**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Jelena Osmanović Barilar**

**Inzulinski sustav mozga u eksperimentalnom**

**štakorskom modelu sporadične alzheimerove**

**bolesti**

DISERTACIJA

**Zagreb, 2009.**

**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 posebno starije populacije *(1).* Učestalost AD raste s godinama života, tako da je u Europi učestalost između 65-69 godine života 0.6 %, a kod populacije starije od 90 godina 22.2%. U Sjedinjenim Američkim Državama je nađena slična učestalost od 1% između 60-64 te 25% nakon 85 godine (Jalbert JJ 2008). U Hrvatskoj nema službenog registra oboljelih od Alzheimerove bolesti, no s obzirom na to da smo populacijski stara zemlja, realno bi bilo za pretpostaviti da od AD boluje oko 80.000 stanovnika (Pecotić i sur., 2007, brošura.).

Bolest je dobila naziv po njemačkom neurologu dr. Aloizu Alzheimeru koji je njena obilježja detaljno opisao 1907. godine u 51 godišnje pacijentice Auguste D (Pecotić). Iako opisana početkom prošlog stoljeća, te je do sada prikupljeno puno novih spoznaja, AD 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 (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 *(1,2).* Kod familijarnog tip AD nalazimo mutacije tri gena: gen za presenilin-2 na kromosomu 1, gena za presenilin-1 na kromosomu 14 ili gena za APP (amiloidnog prekursurnog proteina) na 21 kromosomu, koje uzrokuju poremećaja razgradnje APP-a beta i gama sekretazom te nastanka amiloida-beta (Aβ) proteina koji se smatra glavnim pokretačem bolesti Slika (1). S druge strane etipatogeneza sporadičnog tipa AD još je nedovoljno poznata *(1*,*2)*.Postoji više hipoteza o nastanku AD, no prema najprihvaćenijoj klasičnoj amiloidnoj hipotezi, etiologija svih oblika AD povezana je s Aβ patologijom kao primarnim događajem koji vremenom dovodi i do drugih neurokemijskih, strukturnih, te posebno kognitivnih poremećaja *(2).* Ovom hipotezom je lako objasniti nastanak familijarne AD, dok je takva hipoteza teško primjenjiva na sAD uzevši u obzir da količina plakova ne korelira sa stupnjem demencije (ref Š). U razriješenju etiopatogeneze sAD-a mogli bi nam pomoći rizični čimbenici za nastanak bolesti. *(3,4,re Šf).* Jedna od najznačajnijih rizični čimbenik je dob;istraživanja su pokazala da u dobi od 65 do 85 godine prevalencija raste gotovo eksponencijalno (refŠ). Slijedeći značajni rizični čimbenik je posjedovanje jednog ili oba alela za apolipoprotein E ε4, zatim pozitivna obiteljska anamneza te u najnovije vrijeme i dijabetes tipa II i hipertenzija. Longitudinalnom studijom provedenom na više od 2000 ispitanika, koji su u vrijeme početka studije bili stari 50 godina, nađeno je da je nakon 32 godine 102 osobe razvilo sAD. Kod osoba koje su razvile sAD nađeno je u srednjim godinama oštećenje prve faze lučenja inzulina što upućuje na usku povezanost poremećaja inzulina i patogeneze sAD. (Ronnemaa). Također je kod oboljelih od sAD uz pomoć PET-scean analize moždanog tkiva nađeno smanjeno iskorištavanje glukoze, koje je koreliralo sa stupnjem demencije.(Masconi 2005)

U posljednje vrijeme sve je više neurokemijskih istraživanja postmortalnog tkiva mozga bolesnika oboljelih od sAD koji upućuju da inzulin i inzulinski receptori u mozgu igraju važnu ulogu u metabolizmu glukoze, APP i nastanku Aβ, te da su važni u održavanju ravnoteže između fosforiliranog i nefosforiliranog oblika tau proteina *(3-5)*.

***1.1.2. Klinička slika***

Alzheimerova bolest je karakterizirana postupnim gubitkom kognitivnih funkcija pamćenja i učenja. Manifestira se gubitkom epizodičnog eksplicitnog (deklerativnog) pamćenja, a očituje se nemogućnošću pohranjivanja novih podataka i progresivnim propadanjem pamćenja iz nedavne prošlosti. Jedan od prvih znakova bolesti je nemogućnost pronalaženja prave riječi tijekom spontanog govora. Tada je još uvijek očuvano implicitno (proceduralno) pamćenje i motorika.

Daljnim napredovanjem bolesti sve više dolazi do progresije demencije, bolesnik sve teže prepoznaje oklolinu i sebi bliske osobe, semantičko eksplicitno pamćenje postaje sve slabije. Bolesnici se još uvijek rado prisjećaju davnih događaja, te se često vraćaju u svoju mladost zaboravljajući pri tome vrijeme u kojem trenutačno žive. Implicitno pamćenje i motorika je i dalje očuvano.

Na posljetku eksplicitno je pamćenje nepovratno izgubljeno (epizodičko i semantičko), a započinje i gubitak implicitnog pamćenje. Pojavljuju se motorički ispadi i raste incidencija epileptičkih napada.

U bilo kojem razdoblju trajanja bolesti mogu se javiti i neuropsihijatrijski simptomi koji uključuju agresivnost, agitaciju, depresiju, apatiju, anksioznost, halucinacije i deluzije.

Važno je napomenuti da se težina simptoma i brzina napredovanja bolesti razlikuje od pacijenta do pacijenta.

***1.1.3. Histopatološka obilježja AD***

S neuropatloškog stanovišta glavne promjene u AD-u su senilni plakovi, neurofibrilarni snopići i izražena atrofija mozga zbog gubitka neurona i sinapsi (Katzman, Dickstein). 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. Međutim kod AD-e dolazi do hiperfosforilacije tau proteina što uzrokuje stvaranje sparenih uzvojitih filamenata čime se gubi funkcije ovih proteina. S Druge strane u mozgu oboljelih od AD nalazimo izvanstanične nakupine Aβ peptida koje u konačnom stadiju bolesti formiraju tzv. senilne plakove. Imunohistokemijskim metodama je dokazano da su plakovi prvenstveno građeni od Aβ 1-42/43 oblika čiji oligomeri imaju jako neurotoksično djelovanje, a nastaju cijepanjem APP-a. APP je transmembranski protein nepoznate funkcije kojeg cijepaju tri proteaze, a to su α-, ß- i γ-sekretaza. Cijepanjem APP-a s α- ili ß-sekretazom nastaju veliki topivi N-terminalni segmenti sAPPα i sAPPß, te mali C-terminalni segmenti C83 i C99. Oba membranski vezana fragmenta C83 i C99 dalje podliježu razgradnji γ-sekretazom, te dolazi do nastajnja p3 nepatogenog peptida i neurotoksičnog Aß1-42/43 (Slika 1) (*1,2,Yan Lin)*. Osim neurofibrilarnih snopića i senilnih plakova kod AD nalazi se gubitak neurona i sinapsi koje je regionalno specifično i puno većeg intenziteta u usporedbi s normalnim starenjem (Dickson 2001, Terry 1991, 1981). Najosjetljiviji putevi koji i prvi propadaju kod AD su; prforatni put koji povezuje entorinalni korteks i hipokampus te duge kortiko-kortikalne projekcije. (Morrison 2002). Za razliku od normalnog starenja gdje nalazimo smanjenje veličine i neznatno smanjenje broja neurona, kod AD nalazimo izraženi gubitak neurona od oko 30% u entorinalnom korteksu i neokorteksu te gubitak sinapsu u neokorteksu od oko 45 % (Terry 1991, 1981). Također je kod AD nađen gubitak neurona od oko 68% u CA1 regiji hipokampusu (West 1994). Daljna su istraživanja pokazala da gubitak sinapsi dobro korelira sa napredovanjem demencije i rezultatima dobivenim kognitivnim testovima, što nije slučaj sa amiloidnim plakovima koji se mogu naći i u mozgu osoba bez demencije (Scheff, 2006).



***Slika 1***. *Metabolizam APP proteina.* Cijepanjem APP-a s α- ili ß-sekretazom nastaju **sAPPα** i **sAPPß** (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 nastajnja **p3** peptida i **Aβ** (neurotoksični Aß1-42/43)*.*

***1.1.4. Dijagnoza***

Uslijed nedostatka osjetljivosti i specifičnosti kliničkih kriterija ova se bolest još uvijek teško dijagnosticira u svakodnevnoj praksi. Budući da sigurnu i točnu dijagnozu nije moguće postaviti za života, već jedino pri obdukciji putem histo-patološkog nalaza, razvijeno je nekoliko strogih kriterija za dijagnozu vjerojatne bolesti. Kriteriji su sustavno navedeni u Međunarodnoj klasifikaciji bolesti (MKB-10), dijagnostičkom i statističkom priručniku za duševne poremećaje (DSM-IV) i priručniku National institute of neurological communicative disease and stroke –Alzheimer Association (NINCDS-ADRDA)

***Dijagnoza kognitivnog oštećenja se postavlja korištenjem jednog ili više psihometrijskih testova:*** MMSE, 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)

***Da bi se isključile druge bolesti pri dijagnozi AD koristi se:*** EEG (elektroencefalografija), CT (kompjuterska tomografija)***,*** MR (Magnetska rezonancija)***,*** PET (pozitronska emisijska tomografija),SPECT (pojedinačna fotonska emisijska tomografija)

Od ***Labaratorijskih pretrage*** mjerenje koncentracije hiperfosforiliranog tau proteina i topivog beta-amiloida u cerebrospinalnom likvoru se pokazalo vrlo dobrim metodama za razlikovanje AD od ostalih uzroka demencije.

***1.1.5. Terapija AD***

Terapiju AD je simptomatska, te se može podjeliti na farmakološku i nefarmakološku. S obzirom da ne postoji lijek koji liječi AD najidealnije bi bilo kombinirati ove dvije metode (Rubin CD). Smjernice Američkog društva psihijatra iz 2007 godine dijele nefarmakološku terapiju na: stimulacijski orijentiranu (fizikalna terapija, terapija muzikom), emocijonalno orijentiranu, kognitivno orijentiranu i bihevioralno orijentiranu terapiju. Mora se naglasiti da se ne zna točan stupanj povoljnog učinka nefarmakološke terapija jer ne postoje kontrolirane dvostruko slijepe randomizirane studije o ovoj vrsti terapije(211 iz JJ).

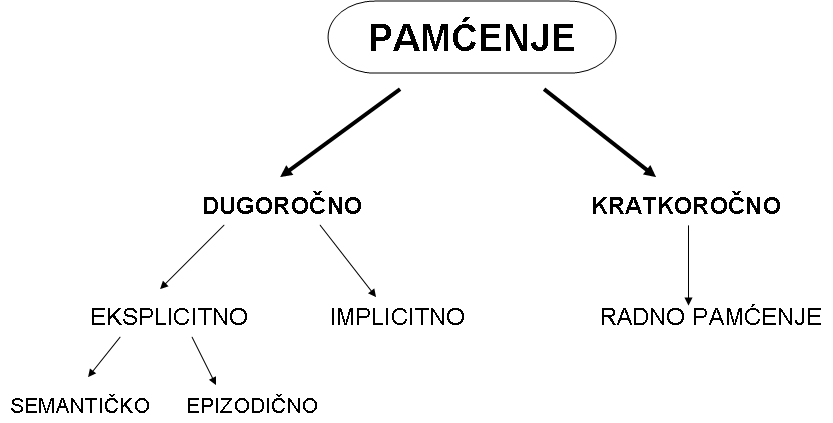
Farmakološka terapija obuhvaća: inhibitore kolinesteraze i antagonist glutamanergičkih memantin N-metil D-aspartat (NMDA) receptora -memantin. U inhibitore kolinesteraza koji se koriste u terapiji AD spadaju donepezil, rivostigmin, galantamin i takrin. Ovi lijekovi inhibirajući razgradnju acetilkolina (Ach) dovode do povećanja njegove razine, međutim ne dovode do poboljšanja nego samo uspravaju napredovanje bolesti. Takvo stanje relativne stabilnost može trajati 2-3 godine, nakon toga zbog daljneg propadanja neurona dolazi do pogoršanja. Memantin se veže na glutamatne NMDA receptore i inhibira njihovo pretjeranu neurotoksičnu aktivnost. Novije smjernice u terapiji AD preporučaju što raniji tretman AD koji će ovisiti o stadiju bolesti (S.S.). 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. S obzirom da raste udio starije populacije , a starost je najznačajniji rizični faktor AD, raste i potreba za pronalaskom lijekova koji će liječiti uzrok AD.

**1.2. UČENJE I PAMĆENJA**

***1.2.1. Različiti oblici učenja i pamćenja***

Mozak obavlja mnoge komplicirane funkcije, ali jedna od najintrigantnijih funkcija je mogućnost učenja novih podataka i njihovo pohranjivanje u svjesnom i podsvjesnom pamćenju (CNS). Pojednostavljeno, pamćenje možemo podjeliti na dugoročno i kratkoročno (radno) pamćenje. Dugoročno pamćenja možemo podjeliti u dvije temeljne skupine: eksplicitno (deklarativno) i implicitno (proceduralno) pamćenje (Slika 2). **Eksplicitno pamćenje (deklarativno)** je naučeno svjesnim naporom i na isti svjesni način ga prizivamo iz sjećanja. Jedan dio eksplicitnog pamćenja u kojem pohranjujemo vlastite životne događaje i uspomene vezane uz njih nazivamo ***epizodično pamćenje.*** Drugi dio eksplicitnog pamćenja u koji pohranjujemo opće znanje o pojmovima i činjenicam nazivamo ***semantičko pamćenje.*** Moždane strukture značajne za eksplicitno pamćenje smještene su u medijalnom temporalnom režnju, koji obuhvaća: hipokampus i susjedna mezokortikalna područja. Ova područja prva propadaju kod AD što i odgovara kliničkoj slici gubitka eksplicitnog pamćenja. S druge strane **Implicitno pamćenje (proceduralno)** je naučeno podsvjesno, s vremenom smo naučili navike i vještine za koje ne znamo kako smo ih naučili. Da bi naučili navike i vještine moramo imati intaktne određene dijelove mozga. Pogledamo li kliničku sliku AD, proceduralno pamćenje propada u zadnjem stadiju bolesti jer su strukture zadužene za proceduralno pamćenje očuvane do samog kraja bolesti *(Neuroscience i CNS).*

******

***Slika 2.*** *Pojednostavljeni prikaz**različitih oblika pamćenja.*

***1.2.2 Bazični mehanizmi učenja i pamćenja***

Bitna pojava na kojoj se bazira 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 *(Neuroscience, CNS).* Jedan od brojnih mehanizmama sinaptičke plastičnosti, koji na kraju svi dovode do trajne promjene učinkovitosti sinapsi, je pojava dugoročne potencijacije (LTP-long lasting potentiation). LTP je najbolje proučen u hipokampusu, djelu mozga bitnom za eksplicitno pamćenje, te se LTP smatra glavnom podlogom eksplicitnog pamćenja i asocijativnog učenja. Asocijativni se LTP pojavljuje u polju CA1 hipokampusa nakon što piramidni neuroni tog polja dobiju presinaptički podražaj Schafferovim kolateralama od neurona iz polja CA3, hipokampusa, a glavni neurotransmiter tog neuronskog kruga je ekscitacijska aminokiselina glutamat. Na postsinaptičkoj membrani glutamat se veže za ionotropne (kainatni, NMDA i AMPA) i metabotropne (mGluR) glutamatne receptore. LTP će se pojaviti jedino ako se istovremeno aktiviraju AMPA i kainatni receptori koji dovode do djelomične depolarizacije postsinaptičke membrane te dolazi do iskakanja Mg2+ iona iz kanala NMDA-receptora, tako otvoreni kanali NMDA-receptora na kojima je vezan glutamat sada propuštaju Ca2+ ione. Uz glutamat vrlo važnu ulogu u nastanku LTP-a ima dušikov oksid (NO). NO ima ulogu retrogradnog glasnika čiju sintezu u postsinaptičkom neuronu potiče Ca2+ kalmodulin kompleks. S obzirom da je NO vrlo mala i apolarna molekula plina, brzo i jednostavno difundira kroz presinaptičku membranu. Pretopostavlja se da je glavna uloga NO u presinaptičkom aksonu poticanje pojačane egzocitoze glutamata tj.potiče presinaptički akson na daljnu aktivnost *(Neuroscience , CNS).* (Slika 5)

**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 (Park 2001, Zhao WO 2004). Smatra se da je veći dio inzulina u mozgu podrijetlom sa priferije. Periferni inzulin se sintetizira u gušterači te krvlju dolazi do krvo-moždane barijere gdje se transportiran u mozak putem regionalno specifično smještenog inzulinskog nosača *(6).* Inzulinski nosača je protein nepoznate građe koji podliježe saturaciji. Brzina prijenosa inzulina putem nosača u mozak nije konstantna nego se mjenja ovisno o poterbama organizma, a nađena je smanjena kod AD *(6).* S druge strane, male količine inzulina mogu se sintetizirati i u mozgu. U čovjeka postoji jedan gen koji kodira za proinzulin, dok su u miševa i štakora prisutna dva gena za proinzulin I i II smještena na kromosomu 1. 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 *(7)*. Za razliku od neurona u glija stanicama nije nađena sinteza inzulina *(7)* Inzulin se sintetizira u obliku proinzulin 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 *(7)*.

U mozgu postoji polipeptid vrlo sličan inzulinu, a zove se IGF-I (Insulin growth factor-I). Ekspresija mRNA IGF-I u mozgu je za vrijem fetalnog razvoja vrlo visoka dok je u odrasloj dobi vrlo mala. Regije mozga u kojima se zadržava ekspresije mRNA IGF-I i u odrasloj dobi su: hipokampus, olfaktorni bulbus, hipotalamus, mali mozak, kao i u stanicama koroidnog pleksusa (Rotwein). Međutim se kao i za inzulin smatra da veći dio IGF-I u mozgu dolazi sa periferije. Na periferiji se IGF-I sintetizira u jetri pod kontrolom hormona rasta, te kao i inzulin prolazi krvo-moždanu barijeru putem specifičnog nosača. Iako se u krvi nalazi u nanomolarnim koncentracijama, za razliku od inzulina koji se nalazi u pikomolarnim koncentracijama, njegova aktivnost nije veća od inzulina jer je većim dijelom u plazmi vezan za IGF transportni protein (Baxter).

***1.3.2. Inzulinski receptor***

U mozgu se inzulin kao i na periferiji veže na inzulinske receptore (IR) koji su rasprostranjeni u različitim regijama mozga. Unutar mozga se IR nalazi u neuronima, ali i u glija stanicama, za razliku od samog inzulina čija je mRNA i sinteza nađena samo u neuronima (Houten, d). Najveće koncentracije IR u mozgu nađene su u olfaktornom bulbusu, hipotalamusu, cerebralnom korteksu, cerebelumu i hipokampusu *(5).* IR je heterotetramerni protein građen od 2α i 2β podjedinice koje su međusobno povezane disulfidnim vezama (Slika 3). Centralni IR se po građi razlikuje od perifernog IR po veličini α i ß podjedinice, a funkcionalno po tome što centralni IR ne podliježe negativnoj regulaciji od strane inzulin. Periferni IR ima malo veću α podjedinicu Mr=125 000, dok je veličina centralne α podjedinice manja i iznosi Mr=115 000. Također je i ß podjedinica perifernog IR veća Mr=90 000 u usporedbi sa centralnom ß podjedinicom Mr=83 000. IR pripada skupini tirozin-kinaznih receptora *(Heidenreich, ,9)*. Na α podjedinici, koja je izvanstanični dio receptora, nalazi se vezno mjesto inzulina (Slika 3). Kapacitet vezanja inzulina na IR iznosi 1.1-1.5 mol inzulina/mol receptora. Većim dijelom α podjedinica je hidrofilna s po kojim hidrofobnim dijelom. Tirozin kinazna aktivnost IR je vezana uz ß podjedinicu i Vmax kinazne aktivnosti iznosi 80 mmol/min/mg supstrata (9, Petruzzeli). ß podjedinica se može podijeliti na tri dijela. Središnji transmembranski dio ß podjedinice sadrži slijed od 23-26 hidrofobnih aminokiselina i djeli ß podjedinicu; na kraći izvanstanični dio koji je disulfidnim vezama vezan na α podjedinicu i duži citoplazmatski dio sa tirozin kinaznom aktivnošću (Slika 3) (g-1986). Na citoplazmatskom dijelu ß podjedinice nalazi se vezno mjesto za ATP, koji je glavni izvor fosfata potrebnih za autofosforilaciju ß podjedinice i fosforilaciju inzulin receptor supstrata (IRS) (Kasauga). Tirozin kinazni dio ß pdjedinice sastoji se od katalitičke i aktivacijske petlje (Hubbard-h) Aktivacijska petlja sadrži tri tirozinska ostatka 1158, 1162 i 1163 koja podliježu autofosforilaciji nakon vezanja inzulina i ATP-a na receptor. Katalitička petlja je ustvari kinaza koja vrši fosforilaciju supstrata. Hidroksilna grupa nefosforiliranog tirozinskog ostatka 1162 je vodikovim vezama vezana za Asp 1132 i Arg 1136 ostatke unutar katalitičke petlje. Tako vezan tirozinski ostatak 1162 blokira aktivni dio kinaze djelujući kao autoinhibitor (h). Vezanjem inzulina na IR dolazi do konformacijska promjena receptora, što omogućava vezanje ATP za ß podjedinicu. Zatim slijedi unakrsna autofosforilacija tirozinskih ostatka 1158, 1163 i 1162. Tako fosforilirana aktivacijska petlja je stabilizirana u novu komfiormaciju koja pomiče tirozinski ostatak 1162 sa aktivnog dijela katalitičke petlje omogućavajući vezanje IRS za ß podjedinicu IR (h). Osim autofosforilacije ova tri tirozinska ostatka, dolazi do fosforilacije jukstamembranskog tirozinskog ostatka 972 koji je važan za stabilizaciju veze između ß podjedinice IR i IR supstrata :IRS-1,Shc i STAT5B. Autofosforilacija tirozinskih ostataka 1328 i 1334 na C terminalnom karaju ß podjedinice je važna za mitogenu aktivnost inzulina/IR signalnog puta (Yoshiaki, Youngren).

Osim na IR inzulin se može vezati i na receptor za IGF-I (IGF-IR) koji također spada u tirozin kinazne receptore (Schumacher-S). Naravno afinitet inzulina za IGF-IR (KD=100 nM) je puno manji od afiniteta IGF-I (KD=1nM) (S). U mozgu odraslog čovjeka mRNA IGF-IR nađena je u koroidnom pleksusu, cirkumventrikularnom području, gornjim jezgrama olive te u piramidnim i granularnim neuronima korteksa (Bondy) IGF-IR je također građen od dvije α podjedinice i dvije ß podjedinice, koje su u nekim djelovima slične IR podjedinicama. Vezno mjesto IGF-I se nalazi na α podjedinici, ali u području bogatom cisteinom dok je vezno mjesto inzulina vezano za amino- i karboksi-terminalni dio IR. Unutar α podjedinice obaju receptora nađeno je poklapanje od 44% u području bogatom cisteinom (Slika 3). ß podjedinica IGF-IR ima veću molekularnu masu od ß podjedinic IR, a iznosi 105 kDa. Najveća sličnost od čak 85% između dvije ß podjedinice nađena je u tirozin kinaznom dijelu, zatim slijedi sličnost od 61% u transmembranskom dijelu. Najmanje preklapanje nađeno je u C-terminalnom dijelu ß podjedinice od 44% (Slika 3) (Lopaczynski).



***Slika 3*** *Prikaz građe 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 inzulinski receptor. Inzuli se veže na inzulinski receptor visokim afinitetom (KD~1.0 nM) (Gammeltoft-g 1973). Međutim otkriveno je da se afinitet vezanja inzulina 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 (de Meyts, g1978). Molekularni mehanizam promjene afinitete nije poznat, ali se pretpostavlja da razlog te promjene leži u promjeni konformavije samog IR (Czech). Vezanje inzulina za IR je ireverzibilno te nakon vezanja inzulina za IR dolazi do endocitoze inzulin/IR komplekasa (g1986). Nako endocitoze slijedi razgradnja inzulina, a IR se reciklira i vraća natrag na membranu (Fehlmann)

Inzulin/IR signalni put započinje vezanjem inzulina na α-podjedinicu IR što uzrokuje autofosforilaciju unutarstaničnih β-podjedinica te posljedično aktivaciju tirozin kinaze. Supstrati koji se vežu za aktivirani IR su IRS proteini, Shc *(Src homology collagen)* i APS *(adaptor protein sa SH2 i PH skupinama).* Skupina IRS proteina sastoji se od četri međusobno slična proteina (IRS 1-4) (Kido). Različite studije su pokazale da sva četri IRS proteina imaju određenu ulogu u daljnem prijenosu inzulinskog signala, ali IRS-1 je taj koji je važan za daljni prijenos signala uključenih u regulaciju metabolizma glukoze te procesa učenja i pamćenja. Vezanjem IRS-1 za aktiviranu β-podjedinicu IR dolazi do fosforilacije njegovih tirozinskih ostataka čime je omogućeno vezanje 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-kinaza sustava (*mitogen associated protein -* MAP) *(9, Youngren)*. Aktivacija MAP-kinazni sustav je vezan uz stanični rast i regulaciju sinteze proteina i nije predemet ovog istraživanja.

Citoplazmatski enzim PI-3K je heterodimerni protein građen od regulatorne podjedinice 50-85 kDa i katalitičke podjedinice od 110 kDa. Regulatorna podjedinica je bogata SH2 skupinama te omogućuje vezanje IP-3K za fosforilirani IRS-1 protein. Vezanjem za IRS-1 PI-3K se aktivira i fosforilira inozitolski prsten fosfoinozitola na D3 poziciji što dovodi do stvaranje PI-3 fosfata (PIP-3). Na PIP-3 vežu se različite serin/treonin kinaze (Akt/PKB, PKC, PDK-1) te tirozin kinaze (Src, Btk). Od PIP-3 ovisnih serin/treonin kinaza za regulaciju metabolizma glukoze najznačajnija je Akt/PKB. Akt/PKB se veže na PH skupinu PIP-3 te biva fosforilirana na Thr306 i Ser 473 poziciji od strane PDK-1. Tako aktivirana Akt/PKB dalje fosforilira različite proteine: FOXO (forkhead box O), WNT-1, GSK-3 (glikogen sintaza kinazu 3), TSC-2 (tuberoses complex 2), PRAS40 (prolin rich Akt supstrat 40kD) koji su uključeni u regulaciju stanične proliferacije, migracije i preživljenja. Međutim jedna od najvažnijih uloga Akt/PKB je sudjeluje u regulaciji staničnog metabolizma potičući ulazak glukoze u stanicu. Nakon što inzulin aktivira Akt/PKB dolazi do mobilizacije glukoza transporter 4 (Glut4) na staničnu membranu. Mehanizam kojim Akt/PKB potiče mobilizaciju Glut4 je još uvijek nejasan, ali se u zadnje vrijeme sve više istražuje. Pretpostavlja se da Akt/PKB fosforilira Rab GAP AS160 i tako inhibira nejgovu GAP aktivnost omogućavajući aktivaciju Rab GTP–aze i translokaciju Glut4 na površinu membrane. Za razliku od Glut4 regulacija Glut1 se nalazi na razini genske ekspresije. Istraživanja su pokazala da Akt preko TSC-2 i PRAS40 potiče ekspresiju gena za Glut1, te na taj način povećava njegovu ekspresiju na membrani.

Od svih proteina koje Akt fosforilira GSK-3 je posebno važan za ovo istraživanje. GSK-3 je višefunkcionalna serin/treonin kinaza koja se pojavljuje u dvije izoforme GSK-3α i GSK-3ß. Iako dva različita gena kodiraju ove dvije GSK-3 izoforme, one pokazuju veliku sličnost od 98% u kinaznom dijelu. Regulacija GSK-3 kinaze je vrlo složena. GSK-3 posjeduje bazalnu aktivnost koja je uvjetovana fosforilacijom na Tyr 216 za GSK-3ß ili Tyr 279 za GSK-3α. Kinaza koja vrši fosforilaciju na tim mjestima je nepoznata. Tako aktivirani GSK-3 ima 100-1000 puta veći afinitete za substrate koji su prethodno fosforilirani (pre-fosforilirani). Akt fosforilira GSK-3α na Ser21 ili GSK-3ß na Ser9 ostatku i tako inhibira njihovu aktivnost. Vrlo zanimljivo je da dovoljna količina pre-fosforiliranog supstrata može nadvaladati inhibiranost GSK-3 od starne Akt. Nasuprot Akt nalazi se protein fosfataza 2A (PP2A) koja direktno defosforilira GSK-3α/ß na Ser 21/9 ostatku te ih tako ponovo aktivira. Vezano uz hipotezu o značaju moždanog inzulina u patofiziologiji sAD, značajna je spoznaja da GSK-3α izoforma između ostalog sudjeluje u metabolizmu Aβ proteina, dok GSK-3β izoforma između ostalog regulira fosforilaciju tau proteina *(10-13)*. U normalnim uvjetima fosforilacija tau proteina je u homeostazi zahvaljujući antagonizmu kinaza i fosfataza. Međutim Tau protein se u sAD nalazi abnormalno fosforilirana na Ser202/Thr205 (AT8), Ser214/212 (AT100), Thr235 (TG3), Ser396/404 (PHF-1). Tako hiperfosforilirani tau protein (p-tau) ne može više vršiti svoju funkciju te dolazi do destabilizacije mikrotubula i stvarane neurofibrilnih snopića. Glavni enzim koji fosforilira tau protein je GSK-3ß uz pomoć Cdk5 kinaze koja prefosforilira tau protein čineći ga primamljivijim supstratom za GSK-3ß. Nasuprot ovim kinazama nalazi se PP2A koja vrši defosforilaciju p-tau, održavajući tako fosforilaciju/defosforilaciju tau proteina u homeostazi. Druga izoforma GSK-3 enzima je GSK-3α koja kada je fosforilirana sudjeluje u metabolizmu Aß tako što pogoduje nastajanju amiloidnih plakova. Mehanizam kojim ona sudjeluje u metaboliznu Aß nije točno poznat, ali kada se GSK-3 inhibira sa litijem dolazi do povećanog stvaranje Aß. Takvo povećanje Aß stvaranja povezano je s povećanom aktivnosti γ-sekretaze, pa se pretpostavlja da GSK-3α aktivira γ-sekretaze potičući pri tome amiloidni put razgradnje APP (12,13). Na drugoj strani vage nalati se inzulin razgrađujući enzim (IDE) koji razgrađuje Aß te je važan za održavanje homeostaze Aß metabolizma. IDE je zink metaloproteinaza koja osim Aß razgrađuje i sam inzulin. Inzulin aktivira IDE preko IP-3K/Akt puta dok Aß inaktivira IDE tako što tvori sa IDE ireverzibilni kompleks i kada ovaj nije aktivan.

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

*Regulacija inzulin/IR signalnog puta*

Međutim i sam IR/inzulinski sustav podliježe regulaciji i to na više načina. Opće prihvaćeni način je smanjenje IR u tkivu kao posljedica fiziološkog učinka samog inzulina. Vežući se na svoj receptor **inzulin** aktivira FOXO 1 transkripcijski faktor koji zatim utječe na smanjenje transkripcije IR (Puig O). Inzulin također, potiče internalizaciju IR kao i vlastitu razgradnju (Okabayashi Y). Razgradnja cijele molekule inzulina vrši se uz pomoć **IDE.** o čijoj regulaciji aktivnosti se zna malo(Hookang-H). Istraživanja su pokazala da sam inzulin utječe pozitivno na aktivaciju IDE, međutim i druge tvari utječu na IDE. Jedna od tih tvari je ATP koji može povećati aktivnos IDE za 300%, pa se pretpostavlja da bi kod manjka ATP doslo do pada aktivnosti IDE. S druge strane se nalaze tvari koje inhibiraji IDE najvjerojatnije tako sto potiču prelazak IDE u zatvorenu konformaciju, a to su slobodne masne kiseline, oksidativni stres i endogeni peptidni inhibitori (ubikvitin). Osim na količinu inzulina i IR može se utjecati na samu aktivnost IR. Da bi se aktivirala kinzna aktivnost IR on se prvo mora autofosforilirati. Na autofosforilaciju IR se može utjecati tako da se spriječiti sama autofosforilacija ili da se defosforilira već autofosforilirani IR. Direktni blokator autofosforilacije IR je **PC-1** *(Plasma cell membrane glycoprotein 1)*. Nađeno je da se PC-1 veže na dio IR od 485-599 aminokiseline, te tako sprečava komformacijsku promjenu ß-podjedinice nakon vezanja inzulina za IR. Bez komformacijske promjene ß-podjedinice ne dolazi do autofosforilacije te se time razvija inzulinska rezistencija (Youngren-Y) Defosforilaciju IR vrše protein **tirozin fosfataze (PTPs)** te tako dovode do inhibicije kinazne aktivnosti IR. PTP-1B je fosfatza koja se specifično veže uz defosforilaciju IR. Da bi se PTP-1B vezao uz IR potrebna je fosforilacija tirozinskih ostataka 1146, 1150, 1151 ß-podjedinice IR (Byon-B). Nakon vezanja PTP-1B za prethodno fosforilirani IR dolazi do defosforilacije kinaznog dijela ß-podjedinice IR što dovodi do inaktivacije IR (Y,B). Osim tirozin fosfataza i **serin/treonin kinaze** utiječ na inzulin/IR signalni put. Protein kinaza C (PKC) fosforilira veći broj serinskih i treoninskih ostataka na IR te tako inhibira njegovu kinaznu aktivnost. Osim PCK inzulinsku rezistenciju mogu izazvati TNF-α *(tumor necrosisi factor α)* fosforilacijom IRS-1 na serinskom ostatku 307 i IL-6 koji fosforilira IRS-1 na serinskom ostatku 318. Tako fosforilirani IRS-1 se ne može vezati na IR te dolazi do smanjene aktivacije inzulin/IR signalnog puta(Y).GSK-3 je konstitutivno aktivna serin/treonin kinaza kojafosforilira IRS-1 na serinskim ostacima te inhibira njegovo vezanje za IR i posljedično desenzitizaciju IR. (finkelman): Oksidacijski stes dovodi do stvaranja **H2O2**radikala koji mogu dovesti do inzulinske rezistencije. Istraživanja su pokazala da povećane količina H2O2 dovode do smanjenja fosforilacije IR kao i IRS-1 supstrata. Također je nađeno da H2O2 potiče aktivaciju PCK te i na taj način pogoduje razvoju inzulinske rezistencije. Na povećano stvaranje H2O2 utječe TNF-α te tako na indirektan način dovodi do inhibicije IR/inzulin kaskade. Toksična razina glukoze dovodi do **O-glikolizacija** IR što uzrokuje smanjeno vezanje IRS-1 za IR i time desenzitizacije IR.Također veliki utjecaj na funkciju IR imaju **glukokortikoidi** (GC). Istraživanja su pokazala da GC djeluje na dvije razine, s jedne strane mjenja sintezu IR (Grunfeld, Rouiller), dok s druge strane mjenja strukturu IR dovoreći do inhibicije autofosforilacije tirozinskog dijela i time desenzitizacije IR-a (Giorgino). Uz glukokortikoide i **kateholamini** dovode do desenzitizacije IR-a, tako što aktiviraju cAMP kinazu koja zatim fosforilira serin/treoninski dio receptora (Haring).

Slijedeća skupina su proteini koji se vežu na već aktivirani IR. U tu skupinu spadaju faktori rsta vezani uz receptore **(Grb-family)** icitokinski supresori **(SOCS)**. Grb14 dovodi do smanjenjog vezanja IRS-1 za IR jer smanjuje fosforiliranost tirozinskog 972 ostatkat(Y). Slijedeći iz te skupine koji se putem SH skupine također veže za aktivirani IR je Grb10. Grb10, kao i Grb14, dovodi do smanjenog vezanja supstrata za aktivirani IR i time do smanjene aktivnosti inzulina. SOCS-1 se veže na fosforilirani C-terminalni dio IR, a SOCS-3 na fosforilirani tirozinski 972 ostatak tako da oba proteina dovode do smanjenja fosforilacije IRS-1 (Y).

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 4.*** *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 inzulin receptor substrata) do aktivacije **PI-3K** (fosfatidil-inozitol-3 kinaze) i **MAPK** (mitogen associated protein - MAP) signalne kaskade. PI-3K aktivira fosforilacijom **Akt/PKB** (protein kinazu B). Zatim aktivirana Akt/PKB fosforilira **GSK-3** (glikogen sintaza kinazu 3) i time ga inaktivira. Ostale nefosforilirane aktivne izoforme **GSK-3α i GSK-3β** sudjeluje u metabolizmu Aβ proteina i regulaciji fosforilacije tau proteina.

***1.3.4. Fiziološki učinci inzulina/IR u mozgu***

Pokazalo se da inzulin u mozgu ima višestruku ulogu, osim što igra glavnu ulogu u regulaciji energetske homeostaze ima značajnu ulogu u regulaciji kognitivnih funkcija, učenja i pamćenja *(8,Zhao 2004).*

Glukoza kao glavni izvor energije u mozgu prolazi krvomoždanu barijeru uz pomoć inzulin neovisnog GLUT-1 nosača, koji se nalazi na endotelnim stanicama krvo-moždane barijere. Nadalje u većinu neurona glukoza ulazi preko također inzulin neovisnog GLUT-3 nosača (Duelli R). Međutim brze promjene u metabolizmu glukoze odvijaju se preko inzulin ovisnog GLUT-4 nosača. Vrlo značajno je to da ekspresija gena za GLUT-4 nosač nađena u hipotalamusu, korteksu i hipokampusu te pokazuje sličnu distribuciju kao i ekspresija gena za inzulin i IR. Istraživnja su pokazala da kod povećane potrebe za glukozom, što se događa kod procesa učenja i pamćenja, inzulin potiče premještaj GLUT-4 nosača na membranu neurona hipokampusa (Vannuci). GLUT-8 je novije otkriven inzulinski ovisan nosač koji se nalazi u tijelu i proksimalnim dendritima neurona hipokampusa, te se smatra da je on također važan za metabolizam glukoze kod povećane potrebe za energijom. U bazalnim uvjetima nosač je smješten u citoplazmi i endoplazmatskom retikulumu neurona, a kod povećane energetske potrebe neurona inzulin potiče njegov premještaj na endoplazmatsku retikulum (McEwen). S druge strane inzulin ovisan GLUT-2 nosač je najvažniji nosač za metabolizam glukoze na periferiji, dok je u mozgu slabo istražen. Imunohistokemijska istraživanja su pokazala da se GLUT-2 nosač nalazi u hipokampusu, temporalnom i peririnealnom korteksu, amigdali, talamusu i jako malo u hipotalamusu. GLUT-2 nosač se nalazi u neuronima i glija stanicama sa najačom gustoćom u području sinapsi što upućuje na njegovu važnost prilikom otpuštanja neurotransmitera. Pretpostavlja se da je GLUT-2 nosač uključen u regulaciju metabolizma glukoze i lučenja inzulina u mozgu, slično kao i na periferici u β stanicama, jer je njegova ekspresija nađena na tzv. neuronima osjetljivim na glukozu. Neuroni osjetljivi na glukozu su fenotipski slični β stanicama pankreasa te na površini uz GLUT-2 nosač imaju receptore za sulfonilureju, ATP osjetljivi kalijev kanal i glukokinazu. U prilog ovoj pretpostavci ide otkriće da je otpuštanje inzulina iz sinaptosoma potaknuto glukozom (Penicaud, santos). Inzulin/IR signalni put preko aktivacije IP-3K/Akt signalnog puta potiče metabolizam glukoze. Metabolizam glukoze je vrlo važan jer preko heksozamin metaboličkog puta glukoze dolazi do nastajnja UDP-N-acetilglukozamina (UDP-GlcNAc). UDP-GlcNAc dalje služi kao supstrat za enzim N-acetilglukozaminil transferaze (OGT) u procesu O-glikolizacije 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. O-glikozilaciju proteina se vrši na serin/treonin ostacima proteina te se na taj način natječe sa procesom fosforilacije proteina (Gong). Smanjen ulazak glukoze u stanicu zbog inzulinske rezistencije, te posljedično smanjenog metabolizma glukoze dovodi do smanjenja O-glikolizacije proteina čime se otvara mjesto za povećanu fosforilaciju proteina. 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. (223). Osim što je važan za sintezu acetilkolina Acetil-CoA ulazi u ciklus limunske kiseline pri čemu nastaje energetski najbogatiji metabolit glukoze adenozin trifosfat (ATP). ATP je izvor energije u nizu staničnih procesa kao što je transpor i razgradnja proteina (135) kao i metabolizmu APP i tau proteina (129,241). 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. 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 dovodi do degeneracije i smrti neurona(Evans,Yeves).

Već sama lokalizacija inzulina u korteksu i hipokampusu upućuje na njegovu važnost u regulaciji kognitivnih funkcija. To je i potvđeno in vivo istraživanjem gdje je interhipokampalna mikroinjekcija inzulina dovela do poboljšanja kognitivnih funkcija (Moosavi). Iako točan mehanizam kojim inzulin utječe na kognitivne funkcije nije poznat, u literaturi se navodi nekoliko mogućih mehanizama. Jedan se temelji na utjecaju inzulina na metabolizam glukoze, a drugi su vezani na utjecaj inzulina na neurotransmisiju. Obzirom da u hipokampusu postoji kolokalizacija inzulina, IR i inzulin 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. (Aplet, reagan) S druge strane novija istraživanja upućuju na važnost inzulina u modulaciji sinaptičke plastičnosti prilikom učenja i pamćenja djelujući na NMDA i AMPA glutamatne receptore (Zhao).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 memebrani te tako što povećava fosforiliranost NR2A i 2B podjedinice NMDA receptora (Skeberides,Christie). Oba mehanizma na kraju dovode do pjačane aktivnosti NMDA receptora što uzrokuje pojačani utok Ca2+ iona potičući nastanak LTP-a (Skeberdies SV 2001, Zhao). Inzulin također uječe i na ekspresiju AMPA receptore na staničnoj memebrani. Uz izravno djelovanje na same glutamatne receptore, inzulin preko inizitol-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.) (Montagnani M, Doreulee N). Sve ovo upućuju da je normalna IR/inzulin signalizacija važna za normalno odvijanje procesa učenja i pamćenja.



***Slika 5****. 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 Mg2+ iona iz kanala **NMDA** (N-methyl D-aspartate) **-**receptora, tako otvoreni kanali NMDA-receptora na kojima je vezan glutamat sada propuštaju Ca2+ ione. **NO** (dušikov oksid) ima ulogu retrogradnog glasnika koji u presinaptičkom aksonu potiče egzocitozu glutamata, a njegovu sintezu u postsinaptičkom neuronu potiče Ca2+ kalmodulin kompleks. Inzulin vežući se na **IR** (inzulinski receptor) u hipokampusu potiče aktivnost glutamatnih NMDA receptora te tako pojačava utok Ca2+ 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 oboljelih od Alzheimerove bolesti***

Sve veći broj studija povezuje hipoenergozu i poremećaj inzulina/IR u mozgu sa razvojem demencije u oboljelih od sAD (Craft, Razay, Hoyer). 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 (Craft 2006). Dosadašnjim istraživanjima na postmortalnom moždanom tkivu bolesnika oboljelih od sAD (Braka stadij V-VI) nađena je smanjenjena ekspresija mRNA inzulina i mRNA IR u hipokampusu (HPC) i hipotalamusu (HPT). U frontalnom korteksu (FC) je nađeno smanjenje ekspresija mRNA inzulina i mRNA IR koje je progrediralo sa napredovanjem bolesti, pa je u Braka stadiju VI nađeno 80% smanjenje mRNA IR i 85% smanjenje mRNA inzulina *(15, Rivera).* Također je nađena smanjenja tirozin kinazna aktivnosti inzulinskog receptora u FC, HPT i HPC i smanjeno specifično vezanje inzulina za IR u FC *(5,14,15)*. U cerebrospinalnom likvoru nađena je smanjena koncentracija inzulina praćena sa smanjenim odnosom koncentracije inzulina u cerebrospinalnom likvoru/koncentracija u plazmi, što je najvejrojatnije povezano sa smanjenim ulazom inzulina u mozak kroz krvo-moždanu barijeru (14). S druge strane imunohistokemijski je nađeno da je gustoća IR u hipokampusu oboljelih od sAD povećana, što uz smanjenu tirozin-kinaznu aktivnost IR upućuje na razvoj inzulinske rezistencije (Frolich, Hoyer). Nemogućnost inzulina da aktivira inzulinski signalni putu kod oboljelih od sAD-a najvjerojatnije je povezano sa promjenama koncentracije korizola i noradrenalina/adrenalin (Slika 5). Bazalna koncentracija kortizola nađena je povećana u plazmi i cerebrospinalnom likvoru (CSF) bolesnika sa sAD (Bellanoff, Swaab) Takvo povećanje je najvjerojatnije posljedica hipereaktivnosti HPA-osovine nađene kod oboljelih od sAD (Swannick).. Također je nađeno u CSF-u bolesnika sa sAD povećanje koncentracije noradrenalina/adrenalina, koje je raslo s napredovanjem bolesti (Peskind). Kao što je ranije opisano kortizol i noradrenalin dovode do promjene fosforilacije IR sa posljedičnom desenzitizacijom. U sADje nađena promjen na postreceptornoj razini u obliku smanjene ekspresija mRNA IRS-1 u FC, HPC, HPT, dok je ekspresija mRNA IRS-2 nađena smanjena samo u HPC (15, Rivera) Fosforilirani IRS-I prenosi signal vežući na sebe molekle bogate SH2-skupinom kao što je IP3-K. Imunopercipitacija u kombinaciji sa Western blot analizom pokazala je smanjenje kompleksa p85 podjedinice PI3-K i smanjenje IRS u HPC i HPT oboljelih od sAD, što indirektno pokazuje smanjenju aktivaciju PI3-K/Akt puta *(15)*. Slijedeći enzim u PI-3K signalnom putu je Akt/PKB. Western blott metoda pokazala je nepromijenjeni totalni Akt/PKB, ali sniženi fosforilirani oblik na tirozinskom ostatku 308 u HPC i HPT, što upućuje na smanjenu aktivnost Akt/PKB enzima *(10,15)*. Za očekivati je, stoga smanjenu fosforilaciju GSK-3, odnosno smanjenje omjera fosforiliranog/nefosforiliranog oblika u korist aktivnog (nefosforiliranog) oblika GSK-3. Sukladno tome nađen je nepromijenjeni toltalni GSK-3β i smanjena fosforilacija GSK-3β, odnosno povećana aktivnost GSK-3β u istim regijama mozga *(16,17)*. Povećanjem aktivnosti GSK-3β dolazi do narušavanja ravnoteže između fosforiliranog i nefosforiliranog tau proteina u korist fosforiliranog oblika, te stvaranja neurofibrilnih snopića (Slika 5) *(13,18).* 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 promjena u sAD regionalno specifične (Rickle) Na regulaciju fosforilacijskog stanja tau proteina suprotno učinku GSK-3β (i nekih drugih kinaza) djeluju drugi enzimi među kojima i protein fosfataza 2 (PP2A) koja defosforilira tau protein *(19)*. Imunobloting analizom nadena je smanjena količina PP2A kao i smanjenje u aktivnosti tog enzima u frontalnom i temporalnom korteksu bolesnika sa sAD *(20-22)*. Ravnoteža između aktivnost GSK-3 i PP2A igra ključnu ulogu u održavanju normalne razine fosforiliranog tau proteina. Dok s druge strane povećanje aktivnosti GSK-3α dovodi do neravnoteže u nastajanju i razgradnji Aβ peptida *(12).* Razgradnjom APP proteina s α-sekretazom ili β-sekretazom dolazi do nastanka za membranu vezanih C-terminalnih fragmenata C83 i C99 koje dalje razgrađuje γ-sekretaza pri čemu nastaje Aβ (Slika 1) *(1)*. U održavanju ravnoteže nastajanja i razgradnje Aβ važnu ulogu igra enzim koji razgrađuje inzulin (*insulin degrading enzyme -* IDE). IDE, osim inzulin, razgrađuje i nastali Aβ, a njegova je aktivnost regulirana IR-PI-3K signalnim putem *(3,23)*. Snižena razina IDE proteina kao i smanjena ekspresija IDE mRNA nađena je u hipokampusu bolesnika oboljelih od sAD *(23, Cook).* Također je za regulaciju nastanka Aβ važna i sama količina APP proteina, tako je u HPC, HPT i FC oboljelih od sAD nađena povećana ekspresija APP mRNA *(15).*

Osim samog inzulina, ekspresija mRNA IGF-I i receptora za IGF-I je također nađena smanjena u mozgu oboljelih od sAD *(15, Rivera)*.

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

****

***Slika 5.*** *Promjene inzulinske signalizacije u sporadičnj Alzheimerovoj bolesti.* Smanjenje sadržaja inzulina kao i smanjenje aktivnosti **IR** (inzulinskog receptora)nađena je postmortalno u bolesnika oboljelih od **sAD** (sporadfične Alzheimerove bolesti). **PI-3**K (fosfatidil inizitol -3-kinaza) je također nađena u smanjenim količinama Slijedeći enzim je Akt/PKB čiji je fosforilirani oblik također nađen smanjen. Za očekivati je, stoga smanjenu fosforilaciju GSK-3, odnosno smanjenje 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. Metabolizam glukoze je također nađen smanjen kod bolesnika oboljelih od sAD.Smanjena aktivnost IR kod oboljelih od sAD-a najvjerojatnije je povezano sa povećanim koncentracije korizola i noradrenalina/adrenalin, te defosforilacije IR tj. inaktivaciju, uz pomoć fosfotirozin fosfataza.

**1.4. EKSPERIMENTALNI MODELI ALZHEIMEROVE BOLESTI: STZ-ICV ŠTAKORSKI MODEL**

***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 *(24)*. Ove eksperimentalne modele možemo podjeliti 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 Aβ plakove u hipokampusu *(25,* Duyckaerts*).* Zanimljivo je napomenuti da su kod ovog modela te kod kombinacije ovog modela i mutacije gena za PS1 (A246E) nađene bihevioralne promjene prije formiranja plakova, što ukazuje na to da promjene u Aß metabolizmu nisu uzrok kognitivnih deficita. (Holcomb). Kako je ovdje primarni substrat Aβ patologija, ovaj model nije prikladan za ispitivanje inzulinske hipoteze etiopatogeneze sAD.

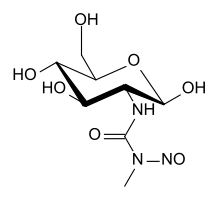
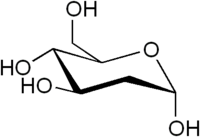
***1.4.2 STZ-icv experimentalni model sAD***

Prema novijim literaturnim podacima sAD je prepoznata kao posebno stanje tzv. “inzulinske rezistencije u mozgu”*(26).* Sukladno tome, štakori kojima se u lateralne moždane komore (intracerebroventrikularno–icv) injicira betacitotoksična tvar streptozotocin (STZ) čine se prikladnijim eksperimentalnim modelom za sAD od modela temeljenih na genetskim mutacijama *(4,27)*.

*1.4.2.1. Kemijska građa*

STZ (2-deoksi-2-(3-(metil-3-nitrozoureid)-D-glukopiranoza) je derivat nitrozoureje koji je prvobitno izoliran iz *Streptomices achromogenes.* Danas se može sintetizirati na tri različita načina: 1) iz tetra-*O*-acetil glukozaminhidroklorida, 2) iz D-glukozamina + N-nitrozometil karbamil-azida, 3)D-glukozamina + N-metilureje. Molekularna struktura odgovara 2-deoksi-D-glukoznoj molekuli koja na C2 mjestu ima vezanu *N*-metil-*N*-nitrozurejnu grupu (Slika 6).

STZ se svrstava u grupu alkilirajućih antitumorskih lijekova i građi je sličan karcinogenoj skupini nitrozamina. Nitrozamini se dodaju hrani da bi ostala što duže sviježa,da bi zadržala privlačnu boje ili za poboljšanje okusa (de laMonte, Bolzan).



**2-deoksi-D-glukoza streptozotocin**

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

*1.4.2.2. Mehanizam djelovanja streptozotocina*

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 *(28*). Obzirom da je molekularna građa STZ slična glukozi, STZ na periferiji ulazi u stanice preko GLUT-2 nosača za glukozu, čija je rasprostranjenost ograničena. STZ je tvar selektivno toksična za stanice koje ekspremiraju GLUT-2 nosače na membrani, a GLUT-2 nosači za glukozu se najviše nalaze na ß-stanicama *(28)*. Studije na kulturi ß-stanica su pokazale da STZ ovisno o dozi također dovodi do smanjena ekspresije GLUT-2 proteina *(31).* S druge strane u malim dozama STZ je također toksičan za IR. U mozgu je također nađena ekspresija nosača za glukozu GLUT-2 koja pokazuje regionalno specifičnu distribuciju (Brant). Tako da bi STZ promjene nađene u mozgu mogle biti posljedica njegovog ulaska u ciljne stanice preko GLUT-2 glukoznog nosača. Neuronalna lokalizacija GLUT-2 slična je lokalizaciji glukokinaze. Glukokinaza i GLUT-2 nalaze se u ß-stanicama i sudjeluju u metabolizmu glukoze djelujući kao senzori za glukozu pa se pretpostavlja da im je uloga slična i u SŽS. Obzirom da se neuronalna lokalizacija GLUT-2 ne podudara uvijek sa lokalizacijom glukokinaze te da se GLUT-2 nalazi na sinapsama, pretpostavlja se da GLUT-2 igra ulogu i u otpuštanju neurotransmitora (A). Ulaskom u stanicu STZ dovodi do izravnog oštećenja DNK alkilacijom što posljedično dovodi do aktivacije poli-ADP-ribozilacije i smanjenja ATP i NAD+ (Delaney, Bolzan). 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 se metabolizmom STZ u stanici stvara NO i H2O2 koji pridonose oksidativnom stresu te daljnem smanjenje ATP i NAD+ u stanici (Slika 7) *(28)*. Smanjenje ATP i povećanje oksidativnog stresa nađeno je u mozgu nakon STZ-icv primjene, što dodatno upućuje na sličnosti perifernog i centralnog mehanizma djelovanja STZ. No točan mehanizam djelovanja STZ u mozgu tek treba razjasniti.

*1.4.2.3. Načini primjene STZ u eksperimentalnim modelima*

Intraperitonealna primjena visokih STZ doza dovodi do uništenja ß-stanica pankreasa pri čemu se razvija eksperimentalna šećerna bolest, tipa I u štakora (Slika 8) *(28)*. S druge strane primjena manje intraperitonealne doze STZ dolazi do razvoja eksperimentalne šećerne bolest tipa II (Slika 8) *(28)*. Kod primjene manje doze ne dolazi do uništenja ß-stanica pankreasa, već do razvoja eksperimentalne inzulinske rezistencije (Blondel) tako što se smanjuje autofosforiliranost IR (Kadowaki)

Obzirom na postojanje inzulina i IR u mozgu, došlo je do razvoja eksperimentalnog modela kod kojeg se STZ primjenjuje icv u dozi do 100 puta manjoj od one pri perifernoj primjeni da bi se izazvala inzulinska rezistencija u mozgu. Pri takvom tretmanu ne dolazi do nastanka dijabetesa, ali dolazi do deficita u kognitivnim funkcijama, posebno učenju i pamćenju *(27,30)*. Doze koje se primjenjuju icv se kreću od 1-3 mg/kg, a daju se 1-3 puta u oba lateralna ventrikula ili samo u jedan.

*1.4.2.2.Promjene nađene u STZ-icv modelu*

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 jednom vremenskom odsječku.

*Kognitivne promjene*

Od samog početka intracerebroventrikularne primjene STZ, prije kojih 20 godina, štakori tretirani STZ-icv pokazuju konstanti kognitivni deficit, učenja i pamćenja. U lteraturi prvi simptomi kognitivnog deficita nađeni su 2 tjedna poslije STZ-icv tretmana. Kognitivni deficit se pokazao progresivnim i zabilježen je u literaturi njakasnije 12 tjedana nakon STZ-icv tretmana *(27,32).* Nađen je i kod štakora koji su bili stari 3mj kao i kod štakora starih 1-2 godine u vrijeme tretmana, što pokazuje da dob štakora ne utječe na ovaj deficit. Također je kognitivni deficit nađen kod štakora tretiranih jednokratno sa 1-3mg/kg kao i kod štakoga tretiranih više puta sa 1mg/kg STZ-icv. *(27,32, Gruenblat,Mayer).* Neki istraživači međutim navode da su kognitivne promjene ovisne o dozi, tako da veća doza dovodi do većeg kognitivnog deficita i obrnuto (Blokland, G, Prickaerts) Iako mehanizam kojimSTZ dovodi do kognitivnog oštećenja nije u potpunosti jasan može se pretpostaviti da tome pridonose morfološke i biokemijske promjene nađene u STZ-icv modelu.

*Morfološke promjene*

U mozgu štakora tretiranih sa STZ-icv nađene su morfološke promjene već 1 tjedan nakon STZ tretmana što je ranije od kognitivnih promjena (Shoham). Astroglioza se javlja kada dolazi do jakog oštećenja neurona. Marker astroglioze GFAP *(glial fibrillary acidic protein)* je nađen povećan u homgenatima kao i parafinskim rezovima mozga. Imunohistokemijsko bojanje GFAP je bilo povišeno u području oko ventrikula, septumu, forniksu, striatumu i hipokampusu što upućuje na oštećenje neurona u ovim regijama nakon STZ-icv tretmana. Osim astroglioze nađen je i gubitak neurona, povećanje volumene ventrikula. Međutim nakon 1 tjedna i doze od 3mg/kg nije nađen gubitak acetilkolinergičkih neurona.Na razini stanice nađeno je signifikantno povećanja Golgievog aparata u korteksu, koje izgledom ne odgovara promjenama Golgia u sAD što može biti posljedica direktnog štetnog djelovanja STZ. Na genetskoj razini nađena je smanjena ekspresija gena specifičnih za neurone i oligodendrocite. Dok je ekspresija gena za GFAP i proteina specifičnih za mikrogliju u mozgu mladunčadi štakora nako STZ intrakortikalno (ic) tretmana nađena povišena. Astroglioza, gubitak neurona, povećanje ventrikula je također nađena i u mozgu oboljekih od sAD. Ove morfološke promjne bi mogle dijelom biti odgovorne za kognitivni deficit u STZ-icv modelu.

*Biokemijske peomjene*

U STZ-icv modelu štakora također je, slično kao u ljudi oboljelih od sAD, nađeno smanjenje **metabolizma glukoze.** Istraživanja o metabolizmu glukoze rađena su 3 tjedna nakon STZ-icv tretmana pri čemu je nađeno povećanje glukoze, ADP i glikogena u korteksu (Nitsch) koje je bilo praćeno smanjenjem iskorištavanja glukoze (Pathan). Slijede istraživanja 6 tjedana poslije STZ-icv tretmana koja i dalje pokazuju da smnjenje iskorištavanja glukoze i dalje postoji posebno u frontalnom, parientalnom, senzorno-motornom, auditornom i entorinalnom korteksu. Uz sve to nađeno je u korteksu i hipokampusu izrazito smanjenom aktivnosti enzima koji sudjeluju u procesu glikolize 3 i 6 tjedana nakon STZ-icv tretmana *(4,33,34)*. Navedene promjene, slično kao kod periferne primjene STZ, dovode do smanjenja koncentracije ATP-a i kreatin fosfata u mozgu *(27)*. Važno je napomenuti da inzulin u mozgu sudjeluje u regulaciji metabolizma glukoze te da nađene promjene nakon STZ-icv tretmana upućuju na razvoj inzulinske rezistencije u mozgu *(8)*. U STZ-icv tretitanih štakora također su nađene promjene u **kolinergičkoj signalizaciji**. Najranije promjene nađene su 1 tjedan nakon STZ-icv tretmana u obliku smanjenje aktivnosti kolin acetiltransferaze (ChAT) u hipokampusu koja je bila praćena značajnim povećanjem aktivnosti acetilkolinesteraze (AChE). Ponovno mjerenje aktivnosti ChAT i AchEnakon, 3 tjedna STZ-icv tretmana, pokazalo je da promjene i dalje postoje. Energetski deficit zbog promjene u metabolizmu glukoze te smanjenje aktivnosti ChAT i povećanje aktivnosti AChE mogle bi dovesti do poremećaja kognitivnih funkcija u STZ-icv tretiranih štakora *(27)*. Povećanje **Oksidativnog stresa** nađenoje u hipokampusu i korteksu štakora tretiranih sa STZ-icv. Kao pokazatelji oksidativnog stresa korišteni su koncentracije malonalaldehida (MDA) i glutationa. MDA nastaje lipidnom peroksidacijom i smatra se kao dobra pokazatelj stvaranje slobodnih radikala. Glutation je, s druge strane, antioksidans koji neutralizira slobodne radikale. Zanimljivo je da je kod STZ-icv modela nađeno sifnifikantno povećanje koncentracije MDA i sniženje glutationa. Povećanje oksidativnog stresa nađen je 1,7,21 dan nakon STZ-icv tertmana u dozi od 3mg/kg. Zatim je nađeno 3 tjedna nakon STZ-icv tretmana u dozi od 1.5mg/kg, te 1 i 8 tjedana nakon STZ-tretmana u jednokratnoj dozi od 3mg/kg.

*1.4.2.3. Promjene inzulinskog sustva u STZ-icv modelu*

Istraživanja inzulinske kaskade u eksperimentalnim modelima AD su rijetka, a posebno su rijetka ona u STZ-icv modelu. Naša nedavna preliminarna istraživanja pokazala su po prvi puta u STZ-icv tretiranih štakora promjene enzima u IR-PI-3K signalnom putu, smanjenu ekspresiju Akt/PKB i smanjeni omjer fosforiliranog/nefosforiliranog oblika GSK-3α/β u hipokampusu *(32).* Izraženost/prisutnost promjena bila je veća s dužim vremenom nakon STZ-icv tretmana (promatran je period do 3 mjeseca), što govori u prilog sličnost s progresivnim promjenama u ljudi sa sAD. Razina IR ß-podjedinice (IRß) je nađena snižena u frontoparietalnom korteksu i hipotalamusu, ali je fosforiliranost IRß bila povišena, a tirozin kinazna aktivnost nepromjenjena. Na razini gena nađena je smanjena ekspresija gena za inzulin (Ins1 i Ins2) te gena za IR u hipokampusu i frontoparietalnom korteksu nakon 3 mjeseca poslije STZ-icv tretmana. Nađene su također početne blage promjene povećane ekspresije ukupnog tau proteina u hipokampusu. Posebno je značajno, što su po prvi puta nakon 3 mjeseca poslije STZ-icv tretmana. nađene i strukturne promjene u smislu kongofilnih nakupina Aβ u stijenci meningealnih krvnih žila bez drugih vidljivih promjena. U skladu s tim nalazima, ubrzo zatim objavljeni su rezultati načelno sličnih neurokemijskih promjena IR-PI3-K signalnog puta u mozgu štakora koji su odmah po rođenju tretirani intrakortikalno sa STZ *(36).* Premda se ovaj model razlikuje od STZ-icv modela štakora u kojem se STZ primjenjuje odraslim štakorima starijim od 3 mjeseca, značajan je jer do sada nema drugih objavljenih radova o istraživanju IR signalnog puta u štakora kojima se STZ primjenjuje centralno. Postoji rad na kineskom koji govori o imunohistokemijskoj analizi tau i Aß proteina 3 tjedna nakon STZ-icv tretmana, međutim na engleskom je dostupan samo abstrakt, pa je teško objasniti dobivene rezultate.



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



***Slika 8.*** *Intraperitonealna (i.p.) primjena streptozotocina (STZ) dovodi ovisno o dozi do diabetesa mellitusa (DM) tipa I ili tipa II.* STZ je supstrat za glukozni **GLUT-2** nosač te je stoga toksičan za stanice koje na membrani eksprimiraju ovaj nosač. U malom dozama je toksičan za inzulin receptor **(IR).**

**2.0 HIPOTEZA I CILJEVI DOKTORATA**

STZ-icv model štakora predstavlja reprezentativni model eksperimentalne sAD za istraživanje inzulinskog sustava mozga kojim je moguće pokazati nastanak i razvoj te vremenski slijed promjena inzulina i IR-PI-3K signalnog puta 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 Aβ peptida.

**3.0 CILJEVI ISPITIVANJA**

1. Istražiti vremensku ovisnost promjena kognitivnih funkcija učenja i pamćenja u STZ-icv tretiranih štakora kao eksperimentalnog modela sAD
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-3α/β, GSK-3α/β, p-tau, tau), njihovu regionalnu rasprostranjenost, te ovisnost o vremenu proteklom nakon STZ-icv tretmana
3. Istražiti strukturne promjene u mozgu STZ-icv tretiranih štakora, poglavito one u svezi nakupljanja Aβ (Aβ 1-42), te njihovu ovisnost o vremu proteklom nakon STZ-icv tretmana

**4.0 MATERIJALI I METODE**

**4.1 Životinje**

Istraživanje se provelo na mužjacima štakora soja Wistar, starijim od 3 mjeseca, uzgojenim na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom cijelog istraživanja slijedile su se etičke smjernice Zakona o dobrobiti životinja (Narodne novine 19/1999). Za obavljanje pokusa na projektu MSZO, čija je ova disertacija dio, dobivena je dozvola etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (br...). Životinje su imale slobodan pristup vodi i hrani tijekom čitavog istraživanja. Za potrebe kirurških zahvata životinje su anestezirane kloralhidratom u dozi od 300mg/kg (i.p.). Životinje su žrtvovane u periodima od 1, 3 i 6 mjeseci nakon STZ-icv tretmana. Tako žrtvovanim životinjama je izvađen cijeli mozak koji se zatim dijeli na regije od interesa HPC, FC, PC i HPT.

**4.2 Ispitivana tvar-streptozotocin**

U pokusima je korišten STZ (Streptozotocin®, Fluka, Švicarska), sadržaj bočice je otopljen u 0,05 M citratnom puferu pH 4,5, kako bi se dobila odgovarajuća doza. STZ se primjenjivao icvu ukupnoj dozi od 3 mg/kg.

**CITRATNI PUFER**: 0.05 M citronske kiseline

0.05 M natrij citrata

otapalo H2O2,

pH 4,5

**4.2.1. Intracerebroventrikularna primjena streptozotocina**

U općoj anesteziji klorarhidratom 300 mg/kg napravi se rez kože i potkožnog tkiva prethodno ošišane glave štakora u medijalnoj liniji (1cm), te se električnom zubarskom 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 (*37)*. STZ se aplicira u lateralne moždane komore (icv) vrlo finim i tankim injekcionim iglama u volumenu do 2 μl. Nakon injiciranja rubovi kože spoje se kirurškim šavom. Kontrolna skupina je podvrgnuta istom tretmanu ali će dobiti samo otapalo.

**4.3 Korište kemikalije, reagensi i antitjela**

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

Za izradu **gela i pufera u postupcima elektroforeze i Western blotta,** te za izradu **pufera u postupku imunohistokemije,** korištene su sljedeće kemikalije: akrilamid (*Acrylamide*, Sigma, SAD), bisakrilamid (*Bis-N,N-methylen-bis-acrylamide*, Sigma, SAD), amonij persulfat (*Ammonium persulfate*, Sigma, SAD), TEMED (*TEMED*, Sigma, SAD), NaCl (Kemika, Hrvatska), EDTA (Kemika, Hrvatska), Tris (TRIZMA® base, Sigma, SAD), DTT (*DL-Dithiotheital*, Fulka, Švicarska), Natrij deoksikolat (*Natriumdeoxycholate,* AppliChem, Njemačka), Natrij vanadat (*Sodium metavanadate,* Aldrich, USA), NP-40 (*Nonidet™ P 40 Substitute*, Sigma, USA), inhibitori proteaza (*Protease Inhibitor Coctail*, Sigma, SAD), 2-merkaptoetanol (*2-Mercaptoäthanol*, MERCK-Schurchardt, Njemačka), bromfenol modrilo (*Bromphenol blue*, Sigma, SAD), glicerol (*Glycerol anhydrous*, Fluka, Švicarska) metanol (Kemika, Hrvatska), apsolutni etanol (Kemika, Hrvatska), boja Ponceau (*Ponceau solution*, Sigma-SAD); deterdženti: SDS (*Sodium dodecil sulphate*, Sigma, SAD), Tween 20 (Sigma, SAD) ; standard za određivanje molekulskih masa ([*MagicMark™ XP Western Protein Standard,*](http://products.invitrogen.com:80/ivgn/en/US/adirect/invitrogen?cmd=catProductDetail&showAddButton=true&productID=LC5602&_bcs_=H4sIAAAAAAAAAMXQz0vDMBQH8KP9MwrDHpzba%2BcOblJEJ4o45qCo59C8dYE0KclbR%2F97k63r0Ikn%0AwUt%2Bkffy%2BWaQBEuj%2BSYnG0ZhhqYWOdofz9ZE1RRgu90OhaoFGV2gGua6BCsIYWMBFax1iXCoHjDF%0AB4d6uKsqKXJGQis7XFMpg14vILPB4CwOkjiBydU4Ti6CmVaut7SXYUauATPcMVhZ3YRzxjmaTlK1%0Az3zjTK9jEHWhPOctA8aFwZzgeOk2L3n6%2FP60cJgHYSvJmhkjLLRpInf0gk26o3jfikn7FQiTceKZ%0ALiShUP%2BJ9JDfkG4ceeoHWkKjwnupKTxx%2F4n0qMyokRj5zW6VZkIVEudYozwN4HjR6zJdCemA0X7y%0ApQtWYtqy%2B57db9n9jt3eTl3O89HjLrWfx%2B1%2Bn7z7nE%2Bs6CUs6AIAAA%3D%3D&returnURL=http%3A%2F%2Fproducts.invitrogen.com%3A80%2Fivgn%2Fen%2FUS%2Fadirect%2Finvitrogen%3Fcmd%3DcatDisplayStyle%26catKey%3D94201%26OP%3Dfilter%26filter%3D101%252F93401%252F94101%252F94201*) Invitrogen, SAD). Korišteni su univerzalni razvijač (FR-16) i brzi fiksir (FF-2) (Fotokemika, Hrvatska).

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

Korišteni su sljedeći **reagensi (kitovi)**: u metodi **Western blotta:** za **kemiluminescentnu detekciju proteina** *Lumi-LightPLUSWestern Blotting substrate* (Roche Diagnostics, Njemačka); u **imunohistokemiji:** za **otkrivanje antigena** korištena je 10% mravlja kiselina (*Formic acid*, 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 blott** 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 Antiboby 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* (Sigma, USA). 7. *Anti–tau Antibody* (DAKO, USA). Kao **kontrola za lodiranje** korištena su slijedeća primarna antitjela: 1.*Monoclonal Anti- β-Actin Clone AC-15* (Sigma, USA)**,** 2. *Polyclonal Antibody to GAPDH*(Imogenex, USA). **Sekundarna:** [*Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody*](http://www.cellsignal.com/products/7076.html) *and* [*Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody*](http://www.cellsignal.com/products/7074.html)(Cell Signaling Technology, Incorporated)

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

**4.4 Biokemijske metode**

Za **Western blott** metodu jedan, tri i šest mjeseci nakon dvokratnog icv injicirana STZ u dozi od 1.5mg/kg životinje su žrtvovane cervikalnom dislokacijom, te su im odstranjene različite regije mozga (hipokampus, korteks i hipotalamus). Kontrolne uzorke činili su isti djelovi mozgova životinja tretiranih icv citratnim puferom. Tako izvađeni mozgovi brzo su smrznuti u tekućem dušiku i pohranjeni na -80oC do homogeniziranja u Lysis puferu s dodatkom inhibitora proteaza.

Za **imunohistokemiju** dio je životinja jedan, tri i šest mjeseci nakon dvokratnog icv injicirana STZ u dozi od 1.5mg/kg anestezirano klorahidratom i perfundirano fiziološkom otopinom nakon čega je slijedilo perfundiranje puferiranim formalinom, te su im izvađeni mozgovi. Perfundirani mozgovi su zatim stavljeni u puferiranu otopinu formalina, uklapani u parafinske kocke, te naknadno podvrgnuti postupku imunodetekcije amyloid beta 1-42 i kongo red bojanju.

***4.4.1.SDS-PAGE elektroforeza i Western blot.***

1. Homogeniziranje različitih regija mozga u Lysis puferu s dodatkom inhibitora proteaza.
2. Priprema odgovarajuće postotnog donjeg i gornjeg SDS-PAGE (*engl*. **S**odim **D**odecyl **S**ulphate-**P**oly**A**crylamide **G**el **E**lectrophoresis) gela
3. Jednake količine proteina se nanose 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:  I. *Mouse Anti-Insulin receptor (β-subunit) Monoclonal Antibody*  II. *Monoclonal Mouse (monoclonal) Anti-GSK-3α/β Antiboby Unconjugated*  III. *Phospho-GSK-3α (Ser21) Antibody*  IV. *Phospho-GSK-3 β (Ser9) Antibody*  V. *Akt Antibody*  VI. *Anti–tau Antibody*  VII*. Anti-phospho-tau*  VIII. *Monoclonal Anti- β-Actin Clone AC-15*  IX. *Polyclonal Antibody to GAPDH* | Razrjeđenja antitijela u puferu za blokiranje:  1:500  1:1000  1:1000  1:1000  1:1000  1:10 000  1:200  1:10 000  1:2500 | 2 sata sobna  Temperatura  Preko noći  na +4oC | |
| 8. Ispiranje membrana | LSWB | 3x5' | |
| 9. Inkubacija u odgovarajućem  sekundarnom antitijelu  *I.* [*Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody*](http://www.cellsignal.com/products/7076.html)  *II.* [*Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody*](http://www.cellsignal.com/products/7074.html) | Razrjeđenje antitijela u puferu za blokiranj:  1:2000  1:5000 | 60' | |
| 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 razdvoje putujući kroz gel prenose se Western blot metodom na nitroceluloznu membranu *(32).* 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-3α/β, GSK-3α/β, tau, p-tau preko noći na 4ºC ili 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja membrane se inkubiraju na sobnoj temperaturi sa sekundarnim protutijelom, te se ponovo ispiru. Dobiveni signal vizualizira se pomoću kemiluminiscentnog Western blot detekcijskog kita i bilježi video kamerom ili ekspozicijom na filmu.

**LYSIS BUFFER**:

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 (SEPARATING)**:

Tris Cl/SDS pH 8,8

30 % acrilamid/0,8% bisakrilamid

10 % amonij-persulfat

TEMED (**TE**tra**M**ethyl**E**thylene**D**iamine)

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

***4.4.2. Imunohistokemija***

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

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **KORAK** | **KEMIKALIJE:** | | **VRIJEME:** |
| 1. Deparafinizacija  2.Otkrivanje antigena  3.Ispiranje | Xsilol  100% etanol  96% etanol  70% etanol  Destilirana voda  Mravlja kiselina  dH2O2 | | 2x10'  2x5'  2x5'  2x5'  2x10'  1 sat  2x10' |
| 4. Inhibicija endogene peroksidaze | 3%H2O2/dH2O2 | | 20' |
| 5. Ispiranje puferom | Tris pufer (TBS – Tris Buffered Saline) | | 2x5' |
| 6. Blokiranje nespecifičnog vezanja | 10% koziji serum | | 20' |
| 7. Primarno antitijelo  *Anti-beta-Amyloid 42 Purified (SIGNET) Polyclonal Antibody* | Razrjeđenja antitijela:  1:2000 | | Preko noći na  +4oC |
| 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  14. Zaustavljanje reakcije | Romulin  dH2O2 | | 4-10' |
| 15. Kontrastno bojanje | Hemalaon eozin | | 1' |
| 16. Ispiranje  17. Dehidracija | Tekuća voda  70% etanol  96%etanol  100%etanol  Xsilol | | 10'  2x3'  2x3'  2x3'  do pokrivanja |
| 17. Pokrivanje uzoraka | |  | |

Serijski rezovi (8μm) se prvo deparafiniziraju kroz niz silaznih alkoholnih otopina (Xsilol, 100% alkohol, 95% alkohol,70% alkohol). Otkrivanje antigena provelo 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 protutitjela blokiraju 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 uzlazni niz alkohola (70%, 96%, 100%, Xsilol).

**TBS**

0,5 mM Tris baza

7,5 mM NaCl

pH 7,6

***4.4.3. Kongo red bojanje***

Dio serijskih rezova se nakon deparafiniziranja obojao s Kongo crvenilom za vizualiziranje amiloida putem zelene autofluorescencije u polariziranom svjetlu mikroskopa *(32).*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **KORAK** | **KEMIKALIJE:** | | **VRIJEME:** |
| 1. Deparafinizacija | Xsilol  100% etanol  96% etanol  70% etanol | | 2x10'  2x5'  2x5'  2x5' |
| 2. Ispitanje  3. Farbanje  4.Ispiranje  5.Razvijanje boje  6. Ispiranje | H2O2  Kongo red otopina  dH2O2  Alkoholna otopina  Tekuća voda | | 2x5'  20'  5'  Kratko 5-10 urona  1' |
| 15. Kontrastno bojanje | Hemalaon eozin | | 30'' |
| 16. Ispiranje  17. Dehidracija | Tekuća voda  70% etanol  95%etanol  100%etanol  Xsilol | | 2'  2x3'  2x3'  2x3'  2x3' |
| 17. Pokrivanje uzoraka | |  | |

Ovo modificirano kongo bojenje se koristi za detekciju amyloida na parafinskim rezovima. Serijski rezovi (8μm) se prvo deparafiniziraju kroz niz silaznih alkoholnih otopina, 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 uranjanjem u alkoholnu otopinu. Slijedeći korak je ispiranje u tekućoj vodi te kontrastno bojanje hemalaon-eozinom. Amiloidne nakpine će se ofarbati crveno te će se potvrditi detekcijom zelene autofluorescencije u polariziranom svjetlu mikroskopa, a jezgre će se ofarbati plavo

**0.5% KONGO RED OTOPINA:**

0.5 g Congo red

100 ml 50% Alkohol

**1% NATRIJ HIDROKSID**:

1 g Natrij hidroksd

100 ml Distilirane vode

**ALKOHOLNA OTOPINA:**

1ml 1% Natrij hidroksid

100 ml 50% alkohol

**4.5 Metode ispitivanja spoznajnih fukcija učenja i pamćenja**

Kognitivne funkcije testirane su pomoću dva test:1. Morris water maze (MWM) swimmin test

2. Passive avoidance task

***4.5.1. Morris water maze swimming test***

Kognitivnne funkcije učenja i pamćenja ispitivane su putem testa plivanja u Morrisovom labirintu (*Morris Water Maze Swimming Test*) koji se već 20 godina uspješno primjenjuje u svrhu kognitivnnog testiranja labaratorijskih štakora *(38, Hooge RD).* 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±1ºC. Bazen je pregradama nepotpuno podijeljen u četiri (I-IV) jednaka kvadranta. U kvadrantu IV nalzi se prozirna platforma, smještena 2 cm ispod razine vode. Životinje se četri dana uvježbavaju pronaći ovaj plato. Po nalasku platoa, životinji se dozvoljava boravak na platou u trajanju od 15 sekundi, nakon toga se životinja vraća u kavez. Ukoliko životinja ne uspije pronaći plato, traženje se prekida nakon 1 minute, ispitivač postavlja životinju na plato, ostavlja tamo 15 sekundi, te vraća u kavez. U toku jednog dana pokus se ponavlja tri puta, pri čemu se svaka životinja tri puta stavlja u bazen, s odmorom od 30 minuta između pokusa. Nakon četri dana uvježbavanja plato se ukloni, te se mjeri vrijeme (sekunde) koje životinje provedu tražeći plato u odgovarajućem odjeljku, kao i broj ulazaka u «pogrešne» odjeljke u kojima se nije nalazio plato.

Pokus se temelji na pretpostavci da će kontrolni štakori, koji nemaju poremećaje u učenju i pamćenju provesti duže vrijeme u potrazi za platformom u usporedbi sa štakorima kojima je učenje i pamćenje oštećeno, te će pri tome također napravi manji broj pogrešaka tj. Imat će manji broj ulazaka u «pogrešne» odjeljke.

***4.5.2. Passive avoidance task***

Kognitive funkcije dodatno se testiraju još jednim od pasivnih testova izbjegavanja (*Passive avoidance task*) poput npr. “Step-through” testa kojim je u prethodnim istraživanjima STZ-icv modela u literaturi nađen kognitivni deficit *(38).* 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, oba su odjeljka iste veličine Test se provodi kroz tri dana i sastoji se od ***habituacije, prešok i postšok testiranja,*** a maksimalno vrijeme testiranja je 300 s. *Prvi dan* se štakori habituiraju na okolinu, tako da se stave u osvjetljeni odjeljak, pomična vrata su cijelo vrijeme otvorena i štakoru je dozvolje 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 na čin stavljaju u prvi osvjetljeni odjeljak , nakon latencije od 5 s se otvaraju pomična vrata koja ga dijele od tamnog odijeljka, kada štakor uđe u tamni odjeljak podvrgnut je blagom elektrošoku jačine 0.5 mA i u trajanju od 2s. Vrijeme potrebno da štakor uđe u tamni odjeljak predstavlja “pred-šok” latenciju. *Treći dan*, nakon 24 sata, postupak se ponavlja, samo što je 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 će drugi dan vrijeme potrebno da kontrolni štakor uđe u tamni odjeljak biti duže.

**4.6 Statistička obrada podataka**

Rezultati mjerenja gustoće zapisa proteina kamerom ili na filmu nakon Western bott analize (N= 6 životinja po grupi) i parametara mjerenih pri tetsu plivanja (vrijeme proteklo u traženju platoa i napravljeni broj grešaka pri traženju odgovorajućeg kvadranta) i passive avoidance tasku (post-šok latencija) statistički će se se obraditi primjerenim neparametrijskim (Kruskal-Wallis ANOVA test, Mann-Whitney U test) testovima za testiranje razlike među ispitivanim grupama, pri razini značajnosti p<0,05.

**7.0 LITERATURA**

1. Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer’s disease: seminar. Lancet 2006; 368: 387-403.
2. 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.
3. Gasparini L, Netzer WJ, Greengard P, Xu H. Does insulin dysfunction play a role in Alzheimer′s disease? TIPS 2002; 23: 288-293.
4. Hoyer S. Glucose metabolism and insulin receptor signal transduction in Alzheimer disease. Eur J Pharmacol 2004; 490: 115-125
5. Frölich L, Blum-Degan H-G, Engelsberger S, Humrich J, Laufer S, Muschner D, et al. Brain insulin and insulin receptors in aging and Alzheimer′s disease. J Neural Transm 1998; 105: 423-438.
6. Banks WA. The source of cerebral insulin. Eur J Pharmacol 2004; 490:5-12
7. 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
8. [Wozniak M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Search&itool=pubmed_AbstractPlus&term=%22Wozniak+M%22%5BAuthor%5D), [Rydzewski B](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Search&itool=pubmed_AbstractPlus&term=%22Rydzewski+B%22%5BAuthor%5D), [Baker SP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Search&itool=pubmed_AbstractPlus&term=%22Baker+SP%22%5BAuthor%5D), [Raizada MK](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Search&itool=pubmed_AbstractPlus&term=%22Raizada+MK%22%5BAuthor%5D). The cellular and physiological actions of insulin in the central nervous system. Neurochem Int 1993; 22: 1-10
9. Johanstone AM, Pirola L, Van Obberghen E. Molecular mechanisms of insulin receptor substrate protein-mediate modulation of insulin signaling. FEBS Letters 2003; 546: 32-36.
10. Pei J-J, Khatoon S, An W-L, Nordlinder M, Tanaka T, Braak H, et al. Role of protein kinase B in Alzheimer ′s neurofibrillary pathology. Acta Neuropathol 2003; 105: 381-392.
11. Kaytor MD, Orr HT. The GSK-3β signaling cascade and neurodegenerative disease. Neurobiol 2002; 12: 275-278.
12. Phiel CJ, Wilson CA, Lee VM-Y, Klein PS. GSK-3 regulates production of Alzheimer′s disease amyloid-β peptides. Nature2003; 432: 435-439.
13. Ishiguro K, Shiratsuchi A, Sato S, Omori A, Arioka M, Kobayashi S, Uchida T, Imahori K. 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.
14. 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.
15. Steen E, Terry MB, Riviera JE, Cannon LJ, Neely RT, Tavares R, Xu JX, Wandas RJ, de la Monte MS. 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.
16. Preece P, Virley DJ, Costandi M, Coombers R, Moss Sj, Mudge AW, Jazin E, Cairns NJ. Beta-secretase (BACE) and GSK-3 mRNA levels in Alzheimer′s disease. Mol Brain Res 2003; 116: 155-158.
17. Pei JJ, Tanaka T, Tung YC, Braak E, Iqbala K, Grundke-Iqbala I. Distrubtion , levels, and activity of glycogen synthase kinase 3 in the Alzheimer disease brain. J Neuropathol Exp Neurol 1997; 56: 70-78.
18. Grundke-Iqbala I, Iqbala K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder I. Abnormal phosphorylation of microtubule-associated protein tau in Alzheimer cytoskeleton pathology. Proc Natl Acad Sci USA 1986;83: 4913-4917.
19. Planel E, Yasutake K, Fujitas SC, Ishiguro K. Inhibition of protein phosphatase 2A overrides tau protein kinase I/Glycogen synthase kinase 3β and cyclin-dependent kinase 5 inhibition and results in tau hyperphosphorylation in the hippocampus of starved mous. J Bio Chem 2001; 276: 34298-34306.
20. Sontag E, Luangpirom A, Hladik C, QIHC HT (ASCP), Mudrak I, Ogris E, Speciale S, White CL. Altered expresion levels of protein phosphatase 2A ABαC enzyme are associated with Alzheimer disease pathology. J Neuroptahol Exp Neurol 2004; 63: 287-301.
21. Sontag E, Hladik C, QIHC HT (ASCP), Montgomery L, Luangpirom A, Mudrak I, Ogris E, White CL. Downregulation of protein phosphatase 2A carboxyl methylation and methyltransferase may contribute to Alzheimer disease pathogenesis. J Neuroptahol Exp Neurol 2004; 63:1080-1091.
22. Gong CX, Shaikh S, Wang JZ, Zaidi T, Grundke-Iqbala I, Iqbal K. Phosphatase activity toward abnormally phosphorilated tau: decrease in Alzheimer disease brain. J Neurochem 1995; 65. 732-738.
23. [Qiu WQ, Folstein MF.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=16399206&query_hl=1&itool=pubmed_DocSum) Insulin, insulin-degrading enzyme and amyloid-beta peptide in Alzheimer's disease: review and hypothesis.Neurobiol Aging. 2006; 27:190-198.
24. Yamada K, Nabeshima T. Animal models of Alzheimer′s disease and evaluation of anti-dementia drugs. Pharm Ther 2000; 88: 93-113.
25. [Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=8810256&query_hl=2&itool=pubmed_docsum) Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. Science 1996; 274:99-102.
26. Hoyer S (1998) Is sporadic Alzheimer disease the brain type of non-insulin dependent diabetes mellitus? A challenging hypothesis. J Neural Transm 105: 415-422
27. 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.
28. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cell of the rat pancreas. Physiol Res 2001; 50: 537-546.
29. Lacković Z, Šalković M. Streptozocin and alloxan produce alterations in rat rain monoamines independently of pancreatic beta cells destruction. Life Sci 1990; 46: 49-54.
30. Prickaerts J, Fahring T, Blokland A. Cognitive preformance 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.
31. 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 Jan;112(1):29-37.
32. 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: 1005-1015.
33. Duelli R, Schrock H, Kuschinsky W, Hoyer S. Intracerebroventricular injection of streptozotocin induces discrete local changes in cerebral glucos utilization in rats. Int J Dev Neurosci 1994; 12: 737-734.
34. 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: 477-483.
35. [Lester-Coll N](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Search&itool=pubmed_AbstractPlus&term=%22Lester%2DColl+N%22%5BAuthor%5D), [Rivera EJ](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Search&itool=pubmed_AbstractPlus&term=%22Rivera+EJ%22%5BAuthor%5D), [Soscia SJ](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Search&itool=pubmed_AbstractPlus&term=%22Soscia+SJ%22%5BAuthor%5D), [Doiron K](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Search&itool=pubmed_AbstractPlus&term=%22Doiron+K%22%5BAuthor%5D), [Wands JR](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Search&itool=pubmed_AbstractPlus&term=%22Wands+JR%22%5BAuthor%5D), [de la Monte SM](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Search&itool=pubmed_AbstractPlus&term=%22de+la+Monte+SM%22%5BAuthor%5D). Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: relevance to sporadic Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis 2006; 9:13-33.
36. 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, 281-291.
37. Anger WK. Animal test systems to study behavioral dysfunctions of neurodegenrative disorders. Neurotoxicology 1991; 12, 403-413.
38. Pathan AR, Viswanad B, Sonkusare SK, Ramarao P. Chronic administration of pioglitazone attenuates intracerebroventricular streptozotocin inducet memory-impairment in rats. Life Sci 2006; 79: 2209-2216.

Dickson, DW. Neuropathology of Alzheimers disease and other demetias. Cin. Geriatr. Med., 2001, 17, 209-228.

O. J. K. Belanoff, K. Gross, A. Yager and A.F. Schatzberg. Corticosteroids and cognition. J Psychiatric Res 35 (2001) 127-145.

100. C.X. Gong, F. Liu, I. Grundke-Iqbal and K. Iqbal. Impaired brain glucose metabolism leads to Alzheimer neurofibrillary degeneration through a decrease in tau O-Glc NAcylation. J Alzheimers Dis 9 (2006) 1-12.

129. A. Hoyer, H.J. Bardenheuer, E. Martin and K. Plaschke. Amyloid precursor protein (APP) and its derivatives change after cellular energy depletion. An in vitro-study. J Neural Transm 112 (2005) 239-253.

135 S. Hoyer. Brain glucose and energy metabolism abnormalities in sporadic Alzheimer disease. Causes and consequences: an update. Exp. Gerontol 35 (2000) 1363-1372.

223. E.K. Perry, R.G. Perry, B.E. Tomlinson, G. Blessed and P.H. Gibson. Coenzyme A-acetylating enzymes in Alzheimer’s disease: possible cholinergic „compartment“ of pyruvate dehydrogenase. Neurosci Lett 18 (1980) 105-110.

224. E.R. Peskind, R.Elrod, D.J. Dobie, M. Pascualy, E. Petrie, C. Jensen, K. Brodkin, S. Murray, R.C. Veith and M.A. Raskind. Cerebrospinal fluid epinephrine in Alzheimers disease and normal aging. Neuropsychopharmacology 19 (1998) 465-471.

289. D.F. Swaab, F.C. Raadsheer, E.F. Endert, M.A. Hofman, W.C. Kamphorst and R. Ravid. Increases in cortisol levels in aging and Alzheimer’s disease in post mortem cerebrospinal fluid. Neuroendocrinology 6 (1994) 681-687.

290. G.R. Swannick, M. Kirby, I. Bruce, F. Buggy, R.F. Coen, D. Coakley and

B.A. Lawlor. Hypothalamic-pituitary-axis dysfunction in Alzheimer’s disease.

Lack of association between longitudinal and cross-sectional findings. Am J

Psychiatry 155 (1998) 286-289.

241. H.M. Röder and V.M. Ingram. Two novel kinases phosphorylate tau and the KSP site of heavy neurofilament subunits in high stoichiometric ratio. J Neurosci 11 (1991) 3325-3342.

316. J.E. Youngren. Regulation of insulin receptor function. Cell Mol Life Sci 64 (2007) 873-891.

245. D.G. Rouiller, C. McKeon, S.I. Taylor and P. Gorden. Hormonal regulation of insulin receptor gene expression. Hydrocortisone and insulin act by different mechanisms. J Biol Chem 263 (1988) 13185-13190.

108. H.U. Häring, D. Kirsch, B. Obermaier, B. Ermel and F. Machicao. Decreased tyrosine kinase activity of insulin receptor isolated from rat adipocytes rendered insulin-resistant by catecholamine treatment in vitro. Biochem J 234 (1986) 59-66.

95. F. Giorgino, A. Almahfouz, L.J. Goodyear and R. J. Smith. Glucocorticoid regulation of insulin receptor and substrate IRS-1 tyrosine phosphorylation in rat skeletal muscle in vivo. J Clin Invest 91 (1993) 2020-2030.

Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences

Charles Duyckaerts, Marie-Claude Potier, Benoît Delatour

Acta Neuropathol. 2008 January; 115(1): 5–38.

[Neurology.](javascript:AL_get(this,%20'jour',%20'Neurology.');) 2008 Sep 30;71(14):1065-71. Epub 2008 Apr 9.**Impaired insulin secretion increases the risk of Alzheimer disease.**[Rönnemaa E](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22R%C3%B6nnemaa%20E%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVAbstract), [Zethelius B](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Zethelius%20B%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVAbstract), [Sundelöf J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Sundel%C3%B6f%20J%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVAbstract), [Sundström J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Sundstr%C3%B6m%20J%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVAbstract), [Degerman-Gunnarsson M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Degerman-Gunnarsson%20M%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVAbstract), [Berne C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Berne%20C%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVAbstract), [Lannfelt L](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Lannfelt%20L%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVAbstract), [Kilander L](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Kilander%20L%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVAbstract).

[Ann N Y Acad Sci.](javascript:AL_get(this,%20'jour',%20'Ann%20N%20Y%20Acad%20Sci.');) 1993 Aug 27;692:33-43.**Patterns of insulin-like growth factor and IGF receptor gene expression in the brain. Functional implications.**[Bondy CA](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Bondy%20CA%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVAbstract), [Lee WH](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Lee%20WH%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVAbstract).