksu, frontalnom korteksu i hipotalamusu jedan, tri, šest mjeseci nakon STZ-icv primjene

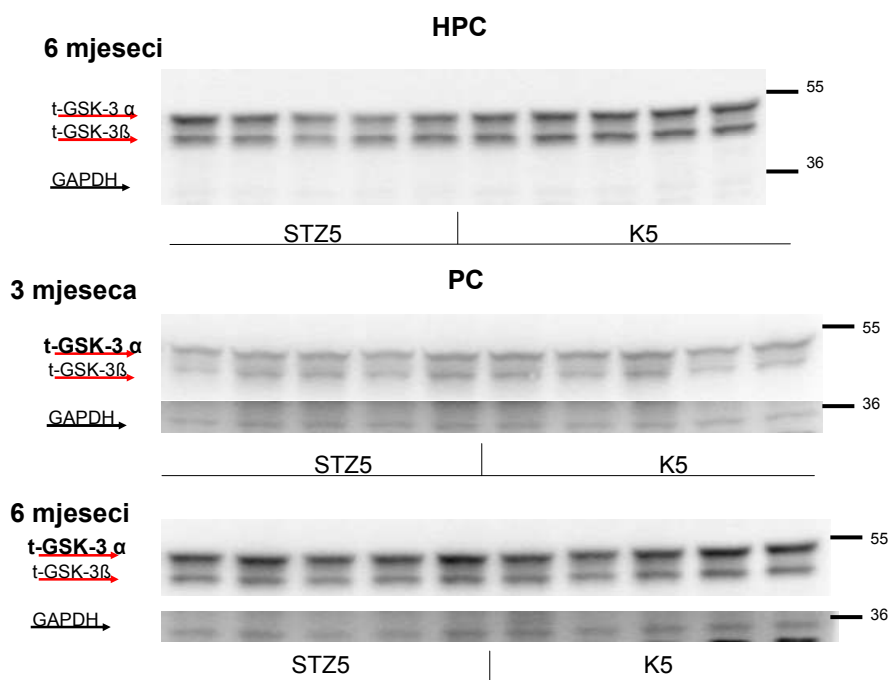
Ekspresija tGSK-3 β načelno je slična onoj od tGSK-3 α sa sniženim vrijednostima 6 mjeseci nakon STZ-icv primjene za 17% (1.05 ± 0.04) u usporedbi s kontrolom (1.26 ± 0.03) u HPC-u, te sličnim tendencijama ali bez razlike između dvije skupine u FC-u i HPT-u (Slika 16A,C,D).

U ekspresiji tGSK-3 β u PC-u nije bilo razlike među grupama te među različitim vremenskim točkama (Slika 16B)

tGSK-3 β



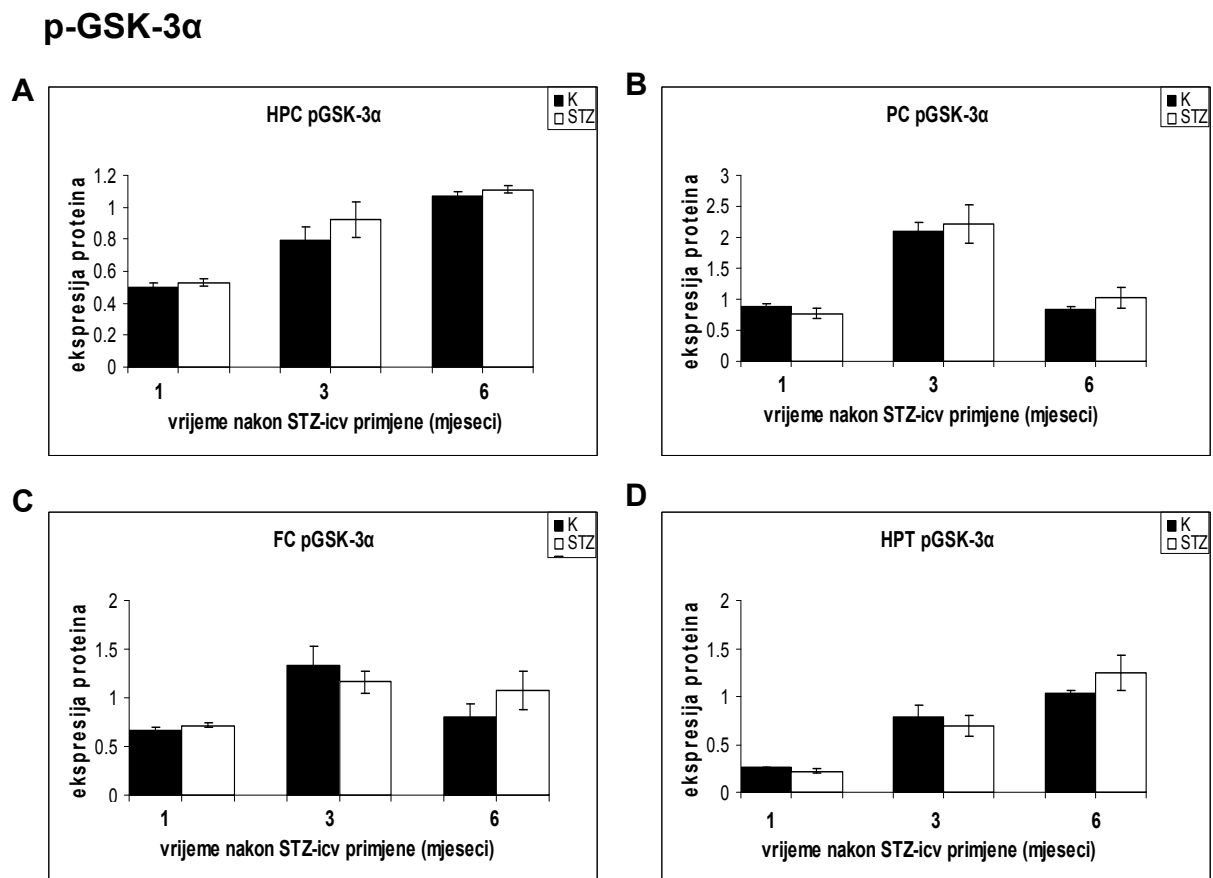
Slika 16. Ekspresija ukupnog proteina glikogen sintaze kinaze -3 beta enzima (tGSK-3 β) u hipokampusu (HPC) parijetalnom korteksu (PC), frontalnom korteksu (FC), hipotalamusu (HPT) jedan, tri i šest mjeseci nakon STZ-icv primjene. **A** Ekspresija tGSK-3 β u HPC-u; **B** Ekspresija tGSK-3 β u PC-u; **C** Ekspresija tGSK-3 β u FC-u; **D** Ekspresija tGSK-3 β u HPT-u. **K**-kontrolna skupina, **STZ**-streptozotocin icv štakori. Broj štakora po grupi 5-6, rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SEM; * $p < 0,05$ u usporedbi s odgovarajućom kontrolnom skupinom prema Mann-Whitney U-test-u.



Slika 17. Prikaz Western blot slike korištene za analizu ukupnog proteina glikogen sintaze kinaze ($t\text{-GSK-3}\alpha/\beta$) u hipokampusu (HPC) i parijetalnom korteksu (PC). $t\text{-GSK-3}\alpha$ je protein koji se nalazi na ≈ 51 kDa. GAPDH (≈ 34 kDa) proteini je korišten kao kontrola unesenog uzorka. **K**-kontrolna skupina, **STZ**-streptozotocin icv štakori. Brojevi sa desne strane slike označavaju kiloDaltona.

4.2.5 Ekspresija fosforiliranog glikogen sintaze kinaze -3 alfa enzima ($p\text{GSK-3}\alpha$) u hipokampusu, parijetalnom korteksu, frontalnom korteksu i hipotalamusu jedan, tri, šest mjeseci nakon STZ-icv primjene

Ekspresija $p\text{GSK-3}\alpha$ proteina u STZ-icv štakora ostala je nepromjenjena 1, 3, 6 mjeseci nakon STZ-icv primjene u svim ispitivanim regijama. Ekspresija $p\text{GSK-3}\alpha$ je neovisno o icv tretmanu, u HPC-u i HPT-u pokazala tendenciju porasta s vremenom proteklom nakon icv primjene u obje skupine (Slika 18A i D), dok u FC-u i PC-u doseže maksimum nakon 3 mjeseca te ponovo pada na razinu sličnu onoj nakon 1 mjeseca od STZ-icv primjene (Slika 18B i C).

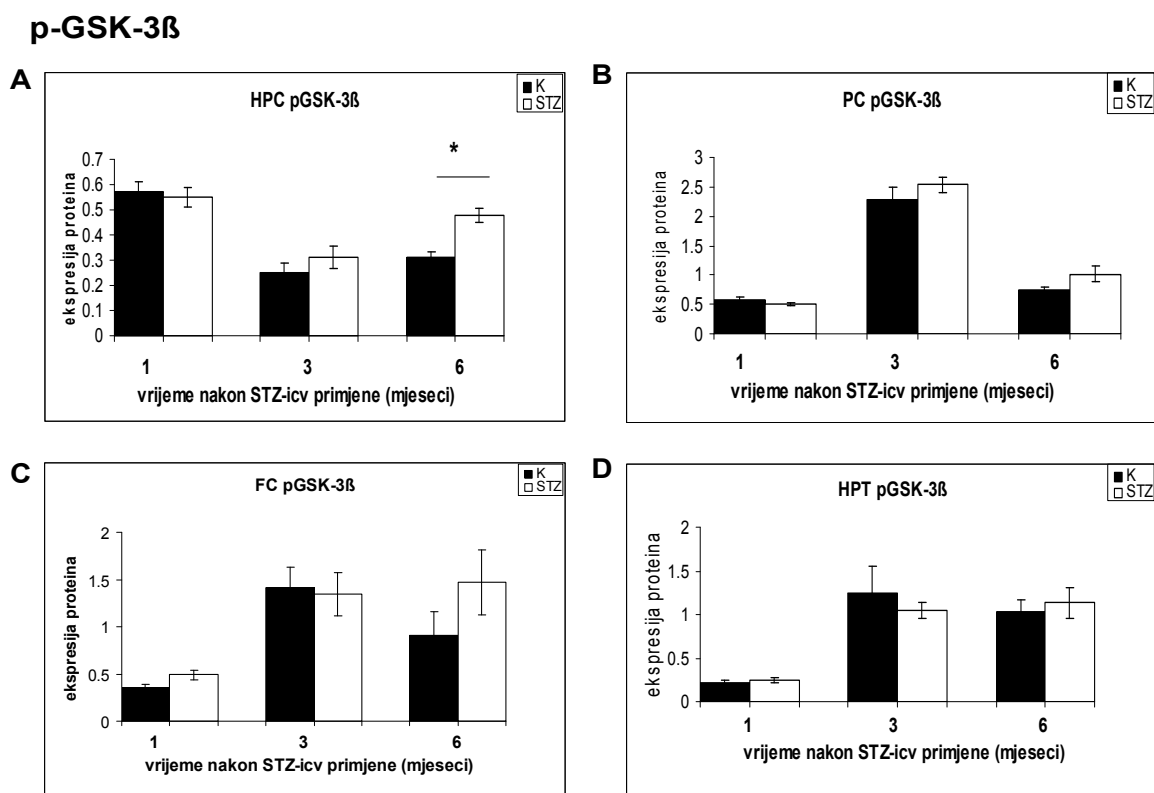


Slika 18. Ekspresija fosforiliranog glikogen sintaze kinaze -3 alfa enzima (pGSK-3 α) u hipokampusu (HPC), parijetalnom korteksu (PC), frontalnom korteksu (FC) i hipotalamusu (HPT) jedan, tri i šest mjeseci nakon STZ-icv primjene. **A** Ekspresija pGSK-3 α u HPC-u; **B** Ekspresija pGSK-3 α u PC-u; **C** Ekspresija pGSK-3 α u FC-u; **D** Ekspresija pGSK-3 α u HPT-u. **K**-kontrolna skupina, **STZ**-streptozotocin icv štakori. Broj štakora po grupi 5-6, rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SEM; * $p < 0,05$ u usporedbi s odgovarajućom kontrolnom skupinom prema Mann-Whitney U-test-u.

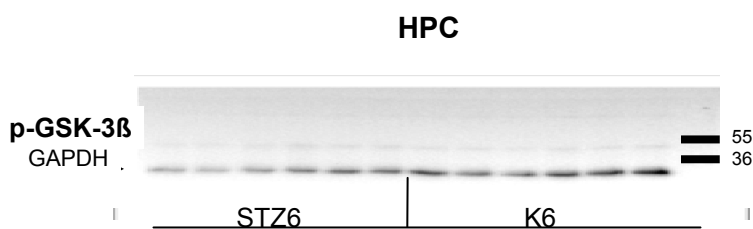
4.2.6 Ekspresija fosforiliranog glikogen sintaze kinaze -3 beta enzima (pGSK-3 β) u hipokampusu, parijetalnom korteksu, frontalnom korteksu i hipotalamusu jedan, tri, šest mjeseci nakon STZ-icv primjene

Ekspresija pGSK-3 β proteina u HPC-u STZ-icv štakora povišena je za 54% ($0,48 \pm 0,03$) u usporedbi s kontrolnom skupinom ($0,31 \pm 0,02$, $p < 0,05$) 6 mjeseci nakon STZ-icv primjene (Slika 18A). S druge strane ekspresija pGSK-3 β proteina je u ostalim promatranim regijama

(PC, FC i HPT) STZ-icv štakora ostala nepromijenjena u usporedbi s kontrolnom skupinom u svim ispitivanim vremenskim razdobljima (Slika 18 B,C i D).



Slika 19. Ekspresija fosforiliranog glikogen sintaze kinaze -3 beta enzima (pGSK-3 β) u hipokampusu (HPC) parijetalnom korteksu (PC), frontalnom korteksu (FC) i hipotalamusu (HPT) jedan, tri i šest mjeseci nakon STZ-icv primjene. **A** Ekspresija pGSK-3 β u HPC-u; **B** Ekspresija pGSK-3 β u PC-u; **C** Ekspresija pGSK-3 β u FC-u; **D** Ekspresija pGSK-3 β u HPT-u. **K**-kontrolna skupina, **STZ**-streptozotocin icv štakori. Broj štakora po grupi 5-6, rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SEM; * $p < 0,05$ u usporedbi s odgovarajućom kontrolnom skupinom prema Mann-Whitney U-test-u.

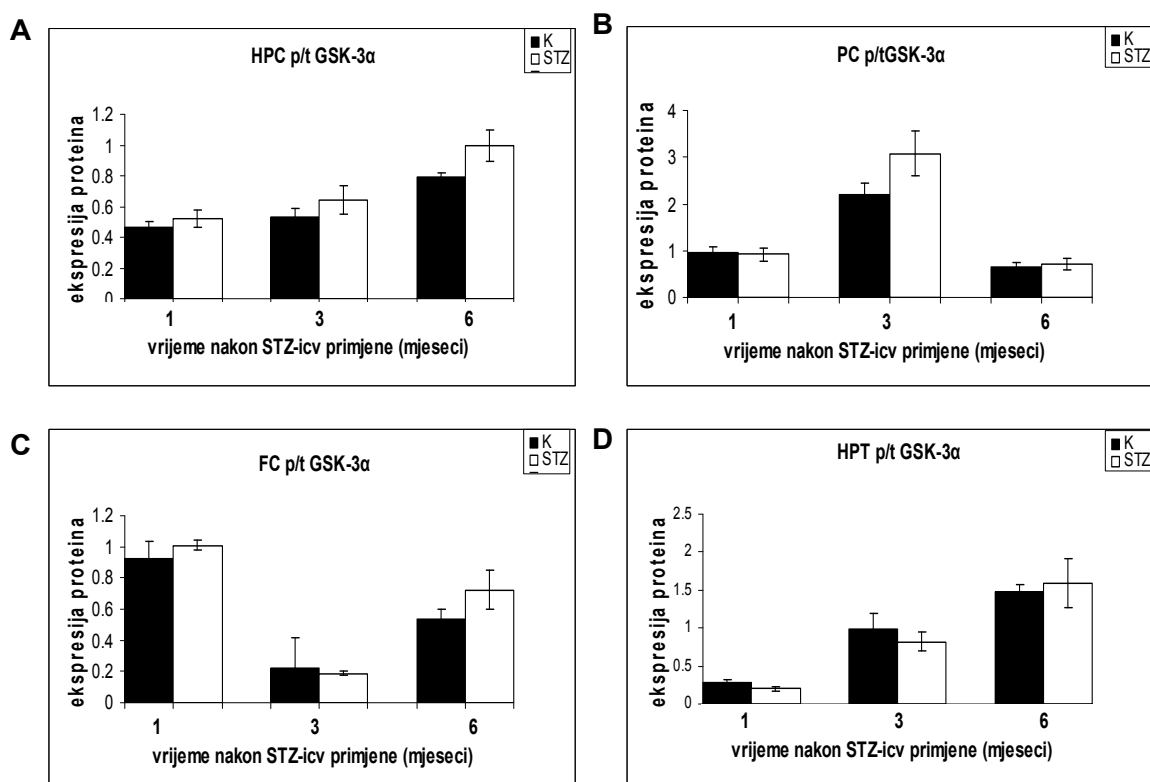


*Slika 20. Prikaz Western blot slike korištene za analizu fosforiliranog glikogen sintaze kinaze enzima (p-GSK-3β) u hipokampusu (HPC). p-GSK-3β je protein koji se nalazi na ≈ 51 kDa. GAPDH (≈ 34 kDa) proteini je korišten kao kontrola unesenog uzorka. **K**-kontrolna skupina, **STZ**-streptozotocin icv štakori. Brojevi s desne strane slike označavaju kiloDaltona.*

4.2.7 Omjer fosforiliranog i ukupnog glikogen sintaze kinaze -3 alfa enzima (p/tGSK-3α) u hipokampusu, parijetalnom korteksu, frontalnom korteksu i hipotalamusu jedan, tri, šest mjeseci nakon STZ-icv primjene

Omjer p/tGSK-3α nije bio promjenjen u promatranim regijama mozga u STZ-icv štakora u usporedbi s kontrolnom skupinom (Slika 21). U HPC-u i HPT-u se vidi da omjer p/t GSK-3α raste s vremenom u obje skupine dok se takav porast ne vidi u drugim regijama (Slika 21A i D). Porast u HPC-u je izraženiji u STZ-icv štakora u usporedbi s kontrolnom skupinom, ali nije statistički značajan (Slika 21A). S druge strane u HPT-u je taj porast izraženiji u kontrolnoj skupini ali također bez statističke značajnosti (Slika 21D). Promjena p/t GSK-3α omjera u dvije kortikalne regije (FC,PC) pokazuje obrnutu sliku s najvišim vrijednostima nakon 3 mjeseca te najnižim nakon 1 i 6 mjeseci u PC-u, dok su u FC-u najviše vrijednosti nakon 1 i 6 mjeseci, a najniže nakon 3 mjeseca (Slika 21 B i C).

p/t GSK-3 α

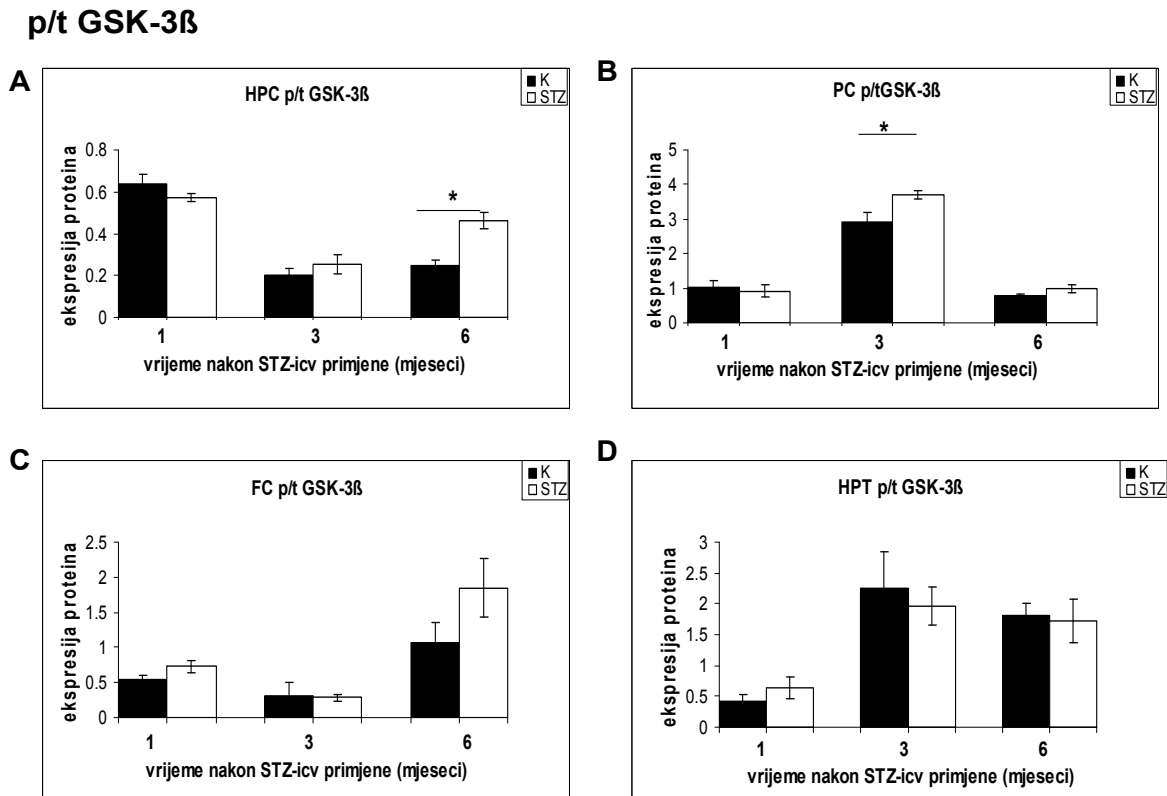


Slika 21. Omjer fosforiliranog i ukupnog glikogen sintaze kinaze -3 alfa enzima (p/tGSK-3 α) u hipokampusu (HPC), parijetalnom korteksu (PC), frontalnom korteksu (FC) i hipotalamusu (HPT) jedan, tri, šest mjeseci nakon STZ-icv primjene. **A** Ekspresija p/tGSK-3 α u HPC-u; **B** Ekspresija p/tGSK-3 α u PC-u; **C** Ekspresija p/tGSK-3 α u FC-u; **D** Ekspresija p/tGSK-3 α u HPT-u. **K**-kontrolna skupina, **STZ**-streptozotocin icv štakori. Broj štakora po grupi 5-6, rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SEM; * $p < 0,05$ u usporedbi s odgovarajućom kontrolnom skupinom prema Mann-Whitney U-test-u.

4.2.8 Omjer fosforiliranog i totalnog glikogen sintaze kinaze -3 beta enzima (p/tGSK-3 β) u hipokampusu, parijetalnom korteksu, frontalnom korteksu i hipotalamusu jedan, tri, šest mjeseci nakon STZ-icv primjene

Šest mjeseci nakon STZ-icv primjene nađen je značajno povišen (53%) omjer p/t GSK-3 β u HPC-u STZ-icv štakora ($0,46 \pm 0,04$) u usporedbi s kontrolnom skupinom ($0,25 \pm 0,02$, $p < 0,05$) (Slika 21A). Povišen omjer p/t GSK-3 β također je nađen u PC-u STZ-icv štakora 3 mjeseca nakon STZ-icv primjene ($p < 0,05$) (Slika 21B). U ostalim vremenskim razdobljima u HPC-u i PC-u nije bilo značajnih promjena među grupama, kao niti u FC-u i HPT-u (Slika 21). Šest

mjeseci nakon STZ-icv primjene u FC-u postoji tendencija rasta omjer p/t GSK-3 β u STZ-icv tretiranih štakora u usporedbi s kontrolnom skupinom, međutim taj rast nije statistički značajan zbog izražene grupne varijabilnosti (Slik 21C). Promjene omjera p/t GSK-3 β načelno slijede vremenski obrazac promjena omjera p/t GSK-3 α u PC-u i HPT-u, a ne podudaraju se u HPC-u i FC-u što upućuje na regionalnu specifičnost i razlike između dvije GSK-3 izoforme enzima.

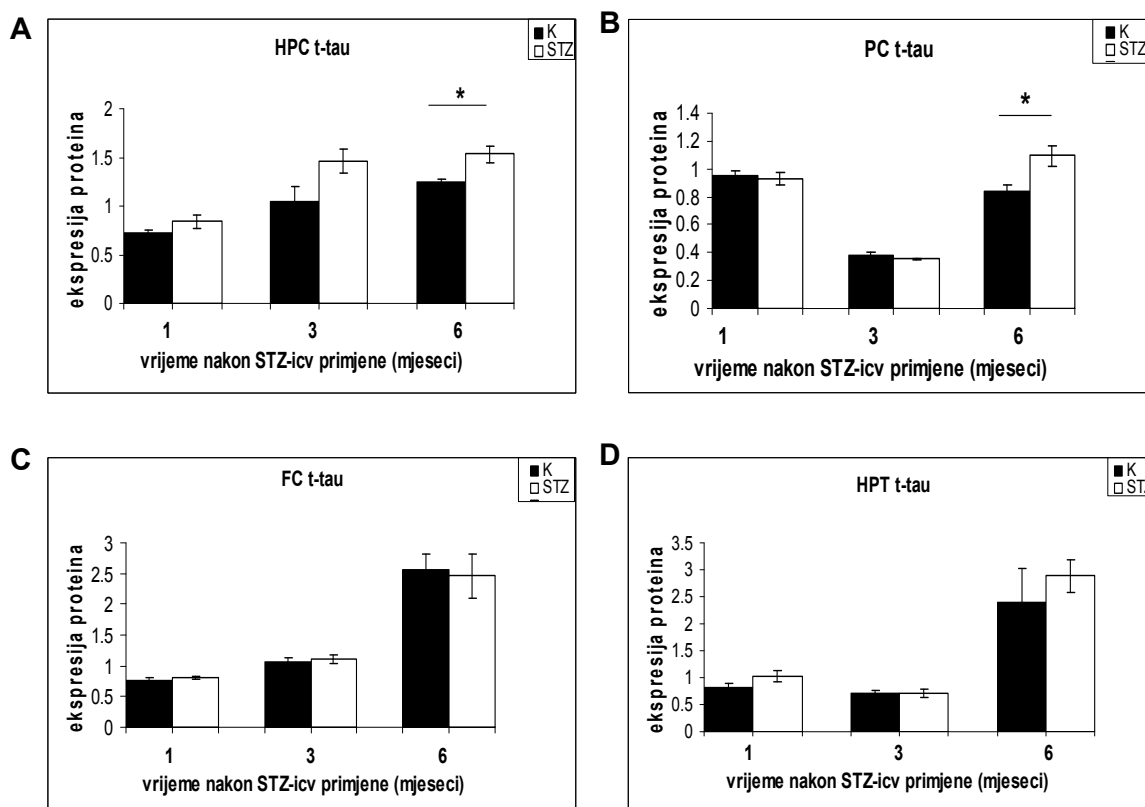


Slika 21. Omjer fosforiliranog i totalnog glikogen sintaze kinaze -3 beta enzima (p/tGSK-3 β) u hipokampusu, parijetalnom korteksu, frontalnom korteksu i hipotalamusu jedan, tri, šest mjeseci nakon STZ-icv primjene. **A** Ekspresija p/tGSK-3 β u HPC-u; **B** Ekspresija p/tGSK-3 β u PC-u; **C** Ekspresija p/tGSK-3 β u FC-u; **D** Ekspresija p/tGSK-3 β u HPT-u. **K**-kontrolna skupina, **STZ**-streptozotocin icv štakori. Broj štakora po grupi 5-6, rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SEM; * $p < 0,05$ u usporedbi s odgovarajućom kontrolnom skupinom prema Mann-Whitney U-test-u.

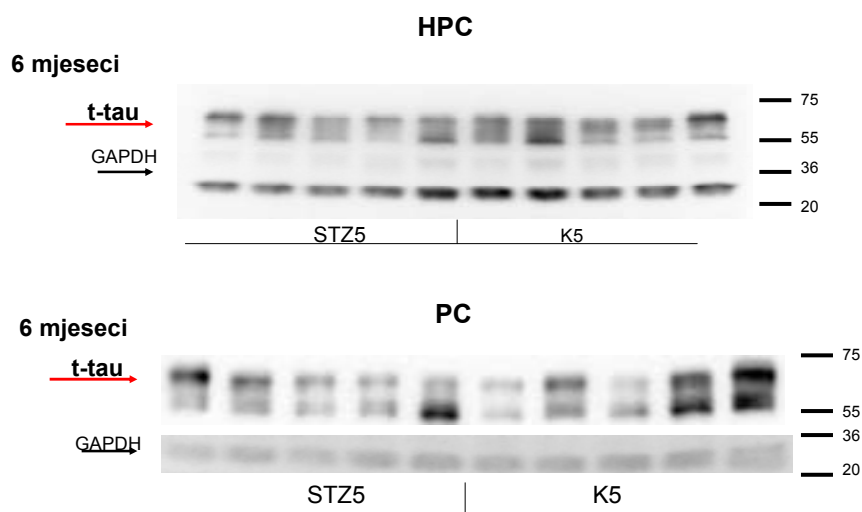
4.2.9 Ekspresija ukupnog tau proteina (t-tau) u hipokampusu, parijetalnom korteksu, frontalnom korteksu i hipotalamusu jedan, tri, šest mjeseci nakon STZ-icv primjene

Iako u STZ-icv štakora postoji tendencija porasta ekspresija t-tau proteina u HPC-u već nakon 3 mjeseca, statistički značajni porast nađen je tek 6 mjeseci nakon STZ-icv primjene za 23% ($1,54 \pm 0,09$) u odnosu na kontrolnu grupu ($1,25 \pm 0,03$, $p < 0,05$) (Slika 23A). Slično kao u HPC-u i u PC-u je nađen porast ekspresije t-tau proteina za 23,7% 6 mjeseci nakon STZ-icv primjene ($p < 0,05$), dok u ranijim vremenskim točkama nije bilo promjene u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 23B). Ekspresija t-tau proteina u preostale dvije regija (FC i HPT) STZ-icv štakora nije bila promjenjena niti u jednom promatranom vremenskom odsječku. U FC-u i HPT-u je, neovisno o icv tretmanu, ekspresija t-tau imala tendenciju porasta kroz promatrane vremenske točke s maksimalnom ekspresijom 6 mjeseci nakon STZ-icv primjene (Slika 22C i D)

t-tau



Slika 23. Ekspresija ukupnog tau proteina (t-tau) u hipokampusu (HPC) parijetalnom korteksu (PC), frontalnom korteksu (FC) i hipotalamusu (HPT) jedan, tri i šest mjeseci nakon STZ-icv primjene. **A** Ekspresija t-tau u HPC-u; **B** Ekspresija t-tau u PC-u; **C** Ekspresija t-tau u FC-u; **D** Ekspresija t-tau u HPT-u. **K**-kontrolna skupina, **STZ**-streptozotocin icv štakori. Broj štakora po grupi 5-6, rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SEM; * $p < 0,05$ u usporedbi s odgovarajućom kontrolnom skupinom prema Mann-Whitney U-test-u.

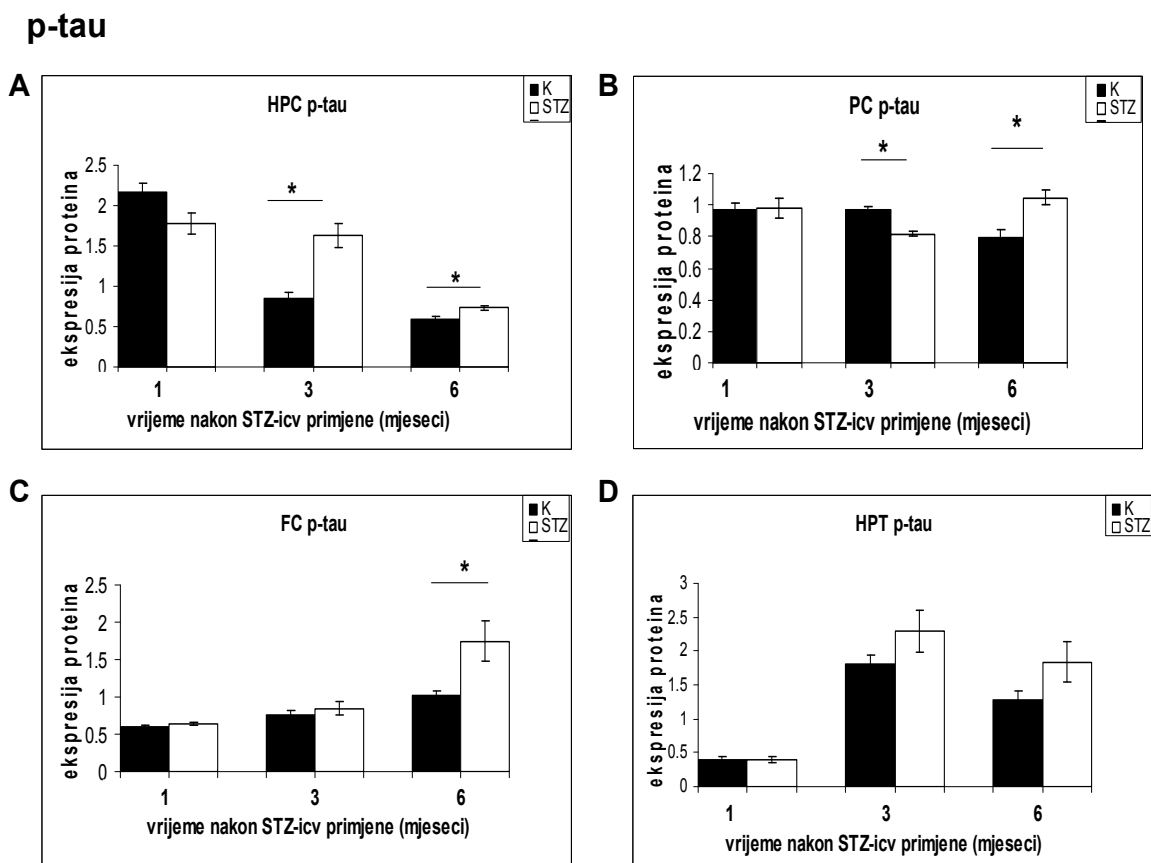


Slika 24. Prikaz Western blot slike korištene za analizu ekspresije ukupnog tau proteina (*t-tau*) u hipokampusu (HPC) i parijetalnom korteksu (PC) šest mjeseci nakon STZ-icv tretmana. Ukupni tau protein nalazi se približno na 66 kDa. GAPDH (≈ 34 kDa) protein je korišten kao kontrolu unesenog uzorka. **STZ**-streptozotocin icv štakori, **K**-kontrolna skupina. Brojevi sa desne strane slike označavaju kiloDalton.

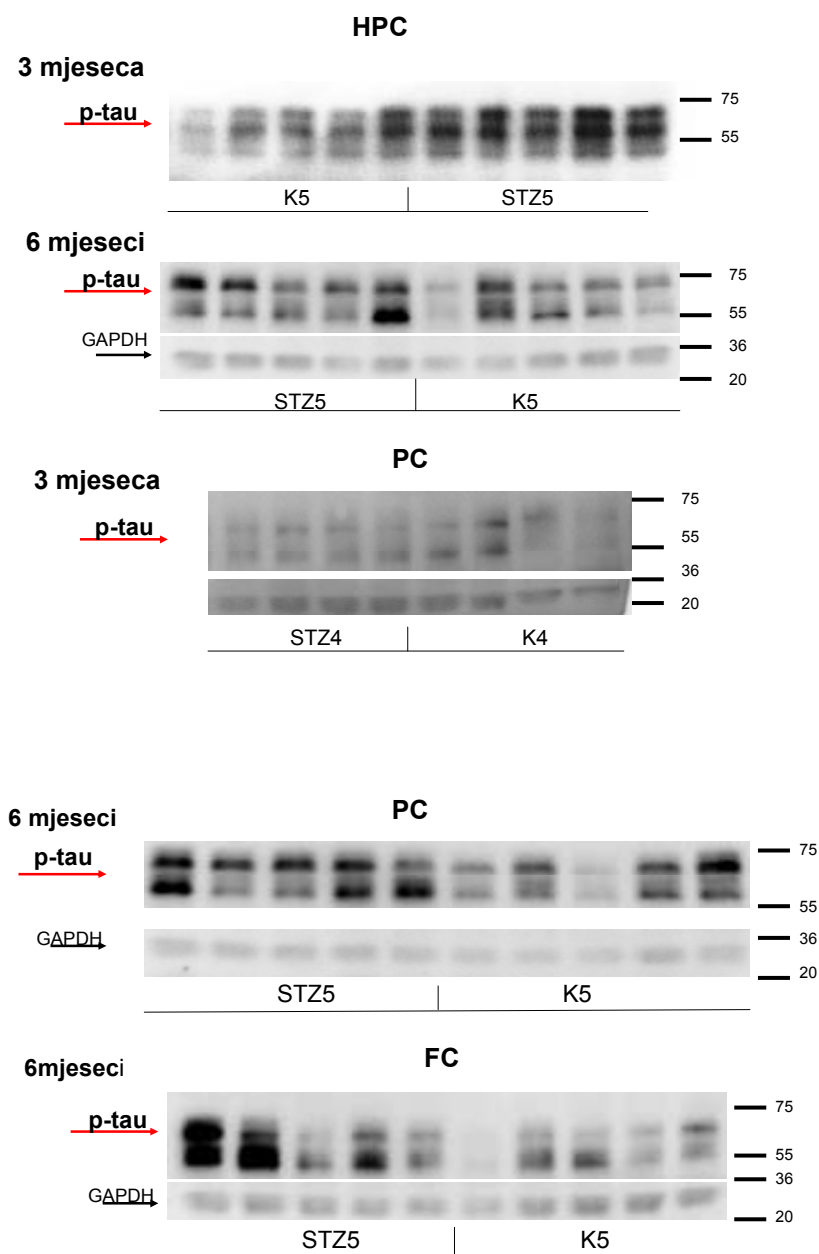
4.2.10 Ekspresija fosforiliranog tau proteina (*p-tau*) u hipokampusu, parijetalnom korteksu, frontalnom korteksu i hipotalamusu jedan, tri, šest mjeseci nakon STZ-icv primjene

Za analizu fosforiliranog tau proteina koristili smo protutjelo PHF-1 (Ser 396/404) i antitjelo smo za fosforilaciju na Ser 396 (Anti-phospho-tau 396), koji upućuju na fosforiliranost tau proteina od strane GSK-3 β , cdk5 ili ERK 1/2 (Cheung CH). Ekspresija *p-tau* proteina u HPC-u STZ-icv štakora povećana je nakon 3 mjeseca za 90% ($1,63 \pm 1,15$) u odnosu na kontrolnu grupu ($0,9 \pm 0,07$; $p < 0,05$) i nakon 6 mjeseci za 25 % ($0,73 \pm 0,03$) u odnosu na kontrolu ($0,58 \pm 0,05$; $p < 0,05$) (Slika 25A). Ekspresija *p-tau* proteina u PC-u STZ-icv štakora bila je smanjeno za 19% ($0,82 \pm 0,01$) nakon 3 mjeseca u odnosu na kontrolnu grupu ($0,97 \pm 0,02$; $p < 0,05$), dok je nakon 6 mjeseci bila povećana za 24% ($0,79 \pm 0,06$) u odnosu na kontrolnu grupu ($1,05 \pm 0,05$; $p < 0,05$) (Slika 25B). Ekspresija *p-tau* proteina u FC-u STZ-icv štakora

povišena je nakon 6 mjeseci za 71% ($1,75 \pm 0,3$) u odnosu na kontrolnu grupu ($1,02 \pm 0,06$; $p < 0,05$) (Slika 25C). Unatoč tendenciji porasta nakon 3 i 6 mjeseci ekspresija p-tau proteina u HPT-u STZ-icv štakora nije bilo statistički značajne promjenjena.



Slika 25. Ekspresija fosforiliranog tau proteina (p-tau) u hipokampusu (HPC) parijetalnom korteksu (PC), frontalnom korteksu (FC) i hipotalamusu (HPT) jedan, tri i šest mjeseci nakon STZ-icv primjene. A Ekspresija p-tau u HPC-u; B Ekspresija p-tau u PC-u; C Ekspresija p-tau u FC-u; D Ekspresija p-tau u HPT-u. K-kontrolna skupina, STZ-streptozotocin icv štakori. Broj štakora po grupi 4-6, rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SEM; * $p < 0,05$ u usporedbi s odgovarajućom kontrolnom skupinom prema Mann-Whitney U-test-u.



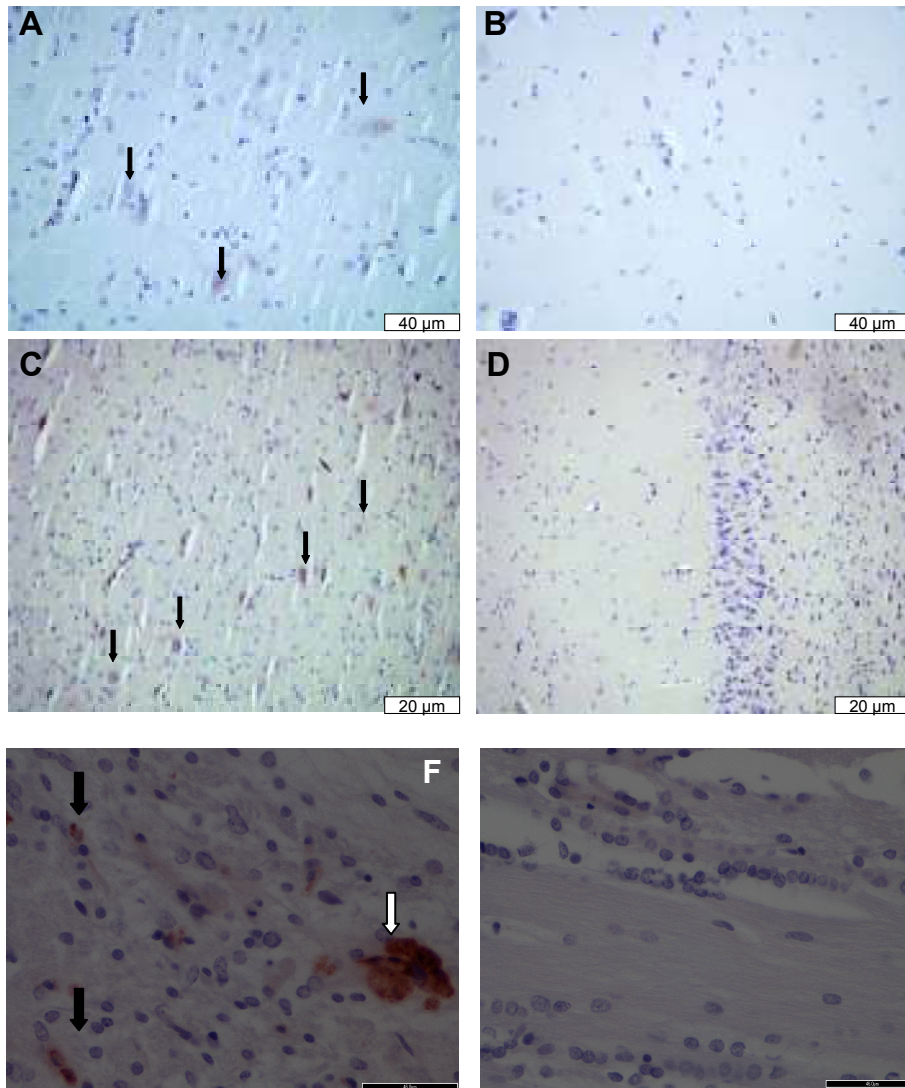
*Slika 26. Prikaz Western blot slike korištene za analizu ekspresije fosforiliranog tau proteina (p-tau) u hipokampusu (HPC), parijetalnom korteksu (PC) i frontalnom korteksu (FC) tri i šest mjeseci nakon STZ-icv tretmana.. Fosforilirani tau protein nalazi se približno na 66 kDa a upućuje na fosforilaciju s GSK-3 β i cdk5. GAPDH (\approx 34 kDa) protein je korišten kao kontrola unesenog uzorka. **STZ**-streptozotocin icv štakori, **K**-kontrolna skupina. Brojevi s desne strane slike označavaju kiloDalton.*

4.3 Histologija

4.3.2 Imunohistokemija A β ₁₋₄₂

Za detekciju patološkog nakupljanja β amiloida koristilo se A β ₁₋₄₂ antitijelo, koje se specifično veže na C-terminalni dio A β ₁₋₄₂, a ne veže se na A β ₁₋₄₀ niti na cijelu molekulu APP-a. Imunohistokemija je rađena na serijskim rezovima mozgovu jedan, tri i šest mjeseci nakon STZ-icv primjene. Na mjestu gdje se antitijelo vezalo za A β ₁₋₄₂ razvila se crvena boja.

Ovim postupkom mjesec dana nakon STZ-icv primjene nije nađen A β ₁₋₄₂ pozitivni (crveno obojeni) signal u mozgu ni u kontrolnih niti u STZ-icv štakora. Tri mjeseca nakon STZ-icv primjene nađen je pozitivan A β ₁₋₄₂ signal na serijskim rezovima mozga unutar neurona hipokampusa i korteksa u štakora koji su primili STZ-icv dok takvog signala u istoj regiji nije bilo u kontrolnih štakora (Slika 27 A,C). Šest mjeseci nakon STZ-icv primjene na serijskim rezovima mozga nađene su izvanstanične nakupine A β ₁₋₄₂ crvenog signala u HPC-u koje su bojom i izgledom bile slične plakovima nađenim u mozgu oboljelih od sAD-u. (Slika 27 E)

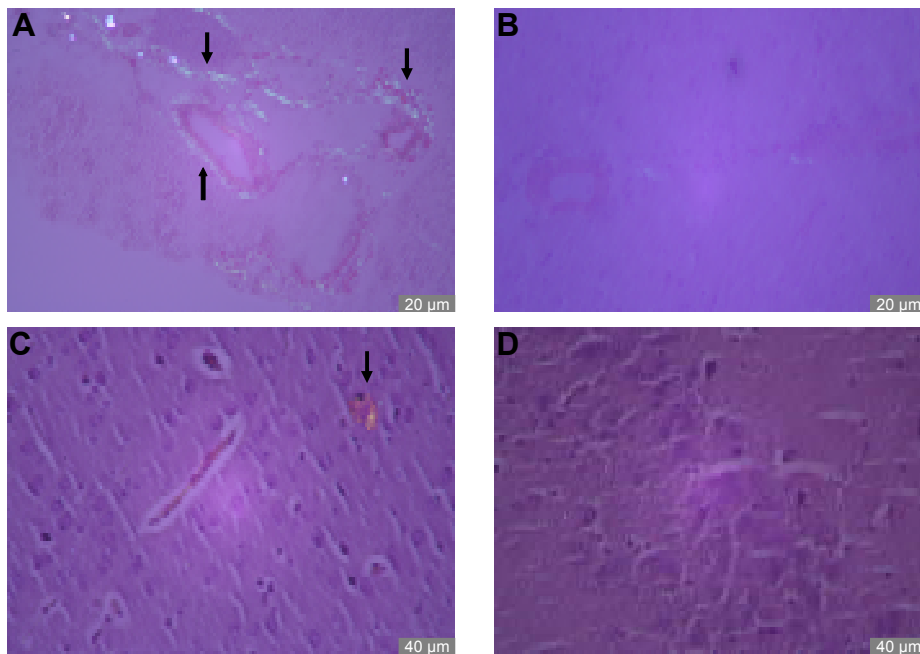


Slika 27. Imunohistokemija Abeta 1-42 ($A\beta$ 1-42) jedan, tri i šest mjeseci nakon središnje primjene streptozotocina (STZ-icv). (A) Intraneuronalno nakupljanje $A\beta$ 1-42 u HPC-u (crne strelice) tri mjeseca nakon STZ-icv primjene, u kontrolnoj skupini (B) nema takvih nakupina (C) Intraneuronalno nakupljanje $A\beta$ 1-42 u korteksu (crne strelice) tri mjeseca nakon STZ-icv primjene, u kontrolnoj skupini (D) nema takvih nakupina. (E) Izvanstanične nakupine u HPC-u slične plakovima (označeno bijelom strelicom) te intraneuronalno nakupljanje u HPC-u (crne strelice) $A\beta$ 1-42 šest mjeseci nakon STZ-icv primjene. U kontrolnih štakora šest mjeseci nakon STZ-icv tretmana (F) nema izvanstaničnih nakupina $A\beta$ 1-42 sličnih plakovima niti intraneuronalnog nakupljanja $A\beta$ 1-42.

4.3.3 Kongo red bojanje

Kongo red bojanje korišteno je za detekciju amiloida na parafinskim serijskim rezovima jedan, tri i šest mjeseci nakon STZ-icv primjene. Amiloid na koji se vezala kongo red boja autofluorescira zeleno (pozitivan signal) u polariziranom svjetlu mikroskopa.

Jedan mjesec nakon STZ-icv primjene nije nađena autoflorescencija u štakora tretiranih STZ-icv niti u kontrolnih štakora. Tri mjeseca nakon STZ-icv primjene nađen je pozitivan signal u meningealnim kapilarama štakora tretiranih sa STZ-icv dok takvog signala nije bilo u kontrolnih štakora (Slika 28). Šest mjeseci nakon STZ-icv primjene pozitivan signal u krvnim žilama HPC-a i dalje perzistira te se uz to nalazi i pozitivan signal izvanstaničnog nakupljanja β amiloida u moždanom tkivu HPC-a STZ-icv štakora, koji nije nađen u kontrolnih štakora (Slika 28).



Slika 28. Kongo red bojanje jedan tri i šest mjeseci nakon središnje primjene streptozotocina (STZ-icv). (A) Tri mjeseca nakon STZ-icv primjene vide se kongofilne nakupine u meningealnim kapilarama. (B) U kontrolnih štakora tri mjeseca nakon icv primjene otapala nema kongofilnih nakupina u krvnim žilama. (C) Šest mjeseci nakon STZ-icv tretmana kongofilne nakupine vide se i u krvnim žilama unutar moždanog tkiva (HPC). (D) Moždano tkivo kontrolnih štakora šest mjeseci nakon icv primjene otapala ne pokazuje pozitivan signal u polarizacijskom svijetlu mikroskopa.

STZ-icv	HPC			PC			FC		
	1m	3m	6m	1m	3m	6m	1m	3m	6m
IR	↓	↓	↓	↓					↓
Akt/PKB				↓					
GSK-3α			↓		↓	↓			
GSK-3β			↓						
pGSK-3α									
pGSK-3β			↑						
p/tGSK-3α									
p/tGSK-3β			↑		↑				
t-tau			↑			↑			
p-tau		↑	↑		↑	↑			↑
Aβ₁₋₄₂ u neuronima		+	+		+	+			
Aβ₁₋₄₂ nakupine slične plakovi			+						

Slika 29. Sažetak rezultata ekspresije proteina u hipotalamusu (HPC), parietalnom (PC) i frontalnom korteksu (FC) 1,3,6 mjeseci nakon STZ-icv primjene. IR-inzulinski receptor, Akt/PKB-protein kinaza B, GSK-3 α -glikogen sintetaza kinaza 3 α , GSK-3 β - glikogen sintetaza kinaza 3 β , pGSK-3 α -fosforilirana glikogen sintetaz kinaza 3 α , pGSK-3 β -fosforilirana glikogen sintetaz kinaza 3 β , p/tGSK-3 α - omjer fosforilirani /ukupni glikogen sintetaz kinaza 3 α , p/tGSK-3 β - omjer fosforilirani /ukupni glikogen sintetaz kinaza 3 β , t-tau –ukupni tau protein, p-tau-fosforilirani tau protein (kojeg fosforilira GSK-3 β , Cdk5 i ERK 1/2), A β -amiloid beta. ↑=porast vrijednosti; ↓=sniženje vrijednosti; +=prisutnost promjena.

5. RASPRAVA

STZ-icv model koristi se već 30 godina ali je još uvijek nedovoljno karakteriziran posebno u odnosu na vremenski tijek promjena dužih od 3 mjeseca nakon STZ-icv primjene. Većina istraživanja vezanih uz ovaj model odnosi se na istraživanja središnjeg kolinergičkog sustava i promjena vezanih uz oksidativni stres u hipokampusu i to u vremenskom odsječku 2 tjedna do 3 mjeseca nakon STZ-icv primjene. Nasuprot tome, u vrijeme kad smo započeli ovo istraživanje, promjene inzulinskog sustava u mozgu nisu uopće bile istražene. U ovom su se istraživanju stoga ispitivale kognitivne promjene i promjene inzulinske signalizacije u različitim regijama mozga (hipokampus /HPC/, parijetalni korteks /PC/, frontalni korteks /FC/ i hipotalamus /HPT/), kroz razdoblje od 1 do 6 mjeseci nakon STZ-icv primjene. Deficite učenja i pamćenja koji su u STZ-icv štakorskom modelu uočeni već ranije ali praćeni samo do 3 mjeseca nakon STZ-icv primjene (151,164) ispitivali smo pomoću dva standardna test, koja se primjenjuju već desetljećima u testiranju spoznajnih funkcija, test plivanja u labirintu (MWM) i test pasivnog izbjegavanja elektrošoka (PA) (227,229,230).

Rezultati ovog istraživanja dobiveni MWM testom pokazuju da je oštećenje prostornog učenja i pamćenja prisutno već nakon 1 mjeseca te perzistira u jednakoj mjeri 3 i 6 mjeseci nakon STZ-icv tretmana. U ovom istraživanju nismo ispitivali kognitivne funkcije ranije od 1 mjeseca, ali naša prijašnja istraživanja kao i istraživanja drugih autora pokazuju da se kognitivni deficit pojavljuje 2 tj nakon STZ-icv primjene (151,164,183). U procesu prostornog učenje i pamćenja za pohranu, te ponovno prizivanje (prisjećanje) u najvećoj je mjeri zaslužan hipokampus te njegove veze s drugim djelovima mozga kao što su septum i parijetalni korteks (228,231,232). Pri izvođenju MWM testa štakori također moraju imati očuvano proceduralno pamćenje jer inače ne bi mogli naučiti plivati te moraju biti motivirani za plivanje (233). Ovim se testom testira prostorna referetna memorija koju predstavlja vrijeme provedeno u ciljnom odjeljku te radna memorija koju predstavlja broj pogrešaka (228,233,234). STZ-icv štakori proveli su manje vremena u ciljnom odjeljku što pokazuje oštećenje referetne memorije, te su pri tome napravili više pogrešaka u usporedbi s kontrolnom skupinom što upućuje na oštećenje radne memorije (Slika 9 A i B). Vrijeme koje im je potrebno da dođu do postolja tijekom 4 uzastopna dana kada uče kako naći postolje se skraćuje što pokazuje da STZ-icv štakori još imaju sposobnost učenja jer mogu naučiti lokaciju postolja, ali za to im treba više vremena tj. njihovo zapamćivanje je lošije u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 6A). Istraživanja su pokazala da oštećenje kolinergičkog septohipokampalnog puta dovodi do oštećenja radne memorije, dok samo oštećenje hipokampusa dovodi do oštećenja obje vrste memorije (235). Iako u ovom istraživanju nije ispitivan kolinergički deficit u mozgu STZ-icv štakora njegovo je postojanje dokazano u

radovima drugih autora (163,168,167,171). Nasuprot tome, oštećenje hipokampusa na razini signalizacije IR prikazano je u ovom istraživanju, a radovi drugih autora objavljenih u vrijeme naših istraživanja također jasno upućuju na oštećenje HPC-a i na drugim razinama (185,186,187).

PA, s druge strane, testira strahom motivirano učenje i pamćenje za čiju je pohranu i ponovno prizivanje potrebna u najvećoj mjeri funkciju dorzalnog hipokampusa te njegove veze s septumom, entorinalnim, peririnalnim i parijetalnim korteksom (230,236). Test je baziran na asocijativnom učenju gdje štakor mora povezati stimulaciju elektrošokom sa specifičnim ponašanjem (ne ulaženje u crni odjeljak) (233). Novija istraživanja upućuju na to da i amigdala imaju utjecaj na pohranu podataka tijekom PA testa u toj mjeri da upozoravaju hipokampus na opasnost, a hipokampus onda određuje koja je to razina opasnosti (230,237). Poremećaji na razini amigdala nisu dio ovog istraživanja, niti postoji istraživanje u STZ-icv modelu koji se bavi amigdalom, no s obzirom da je postšok latencija ipak veća od latencije na dan habituacije, indirektno se može pretpostaviti da amigdala možda dobro funkcioniraju jer štakori ipak zastanu jer osjećaju opasnost, no hipokampus ne funkcionira pa oni odluče ipak ući u crni odjeljak.

U ovom su testu, kao i u MWM testu, poremećaji pamćenja i učenja bili prisutni 1, 3 i 6 mjeseci nakon STZ-icv primjene, ali izraženiji nego u MWM testu plivanja. Izraženije oštećenje spoznajnih funkcija u PA testu s dužim razdobljem nakon STZ-icv primjene nego u MWM testu moglo bi se objasniti napredovanjem oštećenja sa hipokampusa na parahipokampalni korteks (peririnalni i entorinalni korteks). Istraživanja su pokazala da životinje s oštećenjem peririnalnog i entorinalnog korteksa imaju lošije rezultate u PA testu tj pokazuju oštećenje spoznajnih funkcija učenja i pamćenja dok su rezultati u MWM testu jednaki kontroli (238).

Rezultati MWM i PA testova u ovom istraživanju potvrđuju postojanje oštećenja prostorne te strahom motivirane funkcije učenja i pamćenja u STZ-icv štakora, sukladno rezultatima drugih istraživača, ali po prvi puta pokazuju vremenski tijek nastalih kognitivnih deficita kroz 6 mjeseci nakon STZ-icv primjene i pri tome razliku u intenzitetu promjena ovih dvaju vsta pamćenja (151, 164,168,169,184).

Obzirom da inzulin u mozgu ima značajnu fiziološku ulogu u procesima učenja i pamćenja, te da STZ oštećuje inzulinsku signalizaciju, ispitivali smo signalni put IR u mozgu STZ-icv štakora koji imaju deficit učenja i pamćenja. U tu smo svrhu istražili ekspresiju IR, Akt/PKB, GSK-3 α/β i p GSK-3 α/β te tau i p-tau proteina u HPC-u, FC-u, PC-u, te HPT-u koristeći se imuno prepoznavanjem u Western blot analizi.

Naime, periferno primjenjen STZ ulazi u β -stanice gušterače putem nosača za glukozu GLUT2 te dovodi do nastajanja slobodnih radikala unutar stanice i oštećenja DNK, s posljedičnim drastičnim sniženjem ATP-a u stanici (154). Iako nije izravno dokazano, za pretpostaviti je da se slične promjene događaju i u mozgu nakon STZ-icv primjene, obzirom da je u STZ-icv modelu prisutnost oksidativnog stresa i smanjenje koncentracije ATP-a i kreatin fosfata (151). U STZ-icv modelu štakora je, slično kao u ljudi oboljelih od sAD, nađen smanjeni metabolizam glukoze u različitim regijama mozga s izrazito smanjenom aktivnosti enzima koji sudjeluju u glikolizi (9,207,208). Takav energetska uz navedeni kolinergički deficit (smanjena aktivnost kolin acetiltransferaze) (171,172) mogao bi dovesti do poremećaja kognitivnih funkcija u STZ-icv tretiranih štakora (151). Svi su ovi mehanizmi važni za proces učenja i pamćenja, pri tom je značajna spoznaja da inzulin u mozgu sudjeluje u regulaciji metabolizma glukoze (106). Navedeno upućuje da promjene inzulinske signalizacije u mozgu mogu imati veliki utjecaj na proces učenja i pamćenja.

U ovom je istraživanju u STZ-icv modelu nađen poremećaj inzulinske signalizacije u hipokampusu najranije 1 mjesec nakon STZ-icv tretmana. S obzirom da je hipokampus regija mozga povezana sa spoznajnim funkcijama učenje i pamćenja, ovaj rezultat indirektno upućuje na usku povezanost oštećenja inzulinskog signalnog puta i poremećaja spoznajnih funkcija učenja i pamćenja. Glavnu ulogu na samom početku inzulinskog signalnog puta igra IR, a snižena ekspresija IR proteina u HPC-u u našim je istraživanjima prisutna kontinuirano do 6 mjeseci nakon STZ-icv primjene. Zanimljivo je napomenuti da ekspresija IR u HPC u obje grupe puno veća 6 mjeseci nakon STZ-icv tretman nego 1 mjesec nakon STZ-icv tretmana, što se može objasniti povoljnim utjecajem fizičke i mentalne aktivnosti (plivanje u MWM labirintu) na ekspresiju IR (239). Naime štakori koji su praćeni do 6 mjeseci plivali su više puta (3x) nego li štakori praćeni do 1 (1x) i 3 (2x) mjeseca nakon STZ-icv primjene. Smanjenje ekspresije IR proteina u HPC-u moguće je posljedica smanjene ekspresije gena za IR u hipokampusu 3 mjeseca nakon STZ-icv primjene (184). Nedavno su i drugi autori našli smanjenu ekspresiju gena za IR i IR protein u CA3 regiji HPC-a 3 tjedna nakon STZ-icv primjene (186). Također se može primjetiti da je ekspresija IR nepromjenjena u HPT-u u kojem inzulin ima ulogu detekcije glukoznog signala, ali ta regija nije uključena u procesu učenja i pamćenja kao HPC i korteks. S druge strane u PC-u je nađena smanjena ekspresija IR samo nakon 1 mjesca, a u FC tek 6 mjeseci nakon STZ-icv primjene. Ovaj rezultat upućuje na značajnu razliku u osjetljivosti IR na promjene izazvane STZ-icv primjenom u hipokampusu u odnosu na pojedina područja korteksa. Posmortalno istraživanje IR signalizacije u mozgu osoba oboljelih od sAD-a također pokazuje regionalnu specifičnost,

tako da je lagano povećanje gustoće IR nađeno u frontalnom i parijetalnom korteksu, a signifikantno povećanje gustoće IR samo u okcipitalnom korteksu (19). U istom je istraživanju nađena značajno povećana tirozin kinazna aktivnost IR u frontalnom, temporalnom i okcipitalnom korteksu dok je u parijetalnom korteksu ostala nepromjenjena (19). Autori smatraju da se ovakve postmortalne promjene možda mogu objasniti kao reaktivne promjene na opće smanjenje IR signalizacije u mozgu oboljelih od sAD-a (19).

Što se tiče same kinazne aktivnosti, koja nije obuhvaćena ovim doktoratom, naša su prijašnja istraživanja pokazala da je fosforiliranost 1158,1162/1163 tirozinskih ostataka na IRβ povišena u frontoparietalnom korteksu i hipotalamusu, a nepromjenjena u hipokampusu 3 mjeseca nakon STZ-icv primjene (184). Tirozin kinazna aktivnost bila je nepromjenjena u parijetalnom korteksu i hipotalamusu, dok je u hipokampusu bila povišena. (184). Međutim, to ne mora značiti da će se signal s IR prenijeti dalje, jer kao što je opisano u uvodu, regulacija inzulinskog signalnog puta je kompleksa i podložna aktivaciji-inhibiciji na svakom koraku. IRS-1 kao slijedeći protein u inzulinskom signalnom putu može također biti zahvaćen. IRS-1 nije istraživao u našim pokusima, ali su radovi drugih autora pokazali da u STZ-icv modelu dolazi do smanjene fosforilacije IRS-1 u HPC-u te smanjene ekspresije gena za IRS-1 (180,127). Jedni od mogućih inhibitora prijenosa signala s IR su proinflamatorni citokini TNF- α i IL-6. TNF- α i IL-6 fosforiliraju IRS-1 pa se on dalje ne može vezati na IR čime se prekida inzulinska signalizacija (80,72) Povišene vrijednosti nađene su u mozgu oboljelih od sAD, kao i u mozgu STZ-icv tretiranih štakora (80,72,198,210).

Slijedeći enzim u inzulinskoj kaskadi koji je mjereno u ovom istraživanju je Akt/PKB koji je bio nepromjenjen u svim regijama osim u PC-u gdje je nađeno akutno smanjenje ekspresije Akt/PKB 1 mjesec nakon STZ-icv primjene, što odgovara smanjenju IR u istoj regiji. Međutim IR je nađen smanjen u HPC-u, a protein Akt/PKB je nepromjenjen. Ova nekozistencija možda se može objasniti time što nismo mjerili fosforiliranost Akt/PKB nego samo njegovu ukupnu koncentraciju. Radovi drugih istraživača pokazuju da u STZ-icv modelu u HPC-u kao i u sAD dolazi do smanjenja fosforiliranosti Akt/PKB, a ne do smanjenja ukupnog proteina (186,85,127). To može također upućivati i na različitu regulaciju aktivnosti Akt/PKB enzima u HPC-u i PC-u. Osim inzulina postoje i drugi proteini koji mogu utjecati na aktivnost Akt/PKB u HPC-u, tako se u novije vrijeme nameće enzim PIKE (*fosfoinozitol-3 kinaze enhancer*) koji pojačava PI-3K i Akt/PKB aktivnost. PIKE nije istraživao u STZ-icv modelu, ali su miševi s delecijom gena za PIKE pokazali oštećenje kognitivnih funkcija učenje i pamćenja u MWM testu (240). Akt/PKB dalje ima utjecaj na metabolizam glukoze te fosforilira i time inaktivira GSK-3 α/β . U ovom istraživanju ispitivali

smo rasprostranjenost i fosforilaciju obje izoforme GSK-3 α/β , te omjer fosforiliranog/nefosforilirani GSK3 α/β . Iako je nađena smanjena fosforiliranost GSK-3 β u HPC-u 6 mjeseci nakon STZ-icv tretmana, omjer p/t GSK3 β bio je povišen u HPC-u 6 mjeseci nakon STZ-icv tretmana što indirektno upućuje na smanjenje aktivnosti GSK-3 β . Ovi rezultati nisu u skladu s nalazima drugih istraživača koji su temeljem omjera indirektno našli povećanu aktivnost GSK-3 β u STZ-icv modelu (188,164,185), ali odgovara nalazima kod oboljelih od sAD-a (127). Razlog tome može biti u dozi STZ-icv jer su naša prijašnja istraživanja vezana uz GSK-3 rađena na dozi od 1 mg/kg, a naša sadašnja istraživanja pokazuju da postoji ovisnost doza-činak nakon STZ-icv primjene (rukopis u pripremi). Drugi razlog može biti što je de la Monte radila na mladuncima štakora kojima je STZ davan intracerebrokortikalno, a naša su istraživanja rađena na štakorima starosti 3 mjeseca. Nadalje p tau u HPC-u je povećan 3 i 6 mjeseca nakon STZ-icv tretmana što odgovara smanjenju IR u istoj regiji. Ovaj je rezultat u skladu s našim prijašnjim istraživanjima u kojima su nađene početne blage promjene povećane ekspresije ukupnog tau proteina u hipokampusu 1 i 3 mjeseca nakon STZ-icv primjene, te blago povišenje fosforiliranog tau proteina (PHF-1) 3 mjeseca nakon STZ-icv primjene (164,184). Istraživanja drugih autora također su pokazala povišenje fosforiliranosti tau proteina u STZ-icv modelu (185,188). S druge strane, ovaj je nalaz kontradiktoran smanjenoj aktivaciji GSK-3 β enzima, uzrok tome može biti povećana aktivnost drugih enzima koji mogu fosforilirati tau na S396/404. kao što je Cdk-5 i ERK-1/2 (241,242,243). Cdk-5 i ERK-1/2 kinaza nisu detaljno istraživane u STZ-icv modelu, ali radovi drugih autora upućuju na povećanu ekspresiju Cdk-5 i povećanu fosforilaciju ERK 1/2 u sAD-u (242,243). Naša preliminarna istraživanja ekspresije ERK-1/2 proteina u HPC-u koja su u tijeku upućuju na njegovo povećanje 6 mjeseci nakon STZ-icv primjene. S druge strane rezultati drugih istraživača pokazuju da je omjer pERK/ERK 1/2 u HPC-u nepromjenjen 21 dan nakon STZ-icv primjene, što odgovara nepromjenjenost fosforilacije tau proteina 1 mjesec nakon STZ-icv tretmana (186).

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da su promjene inzulinske signalizacije najizraženije u HPC-u prisutne već 1 mjesec nakon STZ-icv tretmana što je i za očekivati s obzirom na povezanost ove regije mozga s učenjem i pamćenjem. Slijedeća regija koja pokazuje neke promjene inzulinske signalizacije je PC, dok promjene u FC-u počinju tek 6 mjeseci nakon STZ-icv tretmana. U HPT-u, regiji mozga koja se više povezuje sa regulacijom metabolizma glukoze na periferiji i detekcijom glukoznog signala u mozgu nego li sa učenjem i pamćenjem, nisu nađene promjene inzulinske signalizacije niti u jednom vremenskom

odječku (244). Ovi rezultati pokazuju izrazitu regionalnu specifičnost, kao i određeni vremenski slijed promjena gledano 1,3 i 6 mjeseci nakon STZ-icv primjene.

Obzirom da inzulinska signalizacija utječe i na metabolizam amiloid beta ($A\beta$) proteina, za pretpostaviti je da bi u STZ-icv tretiranih štakora moglo doći do patološkog nakupljanja $A\beta$ u mozgu. Stoga smo za detekciju $A\beta$ koristili Kongo red bojenje i imunohistokemiju. Kongo red bojenjem je po prvi puta nađen pozitivan signal u meningealnim kapilarama štakora tretiranih sa STZ-icv tri mjeseca nakon STZ-icv primjene dok takvog signala nije bilo jedan mjesec nakon tretmana. Šest mjeseci nakon STZ-icv primjene pozitivan signal u meningealnim krvnim žilama i dalje perzistira te se uz to nalazi i pozitivan signal u kapilarama unutar HPC-a, što upućuje na određenu progresiju u rasprostranjenosti patološkog nakupljanja $A\beta$ u krvnim žilama, također je prvi puta pomoću Kongo red bojenja nađeno izvanstanično nakupljanje $A\beta$ 6 mjeseci nakon STZ-icv primjene. Dodatno je napravljena imunohistokemija sa $A\beta_{1-42}$, pri čemu je korišteno antitijelo specifično za C-terminalni dio $A\beta_{1-42}$. Za ovo smo se antitijelo koje prepoznaje $A\beta_{1-42}$ odlučili stoga što su iz ljudskih plakova prvenstveno izolirani neurotoksični dimeri $A\beta_{1-42}$. Imunohistokemijski je prvi intraneuralni $A\beta_{1-42}$ signal u HPC-u i korteksu nađen 3 mjeseca nakon STZ-icv tretmana, dok je izvanstanično nakupljanje $A\beta_{1-42}$ u HPC-u nađeno 6 mjeseci nakon STZ-icv primjene.

Cerebralna amiloidna angiopatija nađena 6 mjeseci nakon STZ-icv tretman u meningealnim kapilarama izraženija je nego ona nađena 3 mjeseca nakon STZ-icv tretmana. Naša najnovija istraživanja pokazuju da je cerebralna amiloidna angiopatija prisutna i 9 mjeseci nakon STZ-icv primjene (214). Transgenični AD miševi nisu pogodni za praćenje amiloidne angiopatije jer se vidjelo da se ona javlja ovisno o dobi životinje; 9 mjeseci kod Tg2576 miševa, a 6 mjeseci kod APP^{swe} miševa (245,246), što nije slučaj kod STZ-icv modela. Stoga bi STZ-icv model, kao model inzulinske rezistencije u mozgu, mogao biti dobar model za proučavanje napredovanja cerebralne amiloidne angiopatije u sAD-u. Ako pogledamo istraživanja cerebralne angiopatije u ljudi oboljelih od sAD-a možemo vidjeti da se ona povezuje s promjenama u cerebralnim kapilarama (247,248). Istraživanja su pokazala da baš kapilarna angiopatija dobro kolerira sa napredovanjem sAD što odgovara teoriji da se $A\beta_{1-42}$ iz intersticija drenira kroz kapilare gdje se kod povećanog nastajanja taloži u kapilarnim stjenkama (247,248).

Obzirom da je imunohistokemija osjetljivija metoda od histološkog bojanja Kongo redom, prvi intraneuralni signal $A\beta_{1-42}$ nađen je 3 mjeseca nakon STZ-icv tretmana. Imunohistokemijom i Kongo bojenjem u korteksu/hipokampusu STZ-icv štakora nađene su plakovima slične nakupine, ali ne ranije od 6 mjeseci nakon STZ-icv tretmana. Ovaj rezultat

zajedno s amiloidnim promjenama u meningealnim kapilarama 3 i 6 mjeseci nakon STZ-icv upućuju na poremećaj metabolizma A β u STZ-icv modelu koji se javljaju s duljim trajanjem vremena nakon STZ-icv primjene. Ovakav vremenski slijed amiloidne patologije u kojem se prvo javljaju nakupine A β u kapilarama i intraneuralno pa tek onda slijedi izvanstanična formacija sličana primitivnim plakovima sličan je promjenama nađenim u sAD-u. U oboljelih od sAD nađeno je da, promjene u malim krvnim žilama (kapilarama i arteriolama) prethode nastajanju plakova (247,248,249). Što se tiče samog metabolizma A β u ljudi nađeno je da prvo dolazi do nakupljanja intraneuronalnih nakupina u vidu neurotoksičnih monomera i oligomera A β_{1-42} (34), a nakon toga do njihovog nakupljanja u vidu plakova (31-33)

Istraživanja vezana uz A β rađena na čistom STZ-icv modelu su rijetka, a za sada u literaturi nema podataka o ovako dugo praćenje do 6 mjeseci nakon STZ-icv tretmana. Druga grupa istraživača je našla A β_{1-42} izvanstaničnu imunoreaktivnost u denatnom girusu 21 dan nakon STZ-icv tretmana, međutim oni su davali veću dozu (4mg STZ) te je korišteno drugo antitijelo (A $\beta_{1,42}$, Abcam) i STZ je davan u treći ventrikul (188). Izvanstanična A β imunoreaktivnost prisutna ranije od mjesec dana nakon STZ-icv tretmana mogla bi se objasniti akutnim toksičnim djelovanjem STZ-icv tretmana koji organizam može kompenzirati do određene mjere, a zatim 3-6 mjeseci nakon STZ-icv tretmana kompenzacija više nije moguća te dolazi do dekompenzacije i polagane progresije promjena (rukopis u pripremi).

Mali broj radova o A β metabolizmu u transgeničnom mišijem modelu AD u kombinaciji sa STZ-icv ili intraperitonealnom primjenom pokazuju da STZ dovodi do promjena A β metabolizma puno ranije nego li je to uobičajeno u transgeničnom modelu (149, 150).

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da se cerebralna amiloidna angiopatija, intraneuralno nakupljanje A β_{1-42} te plakovima slične nakupine u STZ-icv modelu prvi puta javlja tek nakon što je već nastupilo oštećenje inzulinskog signalnog puta u mozgu kao i oštećenje spoznajnih funkcija učenja i pamćenja (164,184,214). Ovaj nalaz govori protiv amiloidne hipoteze o uzroku nastanka patofiziologije sAD. Obzirom na sličnosti ostalih promjena u mozgu između ljudi oboljelih od sAD i STZ-icv štakorskog modela, može se pretpostaviti da nastala inzulinska rezistencija u mozgu ljudi oboljelih od sAD prethodi i moguće dovodi do amiloidne patologije, a ne obrnuto. Također rezultati kognitivnih, neurokemijskih i histoloških ispitivanja govore u prilog reprezentativnosti STZ-icv štakora kao eksperimentalnog modela sAD u ljudi moguće barem za onaj dio populacije s izraženom inzulinskom rezistencijom u mozgu.

7. ZAKLJUČCI

1. Ovim istraživanjem pokazali smo da središnja primjena streptozotocin (STZ-icv) dovodi do poremećaja spoznajnih funkcija učenja i pamćenja koje traju i 6 mjeseci nakon STZ-icv primjene
2. Pronašli smo da postoje poremećaji IR signalizacije u mozgu STZ-icv štakora koji su regionalno specifični i ovisni o vremenu nakon STZ-icv primjene. Najranije i najizraženije promjene nađene su u hipokampusu, zatim u parietalnom korteksu, dok su u frontalnom korteksu promjene IR signalizacije nađene tek 6 mjeseci nakon STZ-icv primjene. U hipotalamusu kognitivni irelevantnoj regiji, nisu nađene takve promjene niti u jednom promatranom vremenskom odsječku.
3. Dokazali smo po prvi puta nastanak strukturnih promjena nakon STZ-icv tretmana u vidu progresivnog nakupljanja kongofilnog $A\beta$ signala u meningealnim krvnim žilama 3 mjeseca, te dodatno I u krvnim žilama mozga 6 mjeseci nakon STZ-icv primjene, te imunohistokemijski nakupljanje $A\beta_{1-42}$. Intraneuralno nakupljanje $A\beta_{1-42}$ najranije je vidljivo 3 mjeseca nakon STZ-icv primjene, dok je patološko nakupljanje $A\beta_{1-42}$ u obliku izvanstaničnih primitivnih plakova po prvi puta nakon 6 mjeseci, te još izraženije 9 mjeseci nakon STZ-icv primjene
4. Naši rezultati upućuju na to da smanjena ekspresija proteina IR prethodi povećanju fosforiliranosti tau proteina i nakupljanju $A\beta$ u meningealnim krvnim žilama, neuronima i izvanstanično te dovodi u pitanje vjerodostojnost amiloidne hipoteze i pitanje patološkog uzroka sporadične Alzheimerove bolesti (sAD).
5. Kako na razini kognicije tako i na biokemijskoj i strukturnoj razini, STZ-icv model pokazuje velike sličnosti s patofiziologijom sAD-a, te je pogodan eksperimentalni model za daljnja istraživanja vremenskog slijeda promjena u sAD-u I pruža mogućnost pretkliničkog testiranja novih lijekova za liječenje ove bolesti

8. SAŽETAK

UVOD Poremećaj metabolizma glukoze i inzulinske signalizacije u mozgu smatra se jednim od mogućih uzroka sporadične Alzheimerove bolesti (sAD). Sukladno tome, model štakora sa središnjom primjenom betacitotoksične tvari streptozotocina (STZ-icv) koji razvija poremećaje pamćenja, predložen je kao reprezentativan eksperimentalni model sAD-a, pogodan za istraživanje inzulinskog sustava mozga u ovoj bolesti. Cilj istraživanja bio je ispitati nastanak i razvoj promjena inzulinskog receptora i inzulinskog signalnog puta u mozgu u različitim vremenskim odsječcima nakon STZ-icv primjene, te moguće posljedične promjene tau i amiloid beta ($A\beta$) proteina.

MATERIJALI I METODE Mužjaci štakora soja Wistar, stari 3-6 mjeseca, podjeljeni su u dvije skupine, jedna je skupina dobila STZ-icv (3mg/kg), dok je kontrolna skupina na isti način dobila samo otapalo. Spoznajne funkcije učenja i pamćenja testirane su plivanjem u Morrisovom labirintu i testom pasivnog izbjegavanja elektrošoka počevši od 1 mjeseca pa sve do 6 mjeseci nakon STZ-icv primjene. Ekspresija inzulinskog receptora (IR), protein kinaze B (Akt/PKB), glikogen sintaze kinaze $3\alpha/\beta$ (GSK- $3\alpha/\beta$), fosforilirane glikogen sintaze kinaze $3\alpha/\beta$ (pGSK- $3\alpha/\beta$), tau i fosforiliranog tau (p-tau) proteina mjerena je u hipokampusu (HPC), frontalnom korteksu (FC), parietalnom korteksu (PC) i hipotalamusu (HPT) pomoću Western blot analizom. Za vizualizaciju $A\beta$ proteina korišteno je kongo red bojanje, te $A\beta_{1-42}$ imunohistokemija. Statistička obradu podataka provedena pomoću je Mann-Whitney U testa ($p < 0,05$).

REZULTATI Smanjena funkcija učenja i pamćenja nađena je nakon 1 mjeseca te je bila i dalje prisutna 6 mjeseci nakon STZ-icv primjene ($p < 0,05$). Snižena ekspresija IR nađena je nakon 1 mjeseca u PC-u i HPC-u, gdje je ostala i dalje snižena 6 mjeseci nakon STZ-icv primjene ($p < 0,05$), dok je u FC-u sniženje IR nađeno tek 6 mjeseci nakon STZ-icv primjene ($p < 0,05$). Povećanje t-tau i p-tau nađeno je najranije u HPC-u 3 mjeseca nakon STZ-icv primjene ($p < 0,05$). Šest mjeseci nakon STZ-icv primjene povećanje ekspresije p-tau bilo je prisutno u HPC-u, PC-u i FC-u, dok je povećan t-tau nađen samo u HPC-u i PC-u. Kongofilne nakupine $A\beta$ nađene su u meningealnim kapilarama nakon 3 mjeseca, a dodatno i u moždanim kapilarama 6 mjeseci nakon STZ-icv primjene. Patološko nakupljanje $A\beta_{1-42}$ nađeno je nakon 3 mjeseca u obliku intraneuronalnih nakupina, te u obliku primitivnih plakova 6 mjeseci nakon STZ-icv primjene.

ZAKLJUČAK Rezultati istraživanja pokazuju da kognitivni poremećaji i regionalno specifične promjene inzulinske signalizacije u mozgu vremenski prethode nastanku promjenama fosforilacije tau proteina i patološkog nakupljanja $A\beta$.

9. SUMMARY

OBJECTIVE Sporadic Alzheimer disease has been associated with impairment of insulin signalling in the brain. Rats treated intracerebroventricularly with a betacytotoxic drug streptozotocin (STZ-icv) have been proposed as a representative sAD model. We aimed to investigate time- and region-dependent changes of brain insulin signalling in STZ-icv rat model.

MATERIALS AND METHODS Adult male Wistar rats were given vehicle-icv (controls) or STZ-icv (3mg/kg) injection and sacrificed 1, 3 and 6 months after the treatment. Cognitive functions were tested by Morris Water Maze Test and Passive Avoidance. Protein expression of insulin receptor (IR) and its signalling cascade elements, total and phospho tau (t-and p-tau) was measured in hippocampus (HPC), frontal and parietal cortex (FC, PC), and hypothalamus (HPT) by Western blot analysis. Amyloid β was visualized by Congo red and $A\beta_{1-42}$ immunohistochemistry. Data were analysed by Mann-Whitney U test ($p < 0,05$).

RESULTS Cognitive deficits found after 1 month persisted up to 6 months following STZ-icv treatment. IR protein expression was found decreased at all time points in HPC, after 1 month only in PC, and not earlier than 6 month after STZ-icv treatment in PC. Increased expression of t-tau and was found in HPC, 3 and 6 months, and in PC 6 months after STZ-icv treatment, respectively, while increased p-tau was found in HPC 3 and 6 months, and in FC and PC 6 months after the treatment. Congophillic $A\beta$ aggregates in the meningeal capillaries and intraneuronal $A\beta_{1-42}$ signal were found after 3 months, while 6 months after STZ-icv treatment congophillic $A\beta$ aggregates were found additionally in cortical capillaries accompanied by $A\beta_{1-42}$ primitive plaque like formations.

CONCLUSION Changes observed in STZ-icv model seem to be time and region dependent suggesting that cognitive deficit and changes of insulin/insulin receptor signalling precede tau hyperphosphorilation and pathological amyloid β aggregation.

Insulin signaling in the brain of experimental sporadic Alzheimer disease rat model

Jelena Osmanović Barilar

Zagreb, 2012

9.LITERATURA

1. Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease: seminar. *Lancet* 2006;368:387-403.
2. Prevalence of dementia in Europe.
<http://www.alzheime-europe.org/index.php/EN/Research/European-Collaboration-on-Dementia/Prevalence-of-dementia2>
3. Alzheimer's Association. Alzheimer's Association report 2011 Alzheimers disease facts and figures. *Alz Dementia* 2011;7:208-244.
4. Hrvatski zavod za javno zdravstvo: Mentalne bolesti i poremećaji u RH, Zagreb, 2004
5. Alzheimer A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie* 1907;64:146-148.
6. Rocchi A, Pellegrini S, Siciliano G, Murri L. Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: a review. *Brain Res Bull* 2003;61:1-24.
7. Nelson PT, Braak H, Markesbery WR. Neuropathology and cognitive impairment in Alzheimer disease: a complex but coherent relationship. *J Neuropathol Exp Neurol* 2009;68:1-14.
8. Gasparini L, Netzer WJ, Greengard P, Xu H. Does insulin dysfunction play a role in Alzheimer's disease? *TIPS* 2002;23:288-293.
9. Hoyer S. Glucose metabolism and insulin receptor signal transduction in Alzheimer disease. *Eur J Pharmacol* 2004;490:115-125
10. Meyer JS, Rauch GM, Rauch RA, Haque A, Crawford K. Cardiovascular and other risk factors for Alzheimer's disease and vascular dementia. *Ann N Y Acad Sci* 2000 ;903:411-423.
11. Mendez MF, Underwood KL, Zander BA, Mastri AR, Sung JH, Frey WH 2nd. Risk factors in Alzheimer's disease: a clinicopathologic study. *Neurology* 1992;42:770-775.
12. Zoe Arvanitakis, MD; Robert S. Wilson, PhD; Julia L. Bienias, ScD; Denis A. Evans, MD; David A. Bennett, MD. Diabetes Mellitus and Risk of Alzheimer Disease and Decline in Cognitive Function. *Arch Neurol* 2004;61:661-666.
13. Cardoso S, Correia S, Santos RX i sur. Insulin is a two-edged knife on the brain. *J Alzheimers Dis* 2009;18:483-507.
14. Mosconi L. Brain glucose metabolism in the early and specific diagnosis of Alzheimer's disease. FDG-PET studies in MCI and AD. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2005;32:486-510.

15. Watson GS, Peskind ER, Asthana S i sur. Insulin increases CSF Abeta42 levels in normal older adults. *Neurology* 2003;60:1899-903.
16. Frölich L, Blum-Degen D, Riederer P, Hoyer S. A disturbance in the neuronal insulin receptor signal transduction in sporadic Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1999;893:290-3.
17. Craft S, Asthana S, Newcomer JW i sur. Enhancement of memory in Alzheimer disease with insulin and somatostatin, but not glucose. *Arch Gen Psychiatry* 1999;56:1135-40.
18. Watson GS, Craft S. Modulation of memory by insulin and glucose: neuropsychological observations in Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol* 2004 19;490:97-113.
19. Frölich L, Blum-Degan H-G, Engelsberger S i sur. Brain insulin and insulin receptors in aging and Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 1998;105:423-438.
20. Terry RD, Katzman R. Life span and synapses: will there be a primary senile dementia? *Neurobiol Aging* 2001;22:347-348;353-354.
21. Dickson, DW. Neuropathology of Alzheimers disease and other demetias. *Cin Geriatr Med* 2001;17:209-228.
22. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem.* 1986;261:6084-9.
23. Castellani RJ, Nunomura A, Lee HG, Perry G, Smith MA. Phosphorylated tau: toxic, protective, or none of the above. *J Alzheimers Dis.* 2008;14:377-83.
24. Tabaton M, Zhu X, Perry G, Smith MA, Giliberto L. Signaling Effect of Amyloid-β42 on the Processing of AβPP. *Exp Neurol* 2010;221:18–25.
25. Zou K, Gong JS, Yanagisawa K, Michikawa M. A novel function of monomeric amyloid beta-protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced oxidative damage. *J Neurosci* 2002;22: 4833–41.
26. Baruch-Suchodolsky R, Fischer B. Abeta40, either soluble or aggregated, is a remarkably potent antioxidant in cell-free oxidative systems. *Biochemistry* 2009;48:4354–70.
27. Yao ZX, Papadopoulos V. Function of beta-amyloid in cholesterol transport: a lead to neurotoxicity". *FASEB J* 2002;16:1677–9.

28. Igbavboa U, Sun GY, Weisman GA, He Y, Wood WG. Amyloid β -Protein Stimulates Trafficking of Cholesterol and Caveolin-1 from the Plasma Membrane to the Golgi Complex in Mouse Primary Astrocytes. *Neuroscience* 2009;162:328–38.
29. Bailey JA, Maloney B, Ge YW, Lahiri DK. Functional activity of the novel Alzheimer's amyloid β -peptide interacting domain (A β ID) in the APP and BACE1 promoter sequences and implications in activating apoptotic genes and in amyloidogenesis. *Gene* 2011;488:13–22.
30. Selkoe DJ. Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behav Brain Res* 2008;192:106-13.
31. Evin G, Weidemann A. Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease A β amyloid peptides. *Peptides* 2002;23:1285-97.
32. Hu X, Crick SL, Bu G, Frieden C, Pappu RV, Lee JM. Amyloid seeds formed by cellular uptake, concentration, and aggregation of the amyloid-beta peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:20324-9.
33. Ahmed M, Davis J, Aucoin D i sur. Structural conversion of neurotoxic amyloid-beta(1-42) oligomers to fibrils. *Nat Struct Mol Biol* 2010;17:561-7.
34. Shankar GM, Li S, Mehta TH i sur. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 2008;14:837-42.
35. Huang Y, Mucke L. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell* 2012;148:1204-22.
36. Benilova I, Karran E, De Strooper B. The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat Neurosci* 2012;15:349-57.
37. Morrison JH, Hof PR. Selective vulnerability of corticocortical and hippocampal circuits in aging and Alzheimer's disease. *Prog Brain Res* 2002;136:467-86.
38. West MJ, Coleman PD, Flood DG, Troncoso JC. Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet* 1994;344:769-72.
39. Scheff SW, Price DA. Alzheimer's disease-related alterations in synaptic density: neocortex and hippocampus. *J Alzheimers Dis* 2006;9:101-15.
40. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H i sur. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2011;7:263-9.

41. Jack CR Jr, Albert MS, Knopman DS i sur. Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2011;7:257-62.
42. Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA i sur. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2011;7:280-92.
43. Albert MS, DeKosky ST, Dickson D i sur. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2011;7:270-9.
44. Šimić G. Biološke osnove i terapija ponašanja: Neurobiologija demencija. Zagreb: Školska knjiga; 2006, str. 187-211.
45. Rubin CD. The primary care of Alzheimer disease. *Am J Med Sci* 2006;332:314-33.
46. Kverno KS, Black BS, Nolan MT, Rabins PV. Research on treating neuropsychiatric symptoms of advanced dementia with non-pharmacological strategies, 1998-2008: a systematic literature review. *Int Psychogeriatr* 2009;21:825-43.
47. Jalbert JJ, Daiello LA, Lapane KL. Dementia of the Alzheimer type. *Epidemiol Rev* 2008;30:15-34.
48. Wollen KA. Alzheimer's disease: the pros and cons of pharmaceutical, nutritional, botanical, and stimulatory therapies, with a discussion of treatment strategies from the perspective of patients and practitioners. *Altern Med Rev* 2010;15:223-44.
49. Hansen RA, Gartlehner G, Webb AP, Morgan LC, Moore CG, Jonas DE. Efficacy and safety of donepezil, galantamine, and rivastigmine for the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Clin Interv Aging* 2008;3:211-25.
50. McShane R, Areosa Sastre A, Minakaran N. Memantine for dementia. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;19:CD003154.
51. Golde TE, Schneider LS, Koo EH. Anti- $\alpha\beta$ therapeutics in Alzheimer's disease: the need for a paradigm shift. *Neuron* 2011;69:203-13.
52. Lemere CA, Masliah E. Can Alzheimer disease be prevented by amyloid-beta immunotherapy? *Nat Rev Neurol* 2010;6:108-19.
53. de la Monte SM. Brain insulin resistance and deficiency as therapeutic targets in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2012;9:35-66.

54. Schirmer RH, Adler H, Pickhardt M, Mandelkow E. "Lest we forget you--methylene blue". *Neurobiol Aging* 2011;32:2325.e7-16.
55. Morris M, Maeda S, Vossel K, Mucke L. The many faces of tau. *Neuron* 2011;70:410-26.
56. Gozes I. Microtubules (tau) as an emerging therapeutic target: NAP (davunetide). *Curr Pharm Des* 2011;17:3413-7.
57. Evans CG, Jinwal UK, Makley LN, Dickey CA, Gestwicki JE. Identification of dihydropyridines that reduce cellular tau levels. *Chem Commun (Camb)* 2011;47:529-31.
58. Purves D, Augustin GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia AS, McNamara JO, Williams SM ur. *Neuroscience* third edition. Massachusetts: Sunderland; 2004, str. 733-53.
59. Judaš M, Kostović I ur. *Temelji neuroznanosti*. Zagreb:MD; 1997, str. 654-673.
60. Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR ur. *Fundamental neuroscience*. San Diego: Academic Press; 1999, str. 1448-49.
61. Park CR. Cognitive effects of insulin in the central nervous system. *Neurosci Biobehav Rev* 2001;25:311-23.
62. Zhao WQ, Chen H, Quon MJ, Alkon DL. Insulin and the insulin receptor in experimental models of learning and memory. *Eur J Pharmacol* 2004;490:71-81.
63. Banks WA. The source of cerebral insulin. *Eur J Pharmacol* 2004;490:5-12.
64. Devaskar SU, Giddings SJ, Rajakumar PA, Carnaghi LR, Menon RK, Zahn DS. Insulin gene expression and insulin synthesis in mammalian neuronal cells. *J Biol Chem* 1994; 269:8445-8454.
65. Unger JW, Livingston JN, Moss AM. Insulin receptors in the central nervous system: localization, signalling mechanisms and functional aspects. *Prog Neurobiol* 1991;36:343-6.
66. Heidenreich KA, Zahniser NR, Berhanu P, Brandenburg D, Olefsky JM. Structural differences between insulin receptors in the brain and peripheral target tissues. *J Biol Chem* 1983;258:8527-8530.
67. Zhao WQ, Alkon DL. Role of insulin and insulin receptor in learning and memory. *Mol Cell Endocrinol* 2001;177:125-34.
68. Gammeltoft S, Van Obberghen E. Protein kinase activity of the insulin receptor. *Biochem J* 1986;235:1-11.

69. Kido Y, Nakae J, Accili D. Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets. *Clin Endocrinol Metab* 2001;86:972-9.
70. Hubbard SR, Wei L, Ellis L, Hendrickson WA. Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature* 1994;372:746-54.
71. Hubbard SR. Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog. *EMBO J* 1997;16:5572-81.
72. Youngren JE. Regulation of insulin receptor function. *Cell Mol Life Sci* 2007;64:873-891.
73. Schumacher R, Mosthaf L, Schlessinger J, Brandenburg D, Ullrich A. Insulin and insulin-like growth factor-1 binding specificity is determined by distinct regions of their cognate receptors. *J Biol Chem* 1991;266:19288-95.
74. Bondy CA, Lee WH. Patterns of insulin-like growth factor and IGF receptor gene expression in the brain. Functional implications. *Ann N Y Acad Sci* 1993;692:33-43.
75. Lopaczynski W. Differential regulation of signaling pathways for insulin and insulin-like growth factor I. *Acta Biochim Pol* 1999;46:51-60.
76. Czech MP. New perspectives on the mechanism of insulin action. *Recent Prog Horm Res* 1984;40:347-77.
77. Gammeltoft S, Fehlmann M, Van Obberghen E. Insulin receptors in the mammalian central nervous system: binding characteristics and subunit structure. *Biochimie* 1985;67:1147-53.
78. Carpentier JL, Fehlmann M, Van Obberghen E, Gorden P, Orci L. Insulin receptor internalization and recycling: mechanism and significance. *Biochimie* 1985;67:1143-5.
79. Di Guglielmo GM, Drake PG, Baass PC, Authier F, Posner BI, Bergeron JJ. Insulin receptor internalization and signalling. *Mol Cell Biochem* 1998;182:59-63.
80. Pirola L, Johnston AM, Van Obberghen E. Modulation of insulin action. *Diabetologia* 2004;47:170-84.
81. Vanhaesebroeck B, Vogt PK, Rommel C. PI3K: from the bench to the clinic and back. *Curr Top Microbiol Immunol* 2010;347:1-19.
82. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 2007;129:1261-74.
83. Doble BW, Woodgett JR. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci* 2003;116:1175-86.

84. Peineau S, Bradley C, Taghibiglou C i sur. The role of GSK-3 in synaptic plasticity. *Br J Pharmacol* 2008;153 Suppl 1:428-37.
85. Pei J-J, Khatoon S, An W-L, Nordlinger M i sur. Role of protein kinase B in Alzheimer's neurofibrillary pathology. *Acta Neuropathol* 2003;105:381-392.
86. Kaytor MD, Orr HT. The GSK-3 β signaling cascade and neurodegenerative disease. *Neurobiol* 2002;12:275-278.
87. Phiel CJ, Wilson CA, Lee VM-Y, Klein PS. GSK-3 regulates production of Alzheimer's disease amyloid- β peptides. *Nature* 2003;432:435-439.
88. Ishiguro K, Shiratsuchi A, Sato S I sur. Glycogen synthase kinase 3 beta is identical to tau protein kinase I generation several epitops of paried helical filaments. *FEBS Letter* 1993;325:167-172.
89. Plattner F, Angelo M, Giese KP. The roles of cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase 3 in tau hyperphosphorylation. *J Biol Chem* 2006;281:25457-65.
90. de Tullio MB, Morelli L, Castaño EM. The irreversible binding of amyloid peptide substrates to insulin-degrading enzyme: a biological perspective. *Prion* 2008;2:51-6.
91. Cheung ZH, Ip NY. Cdk5: a multifaceted kinase in neurodegenerative diseases. *Trends Cell Biol* 2012;22:169-75.
92. Okabayashi Y, Maddux BA, McDonald AR, Logsdon CD, Williams JA, Goldfine ID. Mechanisms of insulin-induced insulin-receptor downregulation. Decrease of receptor biosynthesis and mRNA levels. *Diabetes* 1989;38:182-7.
93. Im H, Manolopoulou M, Malito E i sur. Structure of substrate-free human insulin-degrading enzyme (IDE) and biophysical analysis of ATP-induced conformational switch of IDE. *J Biol Chem* 2007;282:25453-63.
94. Maddux BA, Goldfine ID. Membrane glycoprotein PC-1 inhibition of insulin receptor function occurs via direct interaction with the receptor alpha-subunit. *Diabetes* 2000;49:13-9.
95. Bjelobaba I, Nedeljkovic N, Subasic S i sur. Immunolocalization of ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (NPP1) in the rat forebrain. *Brain Research* 2006;1120:54-63.
96. Mody N, Agouni A, McIlroy GD, Platt B, Delibegovic M. Susceptibility to diet-induced obesity and glucose intolerance in the APP (SWE)/PSEN1 (A246E) mouse model of Alzheimer's disease is associated with increased brain levels of protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) and retinol-binding protein 4 (RBP4), and basal phosphorylation of S6 ribosomal protein. *Diabetologia* 2011;54:2143-51.

97. Bandyopadhyay D, Kusari A, Kenner KA i sur. Protein-tyrosine phosphatase 1B complexes with the insulin receptor in vivo and is tyrosine-phosphorylated in the presence of insulin. *J Biol Chem* 1997;272:1639-45.
98. Gupta A, Dey CS. PTEN, a widely known negative regulator of insulin/PI3K signaling, positively regulates neuronal insulin resistance. *Mol Biol Cell* 2012;23:3882-98.
99. Rees-Jones RW, Hendricks SA, Quarum M, Roth J. The insulin receptor of rat brain is coupled to tyrosine kinase activity. *J Biol Chem* 1984;259:3470-4.
100. Liberman Z, Eldar-Finkelman H. Serine 332 phosphorylation of insulin receptor substrate-1 by glycogen synthase kinase-3 attenuates insulin signaling. *J Biol Chem* 2005;280:4422-8.
101. Maesako M, Uemura K, Kuzuya A i sur. Gain of function by phosphorylation in Presenilin 1-mediated regulation of insulin signaling. *J Neurochem* 2012;121:964-73.
102. Hansen LL, Ikeda Y, Olsen GS, Busch AK, Mosthaf L. Insulin signaling is inhibited by micromolar concentrations of H₂O₂. Evidence for a role of H₂O₂ in tumor necrosis factor alpha-mediated insulin resistance. *J Biol Chem* 1999;274:25078-84.
103. Rouille DG, McKeon C, Taylor SI, Gorden P. Hormonal regulation of insulin receptor gene expression. Hydrocortisone and insulin act by different mechanisms. *J Biol Chem* 1988;263:13185-90.
104. Giorgino F, Almahfouz A, Goodyear LJ, Smith RJ. Glucocorticoid regulation of insulin receptor and substrate IRS-1 tyrosine phosphorylation in rat skeletal muscle in vivo. *J Clin Invest* 1993;91:2020-30.
105. Häring HU, Kirsch D, Obermaier B, Ermel B, Machicao F. Decreased tyrosine kinase activity of insulin receptor isolated from rat adipocytes rendered insulin-resistant by catecholamine treatment in vitro. *Biochem J* 1986;234:59-66.
106. Wozniak M, Rydzewski B, Baker SP, Raizada MK. The cellular and physiological actions of insulin in the central nervous system. *Neurochem Int* 1993;22:1-10.
107. McEwen BS, Reagan LP. Glucose transporter expression in the central nervous system: relationship to synaptic function. *Eur J Pharmacol* 2004;490:13-24.
108. Šalković-Petrišić M, Riederer P. Brain glucose transporter protein 2 and sporadic Alzheimer's disease. *Trans Neurosci* 2010;1:200-206.
109. Duelli R, Kuschinsky W. Brain glucose transporters: relationship to local energy demand. *News Physiol Sci* 2001;16:71-6.

110. Vannucci SJ, Koehler-Stec EM, Li K, Reynolds TH, Clark R, Simpson IA. GLUT4 glucose transporter expression in rodent brain: effect of diabetes. *Brain Res* 1998;797:1-11.
111. Pénicaud L, Leloup C, Lorsignol A, Alquier T, Guillod E. Brain glucose sensing mechanism and glucose homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002;5:539-43.
112. Santos MS, Pereira EM, Carvaho AP. Stimulation of immunoreactive insulin release by glucose in rat brain synaptosomes. *Neurochem Res* 1999;24:33-6.
113. Gong CX, Liu F., Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Impaired brain glucose metabolism leads to Alzheimer neurofibrillary degeneration through a decrease in tau O-GlcNAcylation. *J Alzheimers Dis* 2006;9:1-12.
114. Perry EK, Perry RG, Tomlinson BE, Blessed G, Gibson PH. Coenzyme A-acetylating enzymes in Alzheimer's disease: possible cholinergic „compartment“ of pyruvate dehydrogenase. *Neurosci Lett* 1980;18:105-10.
115. Hoyer S. Brain glucose and energy metabolism abnormalities in sporadic Alzheimer disease. Causes and consequences: an update. *Exp Gerontol* 2000;35:1363-72.
116. Hoyer A, Bardenheuer HJ, Martin E, Plaschke K. Amyloid precursor protein (APP) and its derivatives change after cellular energy depletion. An in vitro-study. *J Neural Transm* 2005;112:239-253.
117. Röder HM, Ingram VM. Two novel kinases phosphorylate tau and the KSP site of heavy neurofilament subunits in high stoichiometric ratio. *J Neurosci* 1991;11:3325-42.
118. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 2002;23:599-622.
119. Moosavi M, Naghdi N, Choopani S. Intra CA1 insulin microinjection improves memory consolidation and retrieval. *Peptides*. 2007;28:1029-34.
120. Skeberdis VA, Lan J, Zheng X, Zukin RS, Bennett MV. Insulin promotes rapid delivery of N-methyl-D- aspartate receptors to the cell surface by exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:3561-6.
121. Christie JM, Wenthold RJ, Monaghan DT. Insulin causes a transient tyrosine phosphorylation of NR2A and NR2B NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *J Neurochem* 1999;72:1523-8.
122. Montagnani M, Ravichandran LV, Chen H, Esposito DL, Quon MJ. Insulin receptor substrate-1 and phosphoinositide-dependent kinase-1 are required for insulin-

- stimulated production of nitric oxide in endothelial cells. *Mol Endocrinol* 2002;16:1931-42.
123. Hoyer S. Is sporadic Alzheimer disease the brain type of non-insulin dependent diabetes mellitus? A challenging hypothesis. *J Neural Transm* 1998;105:415-422.
124. Craft S. The role of metabolic disorders in Alzheimer disease and vascular dementia: two roads converged. *Arch Neurol* 2009;66:300-5.
125. Craft S. Insulin resistance syndrome and Alzheimer disease: pathophysiologic mechanisms and therapeutic implications. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2006;20:298-301.
126. Rivera EJ, Goldin A, Fulmer N, Tavares R, Wands JR, de la Monte SM. Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine. *J Alzheimers Dis* 2005;8:247-68.
127. Steen E, Terry MB, Riviera JE i sur. Impaired insulin and insulin-like growth factor expresion and signaling mechanisms in Alzheimer's disease-is this type 3 diabetes? *J of Alzheimer's disease* 2005;7:63-80.
128. Craft S, Peskind E, Schwartz MW, Sdhellenberg GD, Raskind M, Porte jr D. Cerebrospinal fluid and plasma insulin levels in Alzheimer's disease: relationship to severity of dementia and apolipoprotein E genotype. *Neurology* 1998;50:164-168.
129. Swaab DF, Raadsheer FC, Endert E, Hofman MA, Kamphorst W, Ravid R. Increased cortisol levels in aging and Alzheimer's disease in postmortem cerebrospinal fluid. *J Neuroendocrinol* 1994;6:681-7.
130. Souza-Talarico JN, Chaves EC, Lupien SJ, Nitrini R, Caramelli P. Relationship between cortisol levels and memory performance may be modulated by the presence or absence of cognitive impairment: evidence from healthy elderly, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease subjects. *J Alzheimers Dis* 2010;19:839-48.
131. Belanoff OJK, Gross K, Yager A, Schatzberg AF. Corticosteroids and cognition. *J Psychiatric Res* 2001;35:127-45.
132. Swannick GR, Kirby M, Bruce I, Buggy F, Coen RF, Coakley D, Lawlor BA. Hypothalamic-pituitary-axis dysfunction in Alzheimer's disease.Lack of association between longitudinal and cross-sectional findings. *Am J Psychiatry* 1998;155:286-289.
133. Peskind ER, Elrod R, Dobie DJ i sur. Cerebrospinal fluid epinephrine in Alzheimers disease and normal aging. *Neuropsychopharm* 1998;19:465-471.

134. Preece P, Virley DJ, Costandi M i sur. Beta-secretase (BACE) and GSK-3 mRNA levels in Alzheimer's disease. *Mol Brain Res* 2003;116:155-158.
135. Pei JJ, Tanaka T, Tung YC, Braak E, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Distribution , levels, and activity of glycogen synthase kinase 3 in the Alzheimer disease brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997;56:70-78.
136. Rickle A, Bogdanovic N, Volkman I, Winblad B, Ravid R, Cowburn RF. Akt activity in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Neuroreport* 2004;15:955-9.
137. Sontag E, Luangpirom A, Hladik C I sur. Altered expression levels of protein phosphatase 2A AB α C enzyme are associated with Alzheimer disease pathology. *J Neuroptahol Exp Neurol* 2004;63:287-301.
138. Sontag E, Hladik C, QIHC HT (ASCP) I sur. Downregulation of protein phosphatase 2A carboxyl methylation and methyltransferase may contribute to Alzheimer disease pathogenesis. *J Neuroptahol Exp Neurol* 2004;63:1080-91.
139. Gong CX, Shaikh S, Wang JZ, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated tau: decrease in Alzheimer disease brain. *J Neurochem* 1995;65:732-38.
140. Qiu WQ, Folstein MF. Insulin, insulin-degrading enzyme and amyloid-beta peptide in Alzheimer's disease: review and hypothesis. *Neurobiol Aging* 2006;27:190-98.
141. Cook DG, Leverenz JB, McMillan PJ i sur. Reduced hippocampal insulin-degrading enzyme in late-onset Alzheimer's disease is associated with the apolipoprotein E-epsilon4 allele. *Am J Pathol* 2003;162:313-9.
142. Yamada K, Nabeshima T. Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs. *Pharm Ther* 2000;88:93-113.
143. Hsiao K, Chapman P, Nilsen S i sur. Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 1996;274:99-102.
144. Duyckaerts C, Potier M-C, Delatour B. Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol* 2008;115: 5–38.
145. Holcomb LA, Gordon MN, Jantzen P, Hsiao K, Duff K, Morgan D. Behavioral changes in transgenic mice expressing both amyloid precursor protein and presenilin-1 mutations: lack of association with amyloid deposits. *Behav Genet* 1999;29:177-85.
146. Ho L, Qin W, Pompl PN i sur. Diet-induced insulin resistance promotes amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J* 2004;18:902-4.

147. Zhao L, Teter B, Morihara T i sur. Insulin-degrading enzyme as a downstream target of insulin receptor signaling cascade: implications for Alzheimer's disease intervention. *J Neurosci* 2004;24:11120-6.
148. Devi L, Alldred MJ, Ginsberg SD, Ohno M. Mechanisms underlying insulin deficiency-induced acceleration of β -amyloidosis in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* 2012;7:e32792.
149. Jolivald CG, Hurford R, Lee CA, Dumaop W, Rockenstein E, Masliah E. Type 1 diabetes exaggerates features of Alzheimer's disease in APP transgenic mice. *Exp Neurol* 2010;223:422-31.
150. Plaschke K, Kopitz J, Siegelin M i sur. Insulin-resistant brain state after intracerebroventricular streptozotocin injection exacerbates Alzheimer-like changes in Tg2576 AbetaPP-overexpressing mice. *J Alzheimers Dis* 2010;19:691-704.
151. Lannert H, Hoyer S. Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. *Behav Neurosci* 1998;112:1199-1208.
152. Bolzán AD, Bianchi MS. Genotoxicity of streptozotocin. *Mutat Res* 2002;512:121-34.
153. de la Monte SM, Tong M. Mechanisms of nitrosamine-mediated neurodegeneration: potential relevance to sporadic Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2009;17(4):817-25.
154. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cell of the rat pancreas. *Physiol Res* 2001;50: 537-546.
155. Gai W, Schott-Ohly P, Schulte im Walde S, Gleichmann H. Differential target molecules for toxicity induced by streptozotocin and alloxan in pancreatic islets of mice in vitro. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2004;112:29-37.
156. Blondel O, Portha B. Early appearance of in vivo insulin resistance in adult streptozotocin-injected rats. *Diabete Metab* 1989;15:382-7.
157. Kadowaki T, Kasuga M, Akanuma Y, Ezaki O, Takaku F. Decreased autophosphorylation of the insulin receptor-kinase in streptozotocin-diabetic rats. *J Biol Chem* 1984;259:14208-16.
158. Giorgino F, Chen JH, Smith RJ. Changes in tyrosine phosphorylation of insulin receptors and a 170,000 molecular weight nonreceptor protein in vivo in skeletal muscle of streptozotocin-induced diabetic rats: effects of insulin and glucose. *Endocrinology* 1992;130:1433-44.

159. Havrankova J, Schmechel D, Roth J, Brownstein M. Identification of insulin in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978;75:5737-41.
160. Havrankova J, Roth J, Brownstein M. Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature* 1978;27:827-9.
161. Mayer G, Nitsch R, Hoyer S. Effects of changes in peripheral and cerebral glucose metabolism on locomotor activity, learning and memory in adult male rats. *Brain Res* 1990;532:95-100.
162. Lacković Z, Šalković M. Streptozocin and alloxan produce alterations in rat brain monoamines independently of pancreatic beta cells destruction. *Life Sci* 1990;46:49-54.
163. Prickaerts J, Fähring T, Blokland A. Cognitive performance and biochemical markers in septum, hippocampus and striatum of rats after an i.c.v. injection of streptozotocin: a correlation analysis. *Behav Brain Res* 1999;102:73-78.
164. Salkovic-Petrisic M, Tribl F, Schmidt M, Hoyer S, Riederer P. Alzheimer-like changes in protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 in rat frontal cortex and hippocampus after damage to the insulin signalling pathway. *J Neurochem* 2006;96:1005-15.
165. Arluison M, Quignon M, Nguyen P, Thorens B, Leloup C, Penicaud L. Distribution and anatomical localization of the glucose transporter 2 (GLUT2) in the adult rat brain--an immunohistochemical study. *J Chem Neuroanat* 2004;28:117-36.
166. Arluison M, Quignon M, Thorens B, Leloup C, Penicaud L. Immunocytochemical localization of the glucose transporter 2 (GLUT2) in the adult rat brain. II. Electron microscopic study. *J Chem Neuroanat* 2004;28:137-46.
167. Pinton S, da Rocha JT, Gai BM, Nogueira CW. Sporadic dementia of Alzheimer's type induced by streptozotocin promotes anxiogenic behavior in mice. *Behav Brain Res*. 2011;223:1-6.
168. Blokland A, Jolles J. Behavioral and biochemical effects of an ICV injection of streptozotocin in old Lewis rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1994;47:833-7
169. Prickaerts J, De Vente J, Honig W i sur. Nitric oxide synthase does not mediate neurotoxicity after an i.c.v. injection of streptozotocin in the rat. *J Neural Transm* 2000;107:745-66.
170. Blokland A, Jolles J. Spatial learning deficit and reduced hippocampal ChAT activity in rats after an ICV injection of streptozotocin. *Pharmacol Biochem Behav* 1993;44:491-4.

171. Hellweg R, Nitsch R, Hock C, Jaksch M, Hoyer S. Nerve growth factor and choline acetyltransferase activity levels in the rat brain following experimental impairment of cerebral glucose and energy metabolism. *J Neurosci Res* 1992;31:479-86.
172. Tota S, Kamat PK, Shukla R, Nath C. Improvement of brain energy metabolism and cholinergic functions contributes to the beneficial effects of silibinin against streptozotocin induced memory impairment. *Behav Brain Res* 2011;221:207-15.
173. Schaeffer EL, Gattaz WF. Cholinergic and glutamatergic alterations beginning at the early stages of Alzheimer disease: participation of the phospholipase A2 enzyme. *Psychopharmacology (Berl)* 2008;198:1-27.
174. Murray AM, Weihmueller FB, Marshall JF, Hurtig HI, Gottlieb GL, Joyce JN. Damage to dopamine systems differs between Parkinson's disease and Alzheimer's disease with parkinsonism. *Ann Neurol* 1995;37:300-12.
175. Perry E, Court J, Goodchild R i sur. Clinical neurochemistry: developments in dementia research based on brain bank material. *J Neural Transm* 1998;105:915-33.
176. Salković M, Sabolić I, Lacković Z. Striatal dopaminergic D1 and D2 receptors after intracerebroventricular application of alloxan and streptozocin in rat. *J Neural Transm Gen Sect* 1995;100:137-45.
177. Ding A, Nitsch R, Hoyer S. Changes in brain monoaminergic neurotransmitter concentrations in rat after intracerebroventricular injection of streptozotocin. *J Cereb Blood Flow Metab* 1992;12:103-9.
178. Salković-Petrisić M, Lacković Z. Intracerebroventricular administration of betacytotoxics alters expression of brain monoamine transporter genes. *J Neural Transm.* 2003;110:15-29.
179. Labak M, Foniok T, Kirk D, Rushforth D, Tomanek B, Jasiński A, Grieb P. Metabolic changes in rat brain following intracerebroventricular injections of streptozotocin: a model of sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neurochir* 2010;106 Suppl:177-81.
180. Shonesy BC, Thiruchelvam K, Parameshwaran K i sur. Central insulin resistance and synaptic dysfunction in intracerebroventricular-streptozotocin injected rodents. *Neurobiol Aging* 2012;33:430.e5-18.
181. Grünblatt E, Hoyer S, Riederer P. Gene expression profile in streptozotocin rat model for sporadic Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 2004;111:367-86.

182. Boyd FT Jr, Clarke DW, Muther TF, Raizada MK. Insulin receptors and insulin modulation of norepinephrine uptake in neuronal cultures from rat brain. *J Biol Chem* 1985;260:15880-4.
183. Salkovic-Petrisic M, Hoyer S. Central insulin resistance as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: an experimental approach. *J Neural Transm* 2007;72 Suppl:217-33.
184. Grünblatt E, Salkovic-Petrisic M, Osmanovic J, Riederer P, Hoyer S. Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. *J Neurochem* 2007;101:757-70.
185. 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;9:13-33.
186. Agrawal R, Tyagi E, Shukla R, Nath C. Insulin receptor signaling in rat hippocampus: a study in STZ (ICV) induced memory deficit model. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2011;21:261-73.
187. Agrawal R, Mishra B, Tyagi E, Nath C, Shukla R. Effect of curcumin on brain insulin receptors and memory functions in STZ (ICV) induced dementia model of rat. *Pharmacol Res* 2010;61:247-52.
188. Deng Y, Li B, Liu Y, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Gong CX. Dysregulation of insulin signaling, glucose transporters, O-GlcNAcylation, and phosphorylation of tau and neurofilaments in the brain: Implication for Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 2009;175:2089-98.
189. Shingo AS, Kanabayashi T, Murase T, Kito S. Cognitive decline in STZ-3V rats is largely due to dysfunctional insulin signalling through the dentate gyrus. *Behav Brain Res* 2012;229:378-83.
190. Sharma M, Gupta YK. Intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats produces both oxidative stress in the brain and cognitive impairment. *Life Sci* 2001;68:1021-9.
191. Sharma M, Gupta YK. Effect of chronic treatment of melatonin on learning, memory and oxidative deficiencies induced by intracerebroventricular streptozotocin in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2001;70:325-31.
192. Sharma M, Gupta YK. Chronic treatment with trans resveratrol prevents intracerebroventricular streptozotocin induced cognitive impairment and oxidative stress in rats. *Life Sci* 2002;71:2489-98.

193. Shoham S, Bejar C, Kovalev E, Schorer-Apelbaum D, Weinstock M. Ladostigil prevents gliosis, oxidative-nitrative stress and memory deficits induced by intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. *Neuropharmacology* 2007;52:836-43.
194. Ishrat T, Khan MB, Hoda MN, Yousuf S, Ahmad M, Ansari MA, Ahmad AS, Islam F. Coenzyme Q10 modulates cognitive impairment against intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. *Behav Brain Res* 2006;171:9-16.
195. Rinwa P, Jaggi AS, Singh N. Pharmacological investigation of memory restorative effect of riluzole in mice. *Indian J Pharmacol* 2012;44:366-71.
196. Tiwari V, Kuhad A, Bishnoi M, Chopra K. Chronic treatment with tocotrienol, an isoform of vitamin E, prevents intracerebroventricular streptozotocin-induced cognitive impairment and oxidative-nitrosative stress in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2009;93:183-9.
197. Dalla Y, Singh N, Jaggi AS, Singh D. Memory restorative role of statins in experimental dementia: an evidence of their cholesterol dependent and independent actions. *Pharmacol Rep* 2010;62:784-96.
198. Javed H, Khan MM, Ahmad A i sur. Rutin prevents cognitive impairments by ameliorating oxidative stress and neuroinflammation in rat model of sporadic dementia of Alzheimer type. *Neuroscience* 2012;210:340-52.
199. Sharma B, Singh N, Singh M, Jaggi AS. Exploitation of HIV protease inhibitor Indinavir as a memory restorative agent in experimental dementia. *Pharmacol Biochem Behav* 2008;89:535-45.
200. Tota S, Kamat PK, Saxena G, Hanif K, Najmi AK, Nath C. Central angiotensin converting enzyme facilitates memory impairment in intracerebroventricular streptozotocin treated rats. *Behav Brain Res* 2012;226:317-30.
201. Prakash AK, Kumar A. Effect of chronic treatment of carvedilol on oxidative stress in an intracerebroventricular streptozotocin induced model of dementia in rats. *J Pharm Pharmacol*. 2009;61:1665-72.
202. Muller AP, Zimmer ER, Kalinine E i sur. Physical Exercise Exacerbates Memory Deficits Induced by Intracerebroventricular STZ but Improves Insulin Regulation of H₂O₂ Production in Mice Synaptosomes. *J Alzheimers Dis* 2012;30:889-98.
203. Müller D, Nitsch RM, Wurtman RJ, Hoyer S. Streptozotocin increases free fatty acids and decreases phospholipids in rat brain. *J Neural Transm* 1998;105:1271-81.

204. Plaschke K, Müller D, Hoyer S. Insulin-resistant brain state (IRBS) changes membrane composition of fatty acids in temporal and entorhinal brain cortices of rats: relevance to sporadic Alzheimer's disease? *J Neural Transm.* 2010;117:1419-22.
205. Nitsch R, Hoyer S. Local action of the diabetogenic drug, streptozotocin, on glucose and energy metabolism in rat brain cortex. *Neurosci Lett* 1991;128:199-202.
206. Pathan AR, Viswanad B, Sonkusare SK, Ramarao P. Chronic administration of pioglitazone attenuates intracerebroventricular streptozotocin induced memory-impairment in rats. *Life Sci* 2006;79:2209-16.
207. Duelli R, Schrock H, Kuschinsky W, Hoyer S. Intracerebroventricular injection of streptozotocin induces discrete local changes in cerebral glucose utilization in rats. *Int J Dev Neurosci* 1994;12:737-43.
208. Plasche K, Hoyer S. Action of the diabetogenic drug streptozotocin on glycolytic metabolism in adult rat brain cortex and hippocampus. *Int J Dev Neurosci* 1993;11:477-83.
209. Tota S, Awasthi H, Kamat PK, Nath C, Hanif K. Protective effect of quercetin against intracerebral streptozotocin induced reduction in cerebral blood flow and impairment of memory in mice. *Behav Brain Res* 2010;209:73-9.
210. Rubio-Perez JM, Morillas-Ruiz JM. A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *ScientificWorldJournal* 2012;2012:756357.
211. Shoham S, Bejar C, Kovalev E, Weinstock M. Intracerebroventricular injection of streptozotocin causes neurotoxicity to myelin that contributes to spatial memory deficits in rats. *Exp Neurol* 2003;184:1043-52.
212. Grieb P, Kryczka T, Fiedorowicz M, Frontczak-Baniewicz M, Walski M. Expansion of the Golgi apparatus in rat cerebral cortex following intracerebroventricular injections of streptozotocin. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 2004;64:481-9.
213. Grünblatt E, Koutsilieri E, Hoyer S, Riederer P. Gene expression alterations in brain areas of intracerebroventricular streptozotocin treated rat. *J Alzheimers Dis* 2006 Aug;9:261-71.
214. Salkovic-Petrisic M, Osmanovic-Barilar J, Brückner MK, Hoyer S, Arendt T, Riederer P. Cerebral amyloid angiopathy in streptozotocin rat model of sporadic Alzheimer's disease: a long-term follow up study. *J Neural Transm* 2011;118:765-72.
215. Salkovic-Petrisic M, Knezovic A, Hoyer S, Riederer P. What have we learned from the streptozotocin-induced animal model of sporadic Alzheimer's disease, about the

- therapeutic strategies in Alzheimer's research. *J Neural Transm* 2012 Aug. [Epub ahead of print]
216. Sonkusare S, Srinivasan K, Kaul C, Ramarao P. Effect of donepezil and lercanidipine on memory impairment induced by intracerebroventricular streptozotocin in rats. *Life Sci* 2005;77:1-14.
 217. Saxena G, Singh SP, Agrawal R, Nath C. Effect of donepezil and tacrine on oxidative stress in intracerebral streptozotocin-induced model of dementia in mice. *Eur J Pharmacol* 2008;581:283-9.
 218. Sharma B, Singh N, Singh M. Modulation of celecoxib- and streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's disease by pitavastatin and donepezil. *J Psychopharmacol* 2008;22:162-171.
 219. Weinstock M, Kirschbaum-Slager N, Lazarovici P, Bejar C, Youdim MB, Shoham S. Neuroprotective effects of novel cholinesterase inhibitors derived from rasagiline as potential anti-Alzheimer drugs. *Ann N Y Acad Sci* 2001;939:148-161.
 220. Shoham S, Bejar C, Kovalev E, Schorer-Apelbaum D, Weinstock M. Ladostigil prevents gliosis, oxidative-nitrative stress and memory deficits induced by intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. *Neuropharmacology* 2007;52:836-843.
 221. Ponce-Lopez T, Liy-Salmeron G, Hong E, Meneses A. Lithium, phenserine, memantine and pioglitazone reverse memory deficit and restore phospho-GSK3 β decreased in hippocampus in intracerebroventricular streptozotocin induced memory deficit model. *Brain Res* 2011;1426:73-85.
 222. Chen S, Liu AR, An FM, Yao WB, Gao XD. Amelioration of neurodegenerative changes in cellular and rat models of diabetes-related Alzheimer's disease by exendin-4. *Age (Dordr)* 2012;34:1211-24.
 223. Li L, Zhang ZF, Holscher C, Gao C, Jiang YH, Liu YZ.(Val⁸) glucagon-like peptide-1 prevents tau hyperphosphorylation, impairment of spatial learning and ultra-structural cellular damage induced by streptozotocin in rat brains. *Eur J Pharmacol* 2012;674:280-6.
 224. Kaur B, Singh N, Jaggi AS. Exploring mechanism of pioglitazone-induced memory restorative effect in experimental dementia. *Fundam Clin Pharmacol* 2009;23:557-566.

225. de la Monte SM, Tong M, Lester-Coll N, Plater M Jr, Wands JR. Therapeutic rescue of neurodegeneration in experimental type 3 diabetes: relevance to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2006;10:89-109.
226. Noble EP, Wurtman RJ, Axelrod J. A simple and rapid method for injecting H3-norepinephrine into the lateral ventricle of the rat brain. *Life Sci* 1967; 6: 281-91.
227. Anger WK. Animal test systems to study behavioral dysfunctions of neurodegenerative disorders. *Neurotoxicology* 1991;12:403-13.
228. D'Hooge R, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Brain Res Rev* 2001;36:60-90.
229. Sharma S, Rakoczy S, Brown-Borg H. Assessment of spatial memory in mice. *Life Sci* 2010;87:521-36.
230. Rossato JI, Zinn CG, Furini C i sur. A link between the hippocampal and the striatal memory systems of the brain. *An Acad Bras Cienc* 2006;78:515-23.
231. Liu P, Bilkey DK. Perirhinal cortex contributions to performance in the Morris water maze. *Behav Neurosci* 1998 Apr;112:304-15
232. Nitz D. Parietal cortex, navigation, and the construction of arbitrary reference frames for spatial information. *Neurobiol Learn Mem.* 2009;91:179-85.
233. Carrillo-Mora P, Giordano M, Santamaría A. Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behav Brain Res* 2009;203:151-164.
234. Olton DS, Papas BC. Spatial memory and hippocampal function. *Neuropsychologia* 1979;17:669-82.
235. Givens BS, Olton DS. Cholinergic and GABAergic modulation of medial septal area: effect on working memory. *Behav Neurosci* 1990;104:849-55.
236. Wan RQ, Pang K, Olton DS. Nonhippocampal muscarinic receptors are required for nonspatial working memory. *Pharmacol Biochem Behav.* 1997;58:361-7.
237. Chudasama Y, Izquierdo A, Murray EA. Distinct contributions of the amygdala and hippocampus to fear expression. *Eur J Neurosci* 2009;30:2327-37.
238. Burwell RD, Saddoris MP, Bucci DJ, Wiig KA. Corticohippocampal contributions to spatial and contextual learning. *J Neurosci.* 2004;24:3826-36.
239. Zhao W, Chen H, Xu H i sur. Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. *J Biol Chem* 1999;274(49):34893-902.

240. Chan CB, Ye K. What we have learnt about PIKE from the knockout mice. *Int J Biochem Mol Biol.* 2011;2:228-39.
241. Wen Y, Planel E, Herman M i sur. Interplay between cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase 3 beta mediated by neuregulin signaling leads to differential effects on tau phosphorylation and amyloid precursor protein processing. *J Neurosci* 2008;28:2624-32.
242. Takahashi M, Iseki E, Kosaka K. Cdk5 and munc-18/p67 co-localization in early stage neurofibrillary tangles-bearing neurons in Alzheimer type dementia brains. *J Neurol Sci* 2000;172:63-9.
243. Ferrer I, Blanco R, Carmona M, Ribera R, Goutan E, Puig B, Rey MJ, Cardozo A, Viñals F, Ribalta T. Phosphorylated map kinase (ERK1, ERK2) expression is associated with early tau deposition in neurones and glial cells, but not with increased nuclear DNA vulnerability and cell death, in Alzheimer disease, Pick's disease, progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *Brain Pathol* 2001;11:144-58.
244. Gelling RW, Morton GJ, Morrison CD i sur. Insulin action in the brain contributes to glucose lowering during insulin treatment of diabetes. *Cell Metab* 2006;3:67-73.
245. Domnitz SB, Robbins EM, Hoang AW i sur. Progression of cerebral amyloid angiopathy in transgenic mouse models of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005;64:588-94.
246. Garcia-Alloza M, Robbins EM, Zhang-Nunes SX i sur. Characterization of amyloid deposition in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol Dis* 2006;24:516-24.
247. Attems J, Lintner F, Jellinger KA. Amyloid beta peptide 1-42 highly correlates with capillary cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease pathology. *Acta Neuropathol* 2004;107:283-91.
248. Attems J, Jellinger KA. Acta Only cerebral capillary amyloid angiopathy correlates with Alzheimer pathology--a pilot study. *Neuropathol* 2004;107:83-90.
249. Stopa EG, Butala P, Salloway S i sur. Cerebral cortical arteriolar angiopathy, vascular beta-amyloid, smooth muscle actin, Braak stage, and APOE genotype. 2008;39:814-21.

10.ŽIVOTOPIS

Ime: JELENA OSMANOVIĆ BARILAR

Datum i mjesto rođenja: 09. 09. 1979. Bjelovar, Hrvatska

Zaposlenje: 2004-2005 Opća bolnica "Sveti Duh", Zagreb
2005- Zavod za Farmakologiju, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Školovanje: 1998-2004 Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu
2004-2005 Liječnički pripravnički staž: Opća bolnica "Sveti Duh"
2005-2009 Doktorski studij: Biomedicina i zdravstvo Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Hrvatska
2006-2007 Dva semestra na Medicinskom fakultetu Bayerische Julius- Maximilians Universität Würzburg, Njemačka
2008 Inauguracijski doktorat na Medicinskom fakultetu Julius-Maximilians Universität Würzburg, Njemačka

Radno iskustvo 2004-2005 Pripravnički staž u Općoj bolnici "Sveti Duh", Zagreb
2005-2009 Znanstveni novak na Zavodu za farmakologiju Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu
2009- Asistent na Zavodu za farmakologiju Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu
2011- Specijalizant Kliničke farmakologije na Zavodu za Kliničku farmakologiju, Klinički bolnički centar Rebro

Stipendije: 2006 Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD), Germany za projekt: „Brain insulin system alterations in probable experimental models of Alzheimer’s disease”

Kongresi 2006 5 hrvatskih kongresa
5 stranih kongresa

Objavljeni radovi 4 znanstvena rada (2CC)

Jezici Engleski i njemački jezik

Članstvo 2005- Hrvatsko farmakološko društvo
2005- Hrvatska liječnička komora