

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Marta Balog**

**Utjecaj kroničnoga stresa i starenja na  
lipidne splavi moždanih stanica u štakora**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2019.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Marta Balog**

**Utjecaj kroničnoga stresa i starenja na  
lipidne splavi moždanih stanica u štakora**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2019.

Disertacija je izrađena u Laboratoriju za neurobiologiju pri Katedri za medicinsku biologiju i genetiku te Vivariju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Osijeku. Jedan dio istraživanja izrađen je na Odjelu za farmakodinamiku i biofarmaciju Farmaceutskog fakulteta Sveučilišta u Szegedu, Mađarska, u Laboratoriju za molekularnu neurobiologiju i neurokemiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te u Laboratoriju za staničnu neurobiologiju pri Zavodu za fiziologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u La Laguni, Tenerife, Španjolska.

Voditeljice rada: Izv. prof. dr. sc. Željka Vukelić i prof. dr. sc. Marija Heffer

## *Zahvale*

*Ova je disertacija dio jedne velike studije koja je započela slučajno, davne 2012. godine kada sam se u potrazi za poslom pojavila u Laboratoriju za neurobiologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku, uz vodstvo moje današnje šefice i mentorice prof. dr. sc. Marije Heffer, koja na ovom trnovitom putu nikada nije odustala od mene. Nije odustala čak ni kada su uzorci prve studije stradali radi kvara na frižideru i kada smo morali iznova započeti ovu, ionako predugačku studiju. Marija, hvala ti na savjetima, neprospavanim noćima tijekom kojih smo dovršavale zadatke s prekratkim rokovima, uvijek spremnoj podršci, ohrabrivanju kad je teško i pomoći u svakom trenutku.*

*Također se zahvaljujem svojoj zagrebačkoj mentorici izv. prof. dr. sc. Željki Vučkelić na pomoći, savjetima i ispravicima disertacije tijekom ovog dugačkog puta bez koje ova disertacija ne bi bila ista.*

*Tijekom izrade ove disertacije živjela sam na nekoliko različitih mjesta jer sve ove pokuse nipošto ne bih mogla izvesti sama.*

*Prvi dio studije izrađen je na Medicinskom fakultetu u Osijeku. Cijela je studija započela nespretno, ali je tijekom godina napredovala uz moje nevjerojatne laboratorijske kolegice i kolege te nekoliko iznimno vrijednih i sposobnih studentica i studenata. Hvala našoj voditeljici Vivarija Univ.mag. Iris Broman, dr.med.vet te Ivanu Degmečiću koji su hrabro započeli studiju stresa sa mnom tijekom mog neiskusnog početka. Draga Veki (Vedrana Ivić) – hvala ti na pomoći tijekom cijele ove studije, putovanjima u Szeged, slaganju i kvantifikaciji slika, tehničkoj i prijateljskoj podršci. Dragi Mili (Milorad Zjalić), hvala ti što si uskočio u trenutcima kada sam trebala biti u Osijeku i Szegedu u isto vrijeme, na brizi za moje štakore, pomoći s imunohistokemijama, analizom slika i pronalaskom kemikalija kad ih više nigdje nije bilo. Draga Neno (Irena Labak), hvala ti na pomoći sa statistikom, na svim kavama, strpljivom slušanju mojih problema, iznimno korisnim savjetima te vječnom optimizmu. Draga Senka (Senka Blažetić), hvala ti što si mi u*

ključnim trenucima pomogla s najtežim dijelom pokusa, prikupljanjem tkiva (ponekad i do kasno u noć), hvala ti na svim savjetima i analizi podataka. Dražene (Dražen Mlinarević) i Vinko (Vinko Krajina), vas dvojica ste neizostavan dio našeg tima i uvijek ću se rado sjećati dana i noći provedenih u Vivariju s vama. Našoj dragoj studentici i prijateljici labosa te osječkoj šaptačici štakorima, Ani Barđak, zahvaljujem se na pomoći u trenucima kada su se svi ostali bojali prići štakorima. Drage Katarina (Mikulec), Doris (Lulić) i Ljiljo (Majić) – fantastični trio, hvala vam na pomoći tijekom foto-finiša kada se činilo da neću stići završiti sve pokuse na vrijeme. Dragi Alene (Alen Rončević), hvala ti što si u ključnom trenutku uskočio i satima sjedio za mikroskopom te uslikao ogromnu količinu rezultata. Također se moram zahvaliti i voditelju Odjela za kliničku kemiju KBC Osijek doc. dr. sc. Željku Debeljaku, mag. med. biochem. te dr. sc. Dariu Mandiću, mag. med. biochem. na analizama seruma dan i noć tri dana prije predaje ove disertacije.

Dio je studije izrađen na Odjelu za farmakodinamiku i biofarmaciju, Sveučilišta u Szegedu pod vodstvom prof. dr. sc. Roberta Gaspara i njegova tima – Adrienn Seres, Kálmána Szúcsa, Marianne Lipták te nevjerojatne šaptačice štakorima Aggi čije prezime nikad nisam uspjela zapamtiti. Hvala vam na stručnim savjetima, pomoći i svemu što ste me naučili tijekom boravka u Szegedu.

Veliki dio studije izrađen je na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga u Zagrebu. Prvo bih se zahvalila svim HIIM-ovcima što su me uvijek lijepo primili, na Institutu sam se zaista osjećala kao kod kuće, hvala vam svima na podršci, savjetima i ohrabrenjima u kuhinji prvog kata. Cijela priča i muka mojih pokusa u Zagrebu bila bi puno manje zabavna i potpuno nezanimljiva bez Katarine Ilić i Nikole Habeka. Hvala vam na svim kavama, druženjima i podršci kada Westerni nisu izgledali kako bi trebali, kad mi je ponestalo kemikalija, ideja i volje. Također se zahvaljujem prof. dr. sc. Svjetlani Kalanj-Bognar te doc. dr. sc. Kristini Mlinac-Jerković, mojim neslužbenim mentoricama, koje su mi olakšale ovaj put svojim savjetima, nevjerojatnom podrškom i nikada nisu odustale od mojih vrlo zahtjevnih uzoraka.

*Veliko hvala Anjama (Anja Bukovac i Anja Kafka) na nesebičnom dijeljenju svog labosa, a ponekad i kemikalija te na svim savjetima, druženju i pomoći.*

*Hvala najboljoj stručnoj savjetnici poslijediplomskog studija, Željki Pavlović, na uvijek spremnoj pomoći i brzom rješavanju svih mojih studentskih i nestudentskih problema.*

*Zahvaljujem se i mojim kolegicama s Tenerifa, prof. dr. sc. Raquel Marin i Ani Canerini Luis Amaro što se me primile u svoj laboratorij i pomogle mi s analizama tkiva te me naučile radu s konfokalnom mikroskopijom. Također im se zahvaljujem na svim izletima i druženjima te što su učinile da se u La Laguni osjećam kao kod kuće.*

*Hvala Uredu za mobilnost Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku na pomoći tijekom prijave dokumentacije te odobrenju dviju ERASMUS stipendija kojima je financiran moj boravak u Szegedu i La Laguni.*

*Moram spomenuti i Cedars Sinai Medical Center's International Research and Innovation in Medicine Program te RECOOPHST Organizaciju te Sandora Varija, dr. med., koji su podupirali ovu studiju cijelim putem i financirali dio boravaka u Szegedu.*

*Zahvaljujem i našim znanstvenim prijateljima u SAD-u koji su nam uvijek nesebično pomagali u najtežim trenucima – prof. dr.sc. Ronaldu Schnaaru hvala na neiscrpnom izvoru ideja, savjeta i protutijela te ostalih kemikalija, a prof. dr.sc. Nenadu Šestanu te Danijelu Franjicu zahvaljujem što su nas se uvijek sjetili tijekom putovanja u Osijek.*

*Na kraju se neizmjereno zahvaljujem obitelji i prijateljima na strpljenju i podršci tijekom izrade ove disertacije. Hvala vam što ste cijelim putem vjerovali u mene!*

## SADRŽAJ

	<b>POPIS KRATICA</b>	V-VII
<b>1.</b>	<b>UVOD</b>	1
1.1.	Kronični stres – povijest i opći koncept	2
1.2.	Građa i funkcija glukokortikoidnih i mineralokortikoidnih receptora	3
1.3.	Kronični stres i mozak	7
1.4.	Alzheimerova bolest	8
1.5.	Alzheimerova bolest i kronični stres	11
1.6.	Stres i neurodegeneracija tijekom starenja	12
1.7.	Spolna i dobna specifičnost u kroničnom stresu i neurodegeneraciji	14
1.8.	Inzulinski i leptinski receptor u kroničnom stresu, starenju i neurodegeneraciji	15
1.8.1.	Inzulinski receptor – starenje, stres i neurodegeneracija	15
1.8.2.	Leptinski receptor – starenje, stres i neurodegeneracija	19
1.8.3.	Spolna specifičnost i poveznice inzulinskog i leptinskog signalnog puta	22
1.9.	Lipidne splavi – neurodegeneracija, starenje i stres	23
<b>2.</b>	<b>HIPOTEZA</b>	27
<b>3.</b>	<b>CILJEVI RADA</b>	29
<b>4.</b>	<b>MATERIJAL I METODE</b>	31
4.1.	Materijal	31
4.1.1.	Financiranje	31
4.1.2.	Pokusne životinje – opće informacije i dobrobit	31
4.1.3.	Tijek pokusa	33
4.1.4.	Prikupljanje uzoraka za analizu	37
4.2.	Metode	38
4.3.	Analiza steroidnih hormona iz seruma	38
4.4.	Mjerenje tjelesne mase	40
4.5.	Testovi tolerancije na glukozu i inzulin	41
4.6.	Test ponašanja – pasivno izbjegavanje	43

4.7.	Kvalitativna i kvantitativna imunokemijska analiza proteina	45
4.7.1.	Imunohistokemijske analize	45
4.7.2.	Analiza jednostrukih imunohistokemijskih bojanja	52
4.7.3.	Analiza dvostrukih imunohistokemijskih bojanja	54
4.7.4.	Izolacija lipidnih splavi i kvantitativna analiza proteina	60
4.7.5.	Analiza proteina <i>Western blotting</i> metodom	67
4.8.	Korištene otopine	75
4.9.	Statističke analize	76
<b>5.</b>	<b>REZULTATI</b>	<b>77</b>
5.1.	Analiza steroidnih hormona iz seruma	78
5.1.1.	Određivanje koncentracije kortikosterona	78
5.1.2.	Određivanje koncentracije progesterona	79
5.1.3.	Određivanje koncentracije testosterona	80
5.2.	Promjene tjelesne mase tijekom studije	81
5.2.1.	Promjena tjelesne mase u mladih životinja pod utjecajem kroničnog stresa	81
5.2.2.	Promjena tjelesne mase u starijih životinja pod utjecajem kroničnog stresa	82
5.3.1.	Usporedba tolerancije opterećenja glukozom pod utjecajem stresa u mladih životinja	84
5.3.2.	Usporedba tolerancije opterećenja glukozom pod utjecajem stresa u starijih životinja	85
5.3.3.	Tolerancija na inzulin u mladih životinja pod utjecajem kroničnog stresa	87
5.3.4.	Tolerancija na inzulin u starijih životinja pod utjecajem kroničnog stresa	88
5.4.	Test za praćenje promjene pamćenja – pasivno izbjegavanje	90
5.5.	Imunohistokemijska analiza izražaja proteina	91
5.5.1.	Izražaj $\alpha$ -podjedinice inzulinskog receptora i leptinskog receptora u hipokampusu i malom mozgu	91
5.5.2.	Izražaj Tau i AMPA receptora u hipokampusu i malom mozgu	98
5.5.3.	Izražaj neuroplastina u hipokampusu i malom mozgu	106



5.5.4.	Izražaj gangliozida GM1 u hipokampusu i malom mozgu	110
5.5.5.	Kolokalizacija APP/GD1a u CA1 području hipokampusa	115
5.5.6.	Kolokalizacija APP/GD1a u dentatnom girusu hipokampusa	119
5.6.	Analiza izražaja odabranih proteina Western blottingom	122
5.6.1.	Izražaj glukokortikoidnog receptora u hipokampusu i malom mozgu	122
5.6.2.	Izražaj estrogenskog receptora u hipokampusu i malom mozgu	124
5.6.3.	Izražaj $\beta$ -podjedinice inzulinskog receptora u malom mozgu i hipokampusu	126
5.6.4.	Izražaj leptinskog receptora u malom mozgu i hipokampusu	128
5.6.5.	Izražaj neuroplastina u malom mozgu i hipokampusu	132
5.6.6.	Izražaj preteče amiloida u malom mozgu i hipokampusu	134
5.6.7.	Nizvodni signalni putovi inzulina i leptina	136
5.7.	Promjena membranske lokacije odabranih proteina	142
5.7.1.	Inzulinski receptor u lipidnim nesplavima hipokampusa i malog mozga	142
5.7.2.	Leptinski receptor u lipidnim nesplavima hipokampusa i malog mozga	144
5.7.3.	Neuroplastin u lipidnim splavima i izvan njih u hipokampusu i malom mozgu	147
5.7.4.	Preteča amiloida u lipidnim splavima i izvan njih u hipokampusu i malom mozgu	149
<b>6.</b>	<b>RASPRAVA</b>	155
6.1.	Steroidni hormoni	156
6.2.	Kronični stres utječe na blage promjene tjelesne mase	158
6.3.	Promjena metabolizma glukoze nakon izlaganja kroničnom stresu	158
6.4.	Promjena pamćenja u starijih životinja	159
6.5.	Imunohistokemijska analiza izražaja odabranih proteina i gangliozida u hipokampusu i malom mozgu	160
6.5.1.	Izražaj inzulinskog i leptinskog receptora u hipokampusu i malom mozgu	160
6.5.2.	Izražaj Tau proteina, AMPA receptora i neuroplastina u hipokampusu i malom mozgu	161
6.5.3.	Izražaj gangliozida GM1 u hipokampusu i malom mozgu	163

6.5.4.	Kolokalizacija APP/GD1a u hipokampusu	163
6.6.	Analiza izražaja odabranih proteina u hipokampusu i malom mozgu <i>Western blottingom</i>	165
6.6.1.	Glukokortikoidni receptor	165
6.6.2.	Estrogenski receptor	165
6.6.3.	$\beta$ -podjedinica inzulinskog receptora	166
6.6.4.	Leptinski receptor u staničnoj membrani	167
6.6.5.	Neuroplastin u staničnoj membrani	168
6.6.6.	Preteča amiloida u staničnoj membrani	169
6.6.7.	Nizvodni signalni putovi inzulina i leptina	170
6.7.	Promjena membranskog smještaja odabranih proteina	170
6.7.1.	Inzulinski receptor u lipidnim nesplavima hipokampusa i malog mozga	170
6.7.2.	Leptinski receptor u lipidnim nesplavima hipokampusa i malog mozga	171
6.7.3.	Neuroplastin u lipidnim splavima i izvan njih u hipokampusu i malom mozgu	171
6.7.4.	Preteča amiloida u lipidnim splavima i izvan njih u hipokampusu i malom mozgu	172
7.	<b>ZAKLJUČCI</b>	174
8.	<b>SAŽETAK</b>	177
9.	<b>SUMMARY</b>	179
10.	<b>LITERATURA</b>	181
11.	<b>ŽIVOTOPIS</b>	194

## Popis kratica

<b>Kratica</b>	<b>Značenje</b>
ACTH	Adrenokortikotropni hormon
AD	Alzheimerova bolest
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-methyl-4-isoksazolepropionski kiseli receptor
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Preteča amiloida (od engl. <i>Amyloid precursor protein</i> )
BACE1	Aspartatna proteaza beta mjesta
BSA	Albumin iz seruma goveda
CRH	čimbenik otpuštanja kortikotropina
CT	Temperatura komore kriostata (od engl. <i>Cryostat temperature</i> )
CTB	B podjedinica kolera toksina
DAB	3,3'-diaminobenzidin
DAPI	4',6-diamidin-2'-fenilindol dihidroklorid
ER- $\alpha$	$\alpha$ -podjedinica estrogenskog receptora
Flot	Flotilin
GAPDH	Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza
GR	Glukokortikoidni receptor
Grb2	Receptor adaptorskog proteina čimbenika rasta 2
GSK-3b	Glikogen-sintaza-kinaza 3 $\beta$
HPA os	Os hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda
HRP	Peroksidaza iz hrena (od engl. <i>Horseradish peroxidase</i> )
Hsp70	Protein toplinskog šoka 70 (od engl. <i>Heat shock protein 70</i> )
Hsp90	Protein toplinskog šoka 90 (od engl. <i>Heat shock protein 90</i> )
IDE	Enzim za razgradnju inzulina (od engl. <i>Insulin-degrading enzyme</i> )
IDV	Integrirana vrijednost gustoće signala (od engl. <i>Integrated density value</i> )
IHC	Imunohistokemijsko bojanje korištenjem HRP/DAB sustava
IHC-F	Imunohistokemijsko bojanje sa sekundarnim protutijelima obilježenim fluorescentnim fluoroforima
IRS-1	Substrat inzulinskog receptora 1 (od engl. <i>Insulin receptor substrate 1</i> )

IR- $\alpha$	$\alpha$ -podjedinica inzulinskog receptora
IR- $\beta$	$\beta$ -podjedinica inzulinskog receptora
JAK 2	Janus kinaza 2
JNK	Signalni put kinaza koje fosforiliraju N-kraj c-Jun-a
LDL	Lipoprotein male gustoće (od engl. <i>Low-density lipoprotein</i> )
LRP1	Receptor za lipoprotein male gustoće 1 (od engl. <i>Low-density lipoprotein receptor-related protein 1</i> )
<i>MAPT</i>	Gen za Tau protein povezan s mikrotubulima
MMP	Metaloproteaza matriksa
MR	Mineralokortikoidni receptor
NEP	Neprolizin
Np	Neuroplastin
ObR	Leptinski receptor
OT	Temperatura nosača tkiva kriostata (od engl. <i>Object temperature</i> )
PBS	Fosfatni puffer (od engl. <i>Phosphate buffer saline</i> )
PD	Parkinsonova bolest
PFA	4% puferirani paraformaldehid
PI3-K	Fosfatidil-inozitol-3-kinaza
PKB	Protein-kinaza B
PPAR	Peroksisomni receptor aktiviran proliferacijom (od engl. <i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i> )
STAT	Protein pojačivač i aktivator transkripcije 3
PVDF	Polivinil difulorid
ROI	Ciljno područje analize
SH2P2	Protein koji sadrži SH2 domenu
SOCS	Protein supresor signalizacije citokinima 3
T1D	Dijabetes tipa 1
T2D	Dijabetes tipa 2
T3D	Dijabetes tipa 3
Tau	Tau protein
Tfr	Transferinski receptor

TIFF	<i>Tagged image file format</i>
TTG	Test tolerancije na glukozu
TTI	Test tolerancije na inzulin

# 1. UVOD

## 1.1 Kronični stres – povijest i opći koncept

Održanje homeostaze često je pod izazovom različitih vrsta stresora. Složeni procesi osi hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda (engl. *hypothalamic-pituitary-adrenal axis* – HPA) reguliraju homeostazu (1, 2). Pojam stres, 1936. godine opisao je mađarsko-kanadski znanstvenik Hans Selye u časopisu *Nature* kao ...“nespecifičan odgovor tijela na zahtjev za velikim promjenama”. Primijetio je razliku između kratkotrajnog (akutnog) stresa i dugotrajnog (kroničnog) te je kronični stres nazvao *općim sindromom prilagodbe* (engl. *general adaptation syndrome*). Sindrom je prema Selyeu podijeljen u tri stupnja: alarmirajuća reakcija, razdoblje otpora te razdoblje iscrpljenja (3-5). Akutni stres izaziva kratkotrajnu reakciju koja se u muškaraca može opisati kao “borba ili bijeg” (engl. *fight or flight*), a u žena “brige za potomstvo i povezivanje” (engl. *tend and befriend*). Kronični stres uzrokuje dugoročne promjene koje mogu izazvati različita patološka stanja (6-8). Osim prema trajnosti, stres se može karakterizirati kao fizički ili psihološki, a smatra se kako je upravo psihološki stres snažni aktivator HPA osi dok kombinacija dviju vrsta stresa može još pojačati taj učinak (9). Ukoliko je stres dovoljno snažan i dugotrajan, djelovanje HPA osi postaje nekontrolirano i dolazi do produženog povećanja koncentracije neurohormona te glukokortikoida i mineralokortikoida (5, 10). Prvo se iz hipotalamusa aktivira čimbenik otpuštanja kortikotropina (CRH) (engl. *corticotropin-releasing hormone*) koji utječe na endokrine stanice hipofize koje imaju receptor za CRH. Nakon signalnog puta aktiviranog CRH receptorima u krvotok se otpušta adrenokortikotropni hormon (ACTH) koji aktivira endokrine stanice kore nadbubrežne žlijezde. ACTH stimulira otpuštanje mineralokortikoida i glukokortikoida iz nadbubrežne žlijezde (11). Glukokortikoidi djeluju putem svojih receptora, a povećanjem njihove koncentracije dolazi do lipolize, proteolize, otpuštanja glukoze u krvotok, potiskivanja imunskog sustava i reproduktivnih funkcija u nastojanju za očuvanjem energije i ponovnom uspostavom homeostaze. Glukokortikoidi su lipofilni, steroidni hormoni koji pod utjecajem stresa prolaze i krvno-moždanu barijeru i vežu se za glukokortikoidne receptore neurona u mozgu gdje djeluju na izražaj raznih gena (12-15). Glukokortikoidi, od kojih je najčešći kortizol (ili kortikosteron u glodavaca), imaju važan učinak na metabolizam ugljikohidrata, proteina i masti – stimuliraju glukoneogenezu i sintezu glikogena u stanju gladovanja. Osim toga, glukokortikoidi povećavaju aktivnost jetrene glukoza-6-fosfataze te

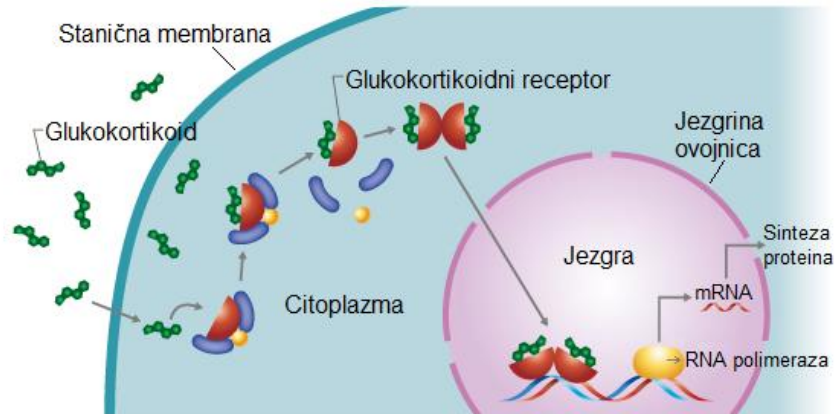
koncentraciju glukoze u krvi, a na periferiji imaju protu-inzulinsko djelovanje što može pogoršati simptome dijabetesa. Takvo se povećanje koncentracije glukoze javlja tijekom stanja stresa čime se osigurava dovoljno energije za vitalne organe (14, 15). Mineralokortikoidi – aldosteron i deoksikortikosteron, također pripadaju obitelji lipofilnih steroidnih hormona, lako prolaze krvno-moždanu barijeru te podešavaju ravnotežu vode i soli u organizmu i utječu na promjenu krvnoga tlaka (16). Glukokortikoidi imaju snažan utjecaj na mozak – nužni su za procese neuronskog obnavljanja i smrti te utječu na ponašanje povezano s učenjem, pamćenjem i prilagodbom (17). S obzirom na to da obje skupine hormona lako prolaze krvno-moždanu barijeru, u mozgu utječu na ciljne neurone. Na neuronskoj razini glukokortikosteroidi podešavaju odgovor na stres putem dvije vrste receptora – mineralokortikoidnim (MR) te glukokortikoidnim receptorima (GR). Ti steroidni receptori pripadaju obitelji jezgrenih receptora potaknutih ligandom. Nakon vezanja za receptore glukokortikoidi i mineralokortikoidi se prenose u jezgru gdje utječu na izražaj specifičnih gena (18).

## 1.2 Građa i funkcija glukokortikoidnih i mineralokortikoidnih receptora

MR su receptori visokog afiniteta za glukokortikoide i u normalnim su uvjetima zauzeti fiziološkom koncentracijom glukokortikoida, između 70 i 90% (19). Suprotno tomu, niski afinitet vezanja glukokortikoida za GR postaje fiziološki važan tek kada se koncentracija hormona poveća tijekom cirkadijanog vrhunca ili u odgovoru na stres (19, 20). Stoga se može reći kako je u normalnim uvjetima vezanje MR blizu zasićenja te da je signalizacija tim receptorima blizu vrhunca. Povećanje kortizola ili kortikosterona neće povećati signalizaciju putem MR jer je ona ograničena dostupnim MR, a ne koncentracijom njihova liganda. S druge strane, u normalnim uvjetima GR slabo vežu ligande, no povećanje koncentracije glukokortikoida povećat će signalizaciju posredovanu GR (20). Ukratko, signalizacija putem MR uvelike je regulirana količinom receptora dok je signalizacija putem GR ovisna o koncentraciji hormona. S obzirom da glukokortikoidi i njihovi receptori pokazuju snažni utjecaj na središnji živčani sustav u daljnjem će tekstu biti detaljnije opisani. GR ili receptori NR3C1 (engl. *nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1*) izraženi su u gotovo svakoj stanici našega tijela gdje nadziru gene važne za embrionalni



razvoj, metabolizam te imunski odgovor (21). S obzirom da gen za GR može biti izražen u nekoliko različitih oblika konačni proizvod tog gena može različito utjecati na pojedine organe i organske sustave. Vežanje glukokortikoida za svoj receptor (slika 1.2.1) primarni je mehanizam podešavanja genske transkripcije.



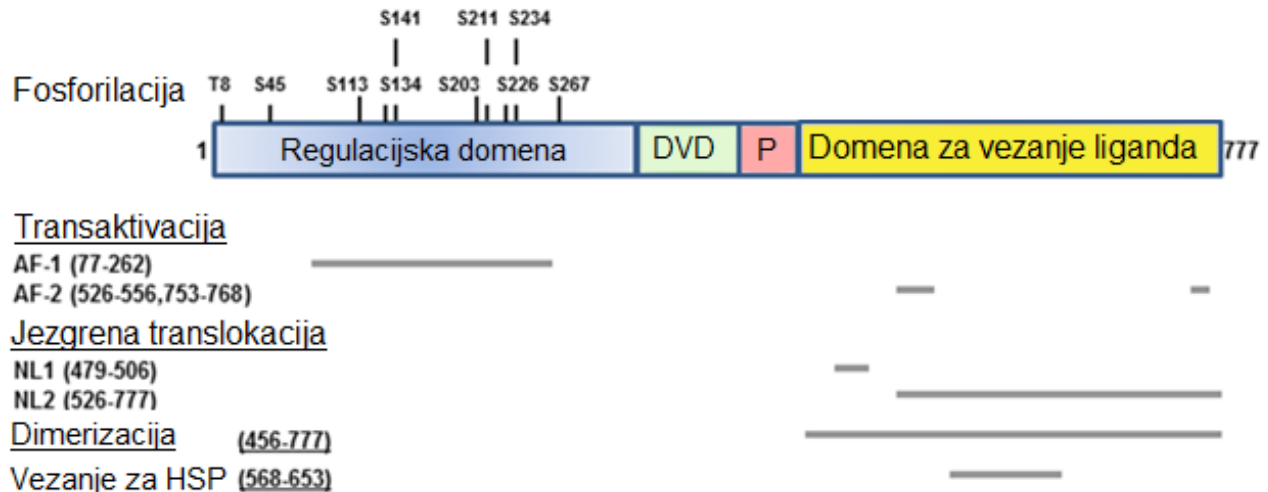
**Slika 1.2.1** Shematski prikaz glukokortikoidnog receptora i njegova djelovanja unutar stanice (slika je preuzeta i prilagođena s mrežne stranice: [http://csls-text3.c.u-tokyo.ac.jp/large\\_fig/fig15\\_04.html](http://csls-text3.c.u-tokyo.ac.jp/large_fig/fig15_04.html), 4. studenoga 2018.).

Receptor na koji nije vezan ligand ostat će u citosolu stanice. Vežanjem ligana za receptor nastaje njihov kompleks. Aktivirani kompleks može povećati izražaj protuupalnih proteina u jezgri ili smanjiti izražaj proupalnih proteina u citosolu sprječavanjem prijenosa drugih transkripcijskih čimbenika iz citosola u jezgru (21, 22). U ljudi su GR kodirani genom *NR3C1* na kromosomu 5. Kao i drugi steroidni receptori i GR je izgrađen iz više domena (23) (slika 1.2.2):

1. N-terminalna regulacijska domena
2. Domena za vežanje DNA
4. C-terminalna domena za vežanje liganda
3. Poveznica – domena koja povezuje prethodne dvije

U odsutnosti glukokortikoidnog hormona njegov receptor ostaje u citosolu u kompleksu s raznim proteinima uključujući šaperone kao što je protein toplinskog šoka 90 (engl. *heat shock protein 90* - hsp90), protein toplinskog šoka 70 (engl. *heat shock protein 70* - hsp70) te FKBP52 protein (engl. *FK506-binding protein 52*) (22). Pojačana sinteza tih proteina

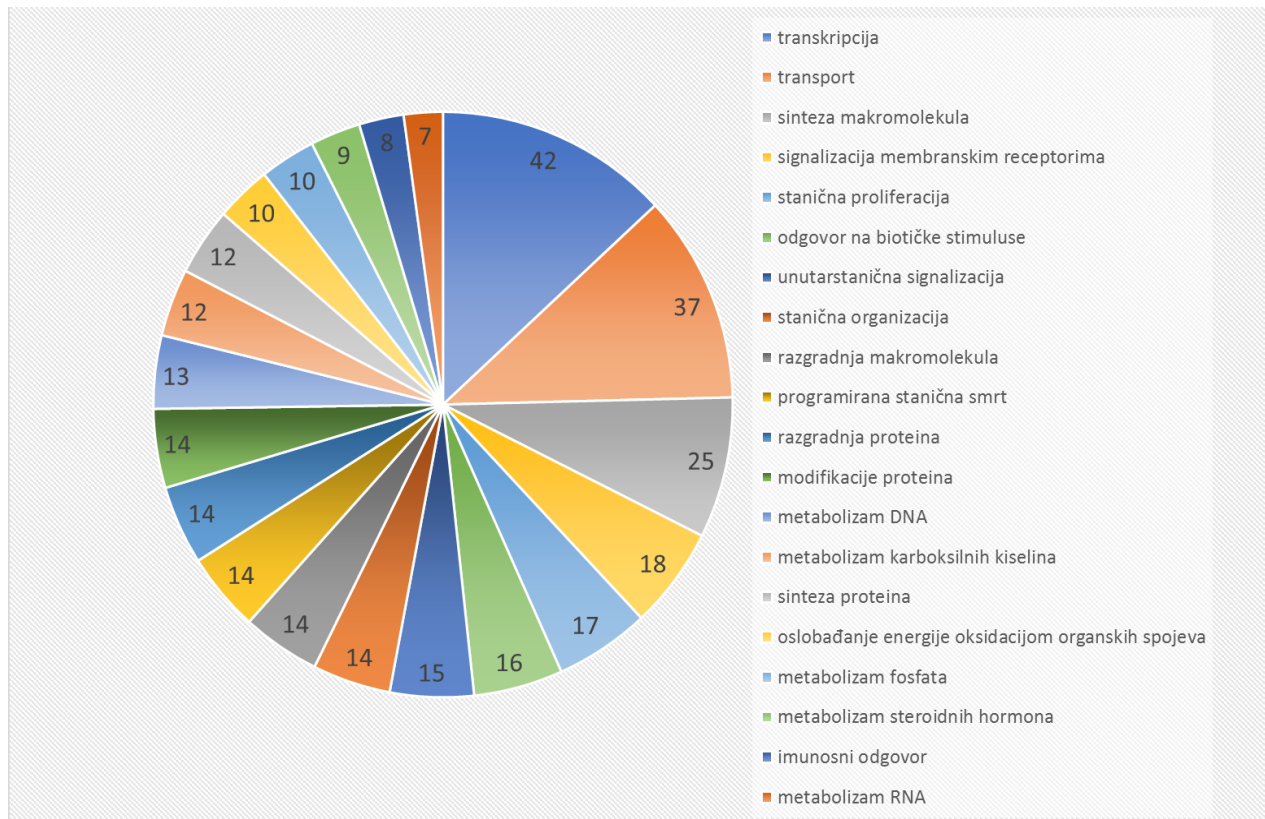
primijećena je tijekom djelovanja toksina, teških metala, analoga aminokiselina, inhibitora energetskog metabolizma, virusnih i bakterijskih patogena, oksidativnih oštećenja, nedostatnog dotoka krvi (engl. *ischemia*) i drugih oblika stresa (23, 24).



**Slika 1.2.2.** Shematski prikaz građe slijeda glukokortikoidnog receptora. N-terminalna regulacijska domena označena je plavom bojom, domena za vezanje DNA označena je kraticom DVD, domena-poveznica označena je kraticom P, domena za vezanje liganda označena je žutom bojom. Na lijevoj su strani označene uloge pojedinih područja receptora. Slika je preuzeta i prilagođena prema Ortsäter, 2012 (23).

Stresni šaperonski proteini u normalnim fiziološkim uvjetima sudjeluju u procesima nabiranja i premještanja novosintetiziranih proteina, njihovoj razgradnji, aktiviranju regulacijskih proteina, prijenosu signala unutar stanice, organizaciji staničnog skeleta te predočavanju antigena (24). Glukokortikoidni hormon prolazi kroz staničnu membranu u citoplazmu i veže se za svoj receptor što ga odvaja od spomenutih proteina. Receptori djeluju na promotorske sljedove (i time podešavaju transkripciju) ciljnih gena. Aktivirani oblik receptora djeluje na dva načina: transaktivacijom ili transrepresijom. Transaktivacija uključuje izravni mehanizam dimerizacije receptora, prijenosa u jezgru putem aktivnog prijenosa te vezanje receptora za DNA slijed koji izaziva odgovor gena (engl. *DNA responsive element*) što u konačnici aktivira transkripciju gena (slika 1.2.3). Biološki odgovor ovisi o vrsti stanice u kojoj se receptor nalazi. U slučaju transrepresije, GR nije aktiviran, ali određeni transkripcijski čimbenici kao što su NF- $\kappa$ B (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) ili AP-1 (engl. *activator protein 1*) mogu aktivirati specifične gene. Aktivirani GR može se udružiti s transkripcijskim čimbenicima

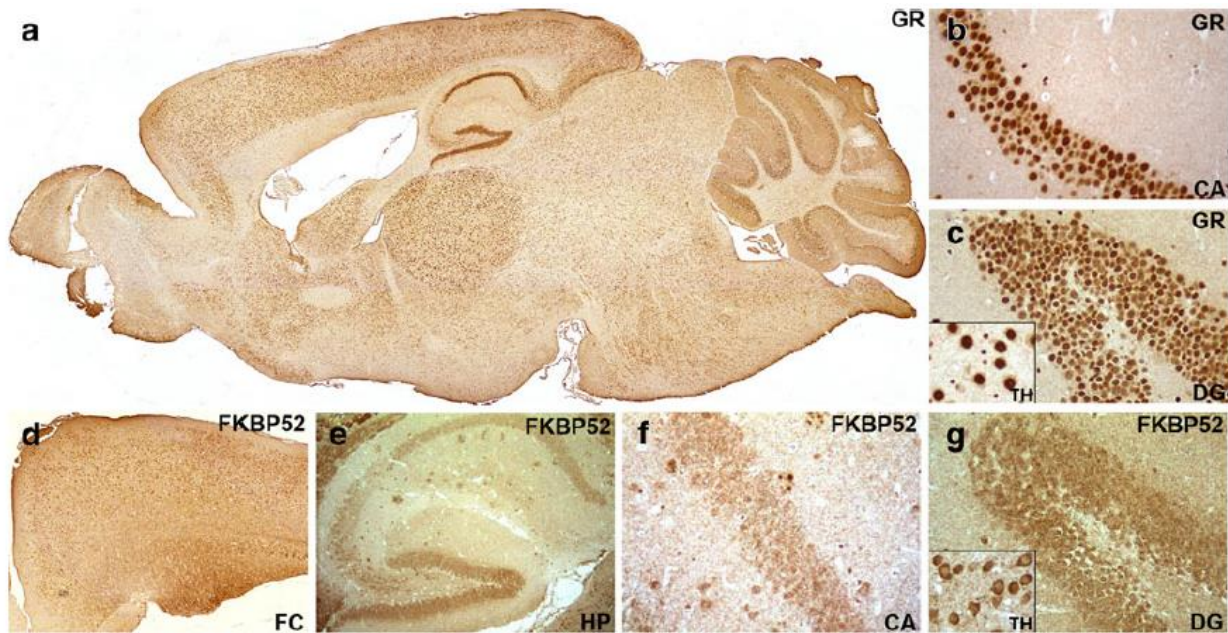
te spriječiti njihovo vezanje za ciljne gene i zaustaviti izražaj specifičnih gena (24-26). Transkripcijski čimbenici povezani s djelovanjem GR imaju širok raspon djelovanja na podešavanje koncentracije čimbenika rasta i proupalnih citokina te u većoj mjeri posreduju protuupalne učinke glukokortikoida. Ukupno je između 10 i 20% svih izraženih gena u stanici podešeno glukokortikoidima i njihovim receptorima (Slika 3). Neki od tih gena su *PER1* gen – odgovoran za cirkadijani ritam, *MCL1*, *FOXN2*, *LIF* – skupina gena koji pridonose podložnosti leukemiji, *BCL6*, *TSPYL2*, *BCL3* – skupina gena koji su odgovorni za nastanak limfoma, *FST* – gen odgovoran za razvoj i morfogenezu te mnogi drugi (21, 27-30).



**Slika 1.2.3.** Skupine gena u nadzoru glukokortikoida i njihovih receptora, na grafikonu je označen broj gena koji pripada svakoj funkcionalnoj skupini. Slika je preuzeta i prilagođena prema Sedwick, 2015 (27).

### 1.3 Kronični stres i mozak

Hipokampus je posebno bogat receptorima za glukokortikoide. Osim u hipokampusu najveća je gustoća GR u kori mozga, amigdali i hipotalamusu (31, 32) (slika 1.3.1). U normalnim je uvjetima aktivnost tih receptora potrebna za stanični metabolizam i presudna je za mnoge aktivnosti središnjeg živčanog sustava uključujući učenje i pamćenje.



**Slika 1.3.1.** Raspodjela glukokortikoidnog receptora (GR) u mozgu mladog miša (mužjak, starost – 6 mjeseci), soja C57BL/6N. Imunoreaktivnost sagitalne desne hemisfere mozga (a), imunoreaktivnost je primjećena u neuronskim jezgrama područja *cornu ammonis* 1 (b) te dentatnog girusa (c) hipokampusa. Protein FKBP52 koji je usko vezan s glukokortikoidnim šaperonskim proteinima pokazuje imunoreaktivnost u starijeg miša istog soja (mužjak, starost 26 mjeseci) u prednjem korteksu (d), dorzalnom hipokampusu (e), *cornu ammonis* (f) te dentatnom girusu (g). Slika je preuzeta i prilagođena prema Soontornniyomkij, 2010 (33).

Dok MR imaju važnu ulogu u nadzoru HPA osi, održavajući njenu bazalnu aktivnost, GR izravno ili neizravno podešavaju gene važne za razvoj, metabolizam i imunitet (34). Stoga je od iznimne važnosti održati ravnotežu izražaja MR i GR za najpovoljnije održanje staničnog metabolizma i kognitivnih funkcija – učenja i pamćenja. U normalnim uvjetima, niske ili srednje koncentracije glukokortikoida aktiviraju GR što osnažuje pamćenje i povećava dugoročnu potencijaciju (engl. *long term potentiation*) (19). No, tijekom stresa, kada je lučenje glukokortikoida povećano, aktivacija GR ima suprotan učinak – pogoršano

pamćenje (35-37) te smanjenu dugoročnu potencijaciju (36, 38-40). Pretjerana signalizacija glukokortikoidima smanjuje dugoročnu potencijaciju te ekscitaciju neurona hipokampusa (41, 42). Štetne utjecaje kroničnog stresa na pamćenje i učenje posredovano hipokampusom potvrdile su mnogobrojne studije na ljudima te životinjskim modelima (43-45). Kronični stres utječe na početak i stupanj kognitivnog propadanja u raznim bolestima – Cushingovu sindromu (46), posttraumatskom stresnom poremećaju (47), hipotiroidizmu (48), epilepsiji (49, 50), Parkinsonovoj bolesti (51, 52), Alzheimerovoj bolesti (AD) (53, 54) i depresiji (55). Fiziološke posljedice stresa ovise o snazi i trajanju stresora te načinu na koji organizam doživljava i reagira na štetni stimulus (56). Kako bi se objasnili mehanizmi kojima povećane koncentracije glukokortikoida utječu na atrofiju hipokampusa, osmišljena je "neurotoksična hipoteza" koja smatra kako dugotrajna izloženost glukokortikoidima smanjuje mogućnost pružanja otpora neurona nastalim oštećenjima (57, 58). Tu hipotezu podržava istraživanje na blizancima – oslikavanje moždanih struktura magnetnom rezonancijom pokazuje statistički značajno manji volumen hipokampusa u blizanaca ratnih veterana koji su bili izloženi kroničnom stresu nego u njihove braće koja nisu bila izložena dugotrajnom stresu (58). Još uvijek nisu potpuno jasni svi mehanizmi kojima glukokortikoidi ispoljavaju učinak na mozak, posebice na kognitivne procese – učenje i pamćenje.

#### **1.4 Alzheimerova bolest**

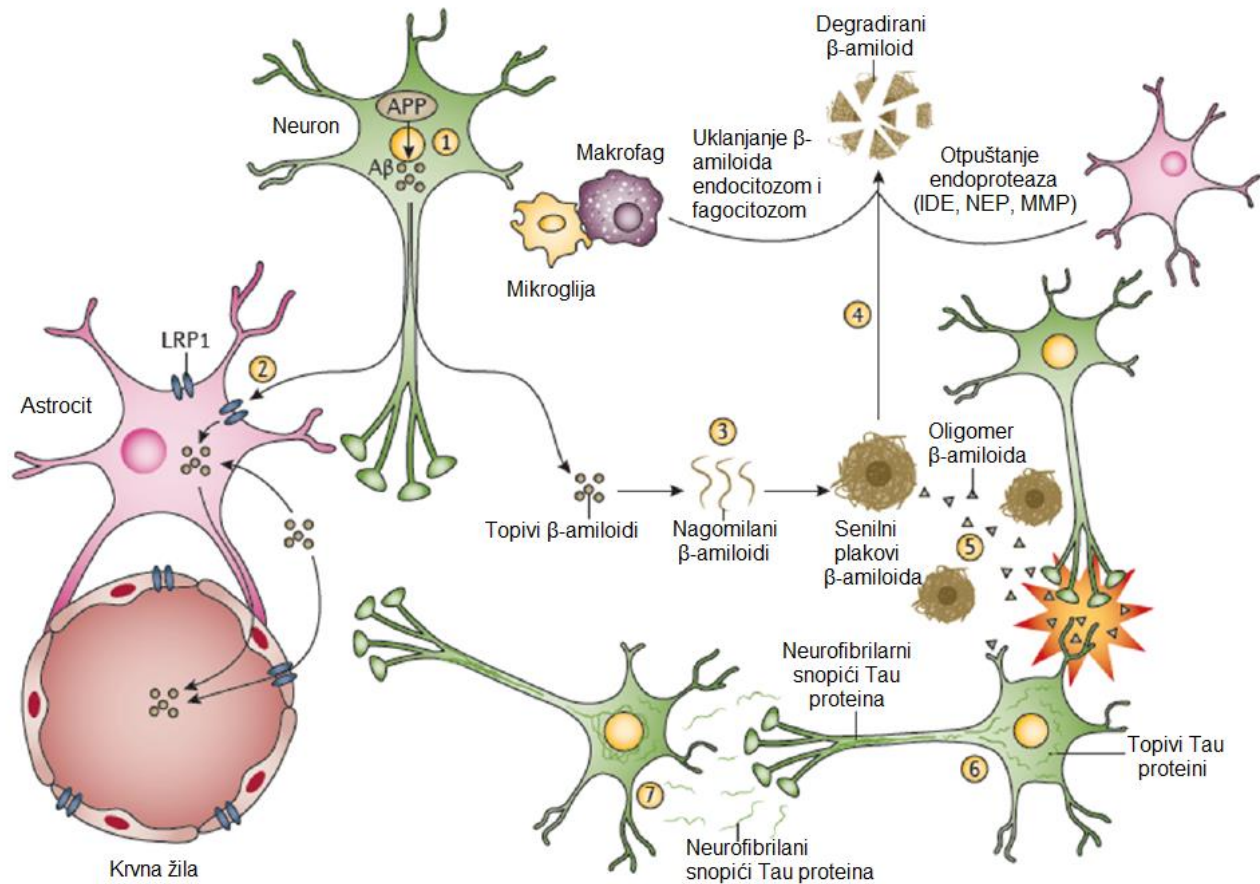
Alzheimerova je bolest (AD) nepovratna i progresivna neurodegenerativna bolest koju je prvi opisao bavarski psihijatar i neuropatolog Alois Alzheimer koji je tijekom svoga rada opisao neuropatološku povijest dviju pacijenata (59, 60). U tim je člancima Alzheimer opisao detaljne kliničke i neuropatološke karakteristike bolesti, a bolest je kasnije nazvana po njemu (61). Bolest se klinički očituje gubitkom pamćenja, kognitivnim propadanjem te promjenom osobnosti. Neurodegenerativne promjene u AD obuhvaćaju specifična područja mozga te napreduju s vremenom. Neurodegeneracija se širi iz entorinalne kore, hipokampusa, prednje kore te naposljetku zahvaća cijeli mozak (62). Nastup bolesti korelira sa starenjem i spolom. Poznato je kako se AD javlja u osoba iznad 65. godina starosti te da 75% svih pacijenata čine žene. Potpuni molekularni mehanizmi bolesti nisu

poznati, no utvrđena je neuronska smrt te smanjenje ili slabljenje sinapsi, posebice u prednjoj kori mozga, entorinalnoj kori i hipokampusu (63). AD uzrokuje više čimbenika te pokazuje familijarne (manje od 1% svih pacijenata) (64) i sporadične oblike. Familijarna AD je autosomno dominantna bolest s ranim nastupom – prije 65. godine starosti. Utvrđene su tri genske mutacije koje se uz starenje smatraju glavnim uzročnicima bolesti. Mutacije su povezane s ranom pojavom senilnih plakova odnosno taloženjem  $\beta$ -amiloida, nestabilnošću mikrotubula izazvanu hiperfosforilacijom Tau proteina (slika 1.4.1) te nepravilnim metabolizmom kolesterola u slučaju  $\epsilon 4$  alela ApoE proteina (65, 66).

Prvi i najočitiji znak AD je patološki nalaz senilnih plakova, čija su glavna komponenta nakupine  $\beta$ -amiloida.  $\beta$ -amiloid je protein koji nastaje nepravilnom obradom preteče amiloida (engl. *Amyloid precursor protein* – APP). APP je integralni membranski protein izražen u mnogo različitih tkiva no najviše ga je u području sinapsi neurona. Smatra se kako APP u normalnim fiziološkim uvjetima sudjeluje u popravku krvnih žila nakon ozlijede, prijenosu željeza, usmjeravanju neurona tijekom razvoja mozga i promjeni sinaptičke gustoće (66-69). APP je najpoznatiji po svojoj ulozi u AD jer njegovom nepravilnom obradom nastaju  $\beta$ -amiloidi, polipeptidi izgrađeni od 39-42 aminokiselina koji tvore senilne plakove u mozgu oboljelih (70). Obrada APP-a se odvija na staničnoj membrani na dva načina. Prvi je način nepatološki ili neamiloidni i tijekom tog puta APP cijepa  $\alpha$ -sekretaza te potom i  $\gamma$ -sekretaza, čime nastaju topljivi  $\beta$ -amiloidi. Drugi je način patološki ili amiloidni, a uključuje obradu APP-a aspartatnom proteazom beta mjesta (engl. *Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1* – BACE1) te potom i  $\gamma$ -sekretazom pri čemu nastaju netopljivi talozi  $\beta$ -amiloida – senilni plakovi (71).

Drugi je znak AD nalaz neurofibrilarnih snopića u mozgu nastalih nepravilnom obradom i mutacijama Tau proteina. Tau proteini su citoplazmatski proteini, no mogu djelovati i u staničnoj membrani. Glavna im je uloga stabilizacija mikrotubula aksona neurona pa su stoga najizraženiji u aksonima neurona u središnjem živčanom sustavu (72). Nastaju alternativnim prekrajanjem gena za Tau protein mikrotubula (engl. *Microtubule associated protein tau* – MAPT). Tau proteini djeluju na tubulin – potiču njegovo sastavljanje u mikrotubule i na taj ih način stabiliziraju (73). Smatra se kako su u AD Tau proteini pretjerano fosforilirani uslijed nastalih mutacija u *MAPT* genu kada nastaju različite

nefunkcionalne izoforme proteina. Takvi, izmijenjeni Tau proteini tvore neurofibrilarne snopiće, onemogućuju stabilizaciju mikrotubula aksona i uzrokuju smrt neurona (73, 74).



**Slika 1.4.1.** Mehanizam nastanka senilnih plakova i neurofibrilarnih snopića. Procesiranjem APP-a nastaju topljivi  $\beta$ -amiloidi (1) koji se uklanjaju mehanizmima koji uključuju ApoE te astroците putem receptora lipoproteina male gustoće 1 (engl. *Low-density lipoprotein receptor-related protein 1* – LRP1) (2). Nagomilavanjem  $\beta$ -amiloida nastaju senilni plakovi (3) koji se mogu ukloniti endocitozom ili fagocitozom te endoproteazama astrocita – enzimom za razgradnju inzulina (engl. *insulin-degrading enzyme* – IDE), neprolizinom (engl. *neprolysin* – NEP) i metaloproteazom matriksa (engl. *matrix metalloprotease* – MMP) (4). Dio  $\beta$ -amiloida se ne može ukloniti te tako nagomilani nepovoljno utječu na sinapse (5) i potiču nakupljanje Tau neurofibrilarnih snopića unutar i izvan neurona (6). Neurofibrilarni snopići mogu biti uneseni u nezahvaćene neurone što uzrokuje njihovu smrt (7). Slika je preuzeta i prilagođena prema Masters, 2015 (75).

Treći protein uključen u AD je apolipoprotein E (ApoE). ApoE je uključen u metabolizam masti u tijelu te sudjeluje u prijenosu lipida, uključujući vitamine topive u mastima, lipoproteine te kolesterol putem limfnog i krvožilnog sustava. Sintetizira se u jetri no njegova je prisutnost utvrđena i u drugim tkivima – mozgu, bubrezima i slezeni (76). U središnjem su živčanom sustavu astroglija i mikroglija primarni izvori ApoE dok neuroni izražavaju receptore za ApoE (77). Kolesterol je u mozgu najvažniji tijekom razvoja i ozlijeda, a također sudjeluje u stvaranju sinapsi i njihovoj stabilnosti. Polimorfizmi sekvenci koje nadziru transkripciju ApoE povezani su sa sporadičnim slučajevima AD. Također je poznato da alel za ApoE  $\epsilon$ 4 predstavlja višestruko veći rizik za AD, a čak 50% pacijenata oboljelih od AD ispoljavaju taj alel (78).

### **1.5 Alzheimerova bolest i kronični stres**

Mnogo je hipoteza pokušalo objasniti opisane procese koji se odvijaju u AD – amiloidna kaskada, oštećenje mitohondrija, oksidativni stres, upalni procesi, mutacije specifičnih proteina, ozlijede, infekcije te brojne druge. S obzirom na heterogenost čimbenika koji sudjeluju u AD i slabu korelaciju između  $\beta$ -amiloidoze sa stupnjem kognitivnog propadanja u ranim stadijima još je uvijek teško odrediti najvažniji čimbenik otpočinjanja i napretka bolesti (79). Istraživanja posljednjih 20-ak godina povezuju pojavu AD sa životnim stilom, posebice utjecajem kroničnog stresa koji bi mogao pridonijeti ili čak biti okidač bolesti (80-82). Već je u američkih ratnih veterana primijećeno smanjeno pamćenje te kognitivno propadanje i smanjenje volumena hipokampusu uz smanjenu zastupljenost neuronskog biljega N-acetil aspartata u hipokampusu (83). Hipokampus je područje posebno bogato receptorima za glukokortikoide. Stoga promjena u koncentraciji glukokortikoida uslijed stresa može imati utjecaj na neurogenezu i kognitivne procese koji se odvijaju u hipokampusu odraslih. Osim u hipokampusu, najveća gustoća GR uočena je u kori mozga, amigdali i hipotalamusu. Preklapanje tih receptora s područjima koja su zahvaćena degeneracijom u AD moglo bi upućivati na njihovu moguću ulogu u nastanku ili progresiji bolesti. Drugo gledište koje povezuje stres i AD uključuje njegov utjecaj na nastanak  $\beta$ -amiloida i Tau plakova, glavnih obilježja te bolesti. U jednom istraživanju na miševima, glukokortikoidi su prouzročili povećanje količine APP-a te nakupljanje senilnih



plakova. Oba gena, *APP* i *BACE1* sadrže element odgovora na glukokortikoide (engl. *glucocorticoid responsive element*) u svojim sljedovima (84). U sličnom istraživanju kroničnog stresa na miševima, količina senilnih plakova nije povećana, no raznim je testovima utvrđena smanjena kognicija i pamćenje. Korištenjem prednizona, glukokortikoida koji se u klinici koristi za smanjenje upalnih procesa, dokazan je njegov ubrzan negativan utjecaj na kogniciju u pacijenata s AD. Iako mehanizam djelovanja prednizona u tom slučaju nije jasan, rezultati studije jasno pokazuju kako taj glukokortikoid negativno utječe na kognitivne funkcije u oboljelih (85). U istraživanju na *3xTg-AD* miševima koji razvijaju senilne plakove i fibrilarne snopiće, utvrđeno je povećanje Tau imunoreaktivnosti u hipokampusu, kori mozga te amigdali nakon terapije deksametazonom tijekom 7 dana (86). Povećanje koncentracije glukokortikoida farmakološki ili nakon izlaganja stresu moglo bi biti uzrokom slabljenja kognitivnih sposobnosti pacijenata s AD zbog povećanja senilnih plakova i fibrilarnih snopića, što je dosad dokazano u raznim životinjskim modelima. Osim toga, već je u nekoliko studija uočeno kako pacijenti oboljeli od AD imaju veće bazalne vrijednosti glukokortikoida. Može se zaključiti kako je osim starenja i genetičkih čimbenika, kronični stres važan čimbenik rizika za razvoj AD.

## 1.6 Stres i neurodegeneracija tijekom starenja

Starenje predstavlja izazov svim živim bićima, a procjenjuje se kako se stanične diobe i metabolizam neometano odvijaju samo do 25 godine života. Nakon tog razdoblja počinju se nakupljati nusprodukti metabolizma i staničnih oštećenja, a javlja se fenotip koji uključuje smanjeni kapacitet pluća, povećanje krvnog tlaka te smanjeni odgovor tijekom testa tolerancije na glukozu. Među bolestima starenja, najizraženije su neurodegenerativne bolesti zbog njihove nepovratnosti, nepostojanja prikladne terapije te socijalnog i ekonomskog tereta koji stvaraju društvu (87, 88). Na staničnoj razini, starenjem se povećava oksidacijski stres, smanjuje funkcija mitohondrija i regeneracija tkiva, skraćuju se telomere i nastaju poremećaji popravka DNA (89). Osim toga, nepovratno se gube nezamjenjive stanice, posebice u skeletnim mišićima, srcu i mozgu. Masa poprečno-prugastih mišića smanjuje se za polovicu do 80. godine života. Tada se

mišićne stanice zamjenjuju masnim stanicama i vezivnim tkivom, a to povećava nakupljanje spojeva topljivih u mastima (90-92). U mozgu se tijekom starenja broj neurona smanjuje i nastaju promjene sinaptičkih mreža. Gubitak neurona u područjima važnim za pamćenje i osobnost – hipokampusu i prednjoj kori mozga – doprinose raznim fiziološkim promjenama karakterističnim za stariju dob: promjeni metabolizma i cirkadijanog ritma te mentalnim i psihološkim odstupanjima (87). Starenje mozga uključuje i promjenu neurotransmiterskih sustava: smanjenje količine dopamina, noradrenalina, serotonina, aktivnosti tirozin-hidroksilaze te kolin-esteraze i povećanje aktivnosti monoamin-oksidge, što može biti ključno u razvoju psihijatrijskih poremećaja tijekom starenja (93). Oko 40% populacije iznad 65. godina starosti pokazuje neke oblike demencije za koje ne postoji uzrok. Takva se demencija smatra oštećenjem pamćenja uslijed starenja bez nekog posebnog uzroka i ne predstavlja značajan problem, za razliku od neurodegenerativnih bolesti, kao što je AD (94). Samo starenje pridonosi, no nije ključno za nastanak neurodegeneracije. Kronični stres ima snažan fiziološki utjecaj na organizam tijekom starenja zbog smanjene funkcije imunskog sustava te promjene metabolizma ugljikohidrata i lipida (95). Upale tijekom starenja povezuju se s aterosklerozom, osteoporozom, artritismom, dijabetesom tipa 2 (T2D) karcinomima i neurodegeneracijom (96-99), a promijenjeni metabolizam ugljikohidrata i lipida s metaboličkim sindromom i T2D (100). Mnogobrojnim je istraživanjima potvrđeno kako kronični stres ubrzava starenje, a najčešća su upravo istraživanja funkcije imunskog sustava te odgovora organizma na upale tijekom stresa. Primijećeno je kako se osobama koje su u starijoj dobi brinule za bolesnog partnera, što možemo smatrati snažnim stresorom, količina interleukina-6 – koji čini poznatu poveznicu s degenerativnim bolestima – povećala čak četiri puta (101). Stres i prilagodba stresu zahtijevaju brojne prilagodbe organizma uključujući hormonske i sustave neurotransmitera, antioksidanase i druge molekule, a tijekom starenja ta je prilagodba ograničena. Kombinacija kroničnog stresa i starenja mogla bi biti okidačem raznih patoloških stanja karakterističnih za stariju dob, uključujući i neurodegeneraciju.

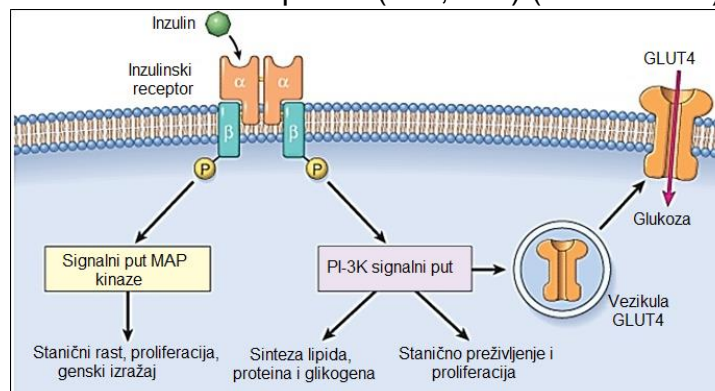
## 1.7 Spolna i dobna specifičnost u kroničnom stresu i neurodegeneraciji

U znanstvenim se istraživanjima često zanemaruje ženski spol i većina se istraživanja provodi na jedinkama muškoga spola uz ispriku kako bi hormonski ciklusi u žena mogli omesti interpretaciju rezultata. Poznato je kako mnoga patološka stanja pokazuju spolnu specifičnost pa čak i specifičnost u odgovoru na terapiju te se zbog toga ženski spol nikako ne bi smio zanemariti u biomedicinskim istraživanjima (102, 103). Pri suočavanju sa stresom, muškarci i žene pokazuju različite fiziološke odgovore. Smatra se kako žene općenito bolje podnose kronični stres od muškaraca, no samo do razdoblja menopauze kada se smanjuju koncentracije estrogena koji ima neuroprotektivnu ulogu (104-107). Estrogen smanjuje stresni odgovor u muškaraca i žena. Estrogen i progesteron proizvode se i nakon ovariektomije (menopauze) u nadbubrežnim žlijezdama, no nije poznato može li takva kompenzacija podnijeti dodatne izazove kao što je kronični stres. Do srednje dobi muškarci pod kroničnim stresom pokazuju veću anksioznost te smanjuju unos hrane i gube na masi, dok se u žena događa suprotno (108, 109). Kao što je opisano ranije, kronični stres nepovoljno djeluje na kogniciju, no spolna razlika takvih promjena nije detaljno istražena. Spolna i dobna specifičnost u neurodegenerativnim bolestima pokazuju važnost obaju čimbenika. Dok je starija dob karakteristična i logična za razvoj neurodegenerativnih bolesti s djelomično objašnjenim mogućim mehanizmima koji pokreću takvu degeneraciju, mehanizmi spolnih razlika slabo su razjašnjeni. U istraživanju spolnih razlika u neurodegenerativnim bolestima, smanjena neuroprotekcija u žena tijekom menopauze ističe se kao važan čimbenik (110). Utvrđeno je i kako je ApoE alel  $\epsilon 4$  – rizični čimbenik za AD – znatno češći u žena (111). Žene također češće doživljavaju moždani udar od muškaraca sa znatno duljim oporavkom (112). Poznato je i kako muškarci koji pate od depresije imaju značajno veći rizik za razvoj demencije, posebice AD (113). U liječenju AD primijećena je spolna specifičnost odgovora na terapiju kolinesterazom koja pokazuje 73% bolje rezultate u muškaraca nego u žena (114). Kao što je već spomenuto, žene čine  $\frac{3}{4}$  svih pacijenata oboljelih od AD (115). Nasuprot tomu, muškarci češće obolijevaju od Parkinsonove bolesti (PD) (116). Saznanja o molekularnim mehanizmima takvih spolno specifičnih razlika u raznim patologijama mogla bi utjecati na bolju i prikladniju terapiju pacijenata s obzirom na spol.

## 1.8. Inzulinski i leptinski receptor u kroničnom stresu, starenju i neurodegeneraciji

### 1.8.1 Inzulinski receptor – starenje, stres i neurodegeneracija

Signalni putovi koji preusmjeravaju korištenje energije počinju na membranskim receptorima i pod utjecajem stresa i starenja mogli bi objasniti dio mehanizama koji pokreću neurodegeneraciju. Metabolički značajni su inzulinski i leptinski signalni put.. Inzulin je polipeptid sastavljen od 2 lanca povezana disulfidnim vezama. Proizvode ga  $\beta$ -stanice gušterače u odgovoru na povišenu koncentraciju glukoze u krvi, a djeluje putem inzulinskog receptora (IR) (117, 118). IR pripada porodici receptorskih tirozin kinaza; sastoji se od dvije izvanstanične  $\alpha$ -podjedinice te dvije transmembranske  $\beta$ -podjedinice s unutarstaničnom aktivnošću tirozin-kinaza. Glavne ciljeve inzulina čine skeletni mišići, masno tkivo i jetra, iako inzulin djeluje na gotovo sve organe. U skeletnim mišićima, inzulin potiče ulazak glukoze u stanicu tako što potiče prijenos GLUT4 nosača glukoze iz Golgijeva aparata do stanične membrane. U jetri, inzulin potiče sintezu lipida, skladištenje triacilglicerola te inhibira glukoneogenezu. U masnom tkivu, inzulin smanjuje razgradnju lipida te izlazak masnih kiselina iz adipocita (119, 120) (slika 1.8.1.1).



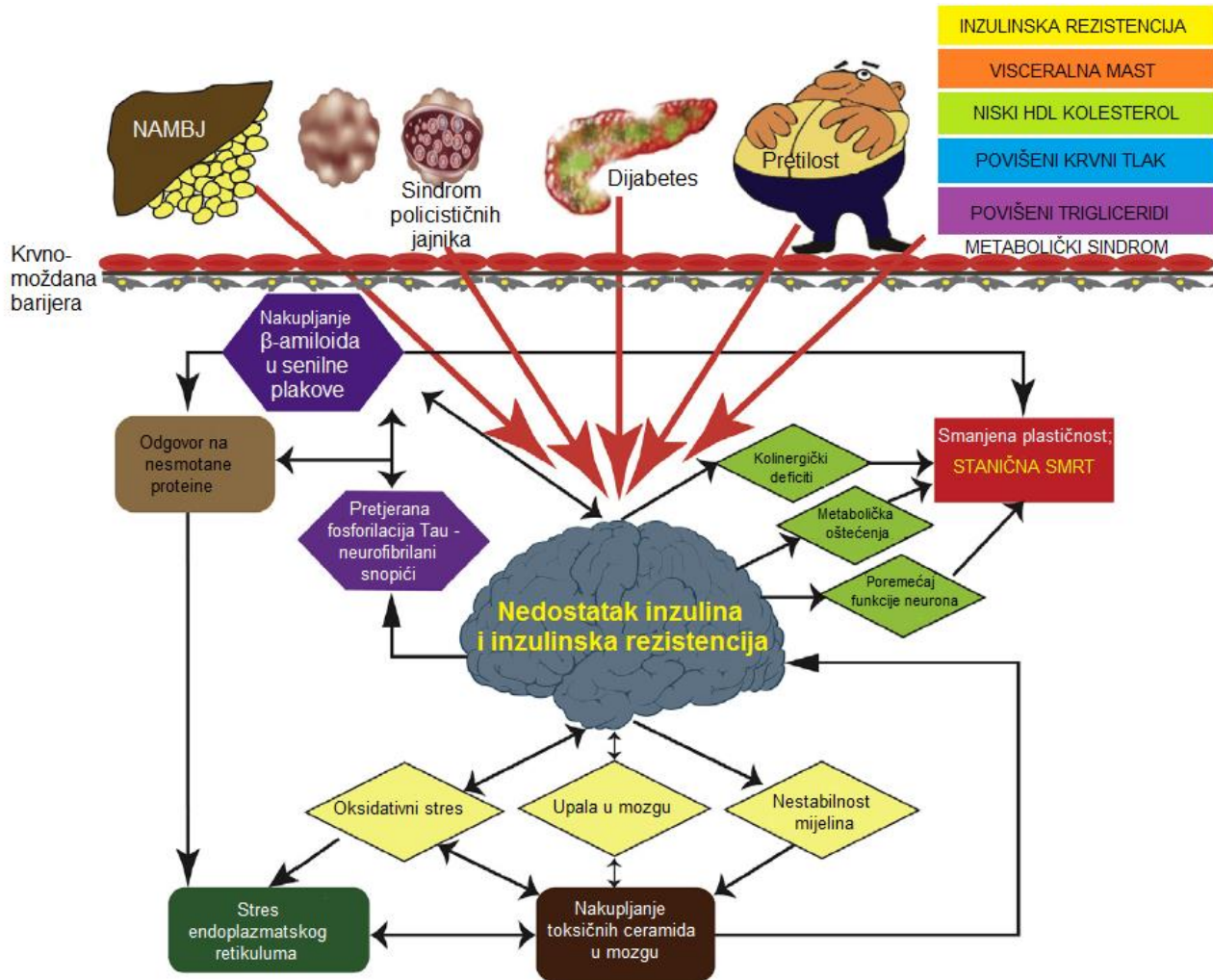
**Slika 1.8.1.1** Osnovne funkcije inzulinske signalizacije. Inzulin je u signalnom putu ligand koji se veže za svoj receptor na staničnoj membrani. Vezanjem dolazi do autofosforilacije tirozin-kinazama i aktivacije nizvodnog signalnog puta. U signalnom putu kinaze aktivirane mitogenom (engl. *mitogen activated kinase* – MAP) podešava se stanični rast, proliferacija i genski izražaj dok put fosfatidil-inozitol-4,5-bisfosfat-3-kinaze (engl. *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-3-kinase* – PI-3K) utječe na sintezu lipida, proteina i glikogena te stanično preživljavanje i proliferaciju. Slika je preuzeta i prilagođena prema Glogster, 2018 (121).

Inzulinska signalizacija u mozgu iznimno je važna radi održanja energetske homeostaze. Dostava inzulina do mozga vrši se na tri načina: vezanjem za inzulinske receptore, izravnim prelaskom inzulina kroz krvno-moždanu barijeru te sintezom inzulina u mozgu. (122) Inzulin i čimbenik rasta sličan inzulinu (engl. *insulin-like growth factor* – IGF) pokazali su se važnima za održanje neuronske plastičnosti, a u rezistenciji njihovih receptora ili nedostatku samih hormona, mijenja se energetski metabolizam stanica i nastaju kognitivni poremećaji (123, 124). Inzulinska rezistencija uključuje stanje visokih koncentracija inzulina u krvi, nefunkcionalnost IR te povećanje koncentracije glukoze u krvi (124). Tijekom početka 21 st. javili su se prvi dokazi o povezanosti kognitivnih oštećenja i neurodegeneracije s inzulinskom signalizacijom. Utvrđeno je kako 40% pacijenata s T2D razvije i AD tijekom života, a metabolički poremećaji u AD slični su onima u dijabetesu tipa 1 (T1D) i 2 (T2D) (tablica 1.8.1). Posljedice nastale zbog inzulinske rezistencije ili smanjenja količine inzulina nastaju radi smanjene signalizacije putevima koji stimuliraju rast, plastičnost i preživljenje stanica. Potpuni mehanizam takve rezistencije i nedostatka liganda još uvijek nisu razjašnjeni (125, 126).

**Tablica 1.8.1.1** Usporedba dijabetesa tipa 1 i 2 sa središnjim dijabetesom – nazvanim dijabetes tipa 3 (T3D). Preuzeto i prilagođeno prema de la Monte, 2014 (127).

<b>Usporedba T1D, T2D i T3D</b>			
<b>CILJNI UČINAK</b>	<b>T1D</b>	<b>T2D</b>	<b>T3D</b>
<b>INZULIN</b>	Smanjen	Povećan	Smanjen
<b>IR</b>	Nema učinka ili povećane aktivnosti	Smanjena aktivnost	Smanjen izražaj i aktivnost
<b>ISKORIŠTENJE GLUKOZE</b>	Smanjeno	Smanjeno	Smanjeno
<b>PRIMARNI CILJEVI</b>	Gušterača (i mozak)	Skeletni mišići, masno tkivo, krvne žile	Mozak – neuroni, bijela tvar
<b>SEKUNDARNI CILJEVI</b>	Mozak, mrežnica, krvne žile, bubrezi, koža, autonomni i periferni živci	Mozak, krvne žile, bubrezi, autonomni i periferni živci, mrežnica, koža	Središta sitosti u mozgu, povećana sklonost pretilosti

De La Monte i sur. 2014. su godine donijeli hipotezu kako dijabetes na periferiji tijela u konačnici može uzrokovati dijabetes mozga (slika 1.8.1.2), nazvan središnjim dijabetesom radi kojega se javlja neurodegeneracija i kognitivno propadanje.



**Slika 1.8.1.2.** Shema utjecaja sustave inzulinske rezistencije na inzulinsku/IGF rezistenciju u mozgu. U raznim se poremećajima nakupljaju kemijski spojevi koji potiču inzulinsku rezistenciju mozga – u T2D, nealkoholnom hepatitisu (NH), pretilosti, metaboličkom sindromu, poremećenom metabolizmu lipida javlja se oksidativni stres i povećanje toksičnih lipida – ceramida koji prelaze krvno moždanu barijeru. Mehanizmi inzulinske rezistencije mozga slični su onima u ostatku tijela i uključuju oksidativni stres, upalu, stres endoplazmatskog retikuluma, metabolička oštećenja, nakupljanje ceramida. Te promjene u mozgu dovode do smanjenja broja neurona, vlakana bijele tvari te poremećaja mijelina i sinaptičkih mreža, što uzrokuje poremećaje učenja i pamćenja. Slika je preuzeta i prilagođena prema de la Monte, 2014 (127).

Inzulinska rezistencija dovodi do poremećenog metabolizma lipida, upale, sinteze toksičnih lipida – ceramida, oksidativnog stresa i poremećaja funkcije endoplazmatskog retikuluma. AD dijeli mnogo obilježja s perifernom inzulinskom rezistencijom – smanjeni rast i preživljenje stanica radi smanjene inzulinske signalizacije, povećanje aktivacije citokina, poremećaj mitohondrija i energetskeg metabolizma (127).

U ranom stadiju AD također se često pojavljuje smanjenje iskorištenja glukoze u mozgu te se napretkom bolesti primjećuju metabolički poremećaji inzulinske signalizacije, promjena izražaja gena koji su pod nadzorom inzulina i poremećena proizvodnja energije. Iako senilni plakovi i fibrilarni snopići te mehanizmi njihova nastanka mogu djelomično objasniti uzroke nastanka AD, ne može se smatrati kako bolest nastaje samo radi ta dva čimbenika. Osim toga, pokazano je kako inzulinska signalizacija utječe na oba čimbenika (128). Inzulin potiče uklanjanje senilnih plakova i sprječava njihovo nakupljanje u izvanstaničnom prostoru, a sami  $\beta$ -amiloidi aktiviraju signalni put kinaza koje fosforiliraju N-kraj c-Jun-a (engl. *c-Jun N-terminal kinase* – JNK) uključenih u nadzor osjetljivosti stanica na inzulin (129).

Inzulin također utječe i na pretjeranu fosforilaciju serina i treonina Tau proteina, što je pokazano u studiji na primarnim kulturama kore mozga štakora kratkim tretmanom inzulinom dok duži tretman inzulinom u istih neurona izaziva suprotan učinak – smanjenu fosforilaciju (130). Povećanje i smanjenje fosforilacije praćeno je aktivnošću glikogen sintaze kinaze 3 beta (GSK-3b) koja je odgovorna za fosforilaciju Tau proteina, a njena je aktivnost podešena signalnim putevima fosfatidil-inozitol 3-kinaze (PI3-K) i protein-kinaze B (PKB) u kojima sudjeluje i inzulin te IR (131).

U nekoliko je studija na ljudima, pokazana pozitivna korelacija između kortizola i inzulinske rezistencije te metaboličkog sindroma (132, 133). Modulacija inzulinskog signalnog puta u odgovoru na kronični stres može se objasniti djelovanjem hormona otpuštenih tijekom stresnog odgovora – adrenokortikotropnog hormona te kortikosteroida (134, 135). Takvi su učinci stresa na inzulinsku signalizaciju uglavnom uočeni u perifernim organima, a sam mehanizam i učinak stresa na inzulinsku signalizaciju u mozgu nije u potpunosti razjašnjen.

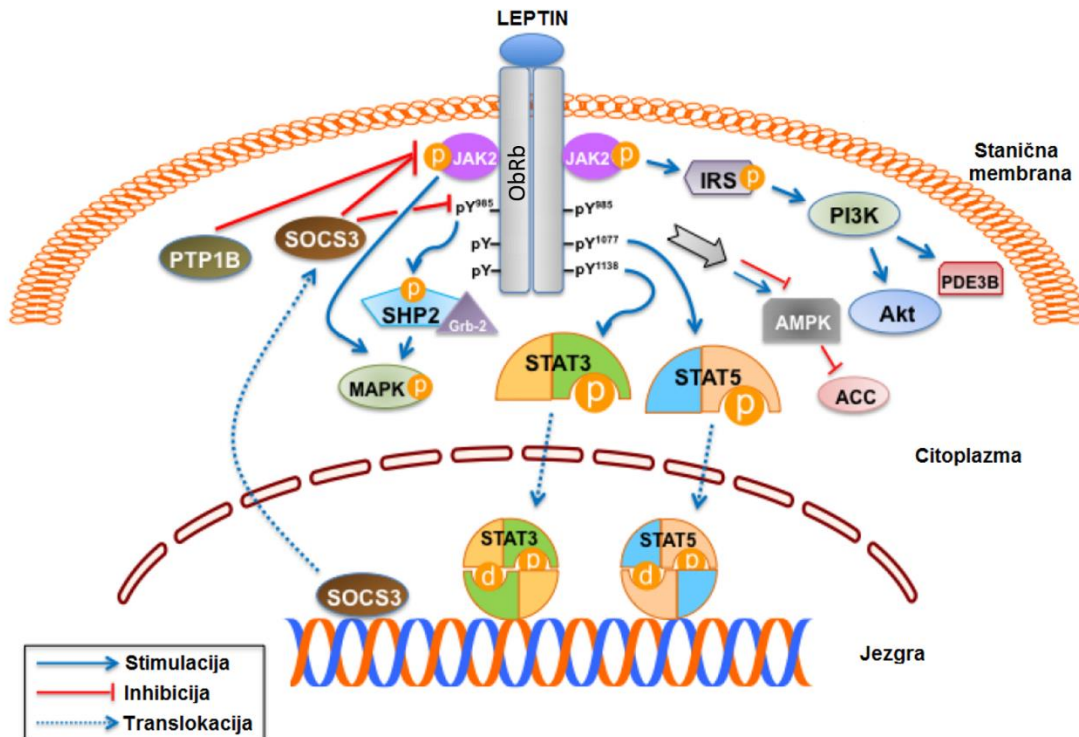
Inzulinska rezistencija povećava se starenjem te u kombinaciji sa životnim stilom uzrokuje T2D. U starijih je štakora primjećena smanjena fosforilacija IR te substrata inzulinskog receptora 1 (IRS-1) u jetri i skeletnim mišićima (136) te snažna inzulinska rezistencija u visceralnom masnom tkivu (137). Važan utjecaj na inzulinsku signalizaciju u mozgu čini razdoblje starenja kada se povećava upala uzrokovana nastankom produkata glikacije, oksidacija radi smanjene funkcije mitohondrija te proizvodnje vodikova peroksida (138).

### 1.8.2 Leptinski receptor – starenje, stres i neurodegeneracija

Leptin je hormon kojeg sintetizira masno tkivo i uzrokuje sitost. Njegova je koncentracija u krvi u korelaciji s količinom masnoga tkiva. Leptin šalje informaciju mozgu o količini dostupne energije, a uključen je i u podešavanje imunskog sustava te reprodukcije (139). Djeluje putem svog receptora (ObR) koji pripada obitelji citokinskih receptora tipa 1, a izgrađen je od 3 domene: izvanstanične, transmembranske i unutarstanične domene. Alternativnim prekrajanjem može nastati 6 izoformi (ObR a-f) koje imaju istu izvanstaničnu i transmembransku domenu no razlikuju se po unutarstaničnoj domeni. ObRb je najveći te pokreće signalizaciju Janus kinazom 2 (JAK2) i signalnim pojačivačem i aktivatorom transkripcije 3 (engl. *signal transducer and activator of transcription 3* – STAT3). Kratke izoforme a i c postoje u većini organizama, ObRd samo u miševa, a ObRf u štakora. Uloge kratkih izoformi nisu u potpunosti razjašnjene, no smatra se da dostavljaju leptin preko krvno-moždane barijere u mozak te sudjeluju u njegovoj internalizaciji. ObRb je izražen u mozgu, posebice u hipotalamusu, u područjima nadzora energetske stanja te u gotovo svim perifernim tkivima (140, 141). Kao i u slučaju inzulina i inzulinske rezistencije, slična rezistencija postoji i u leptinskoj signalizaciji. S obzirom da je količina leptina proporcionalna količini masnoga tkiva, očigledno je da signalizacija leptinom u pretilih osoba gubi svoj učinak. U leptinskoj je rezistenciji povećanje masnog tkiva nužno za održane hiperleptinemije – povećana tjelesna masa i količina masnog tkiva postaju novo homeostazno stanje. Gubitkom masnog tkiva u pretilih se osoba javlja mehanizam nadoknade izgubljenog masnog tkiva koji uključuje povećani apetit te metaboličku učinkovitost, a može se utišati ponovnom uspostavom koncentracije leptina ukoliko se njegove koncentracije u krvi povrate na one u stanju pretilosti (142, 143). Upala je također

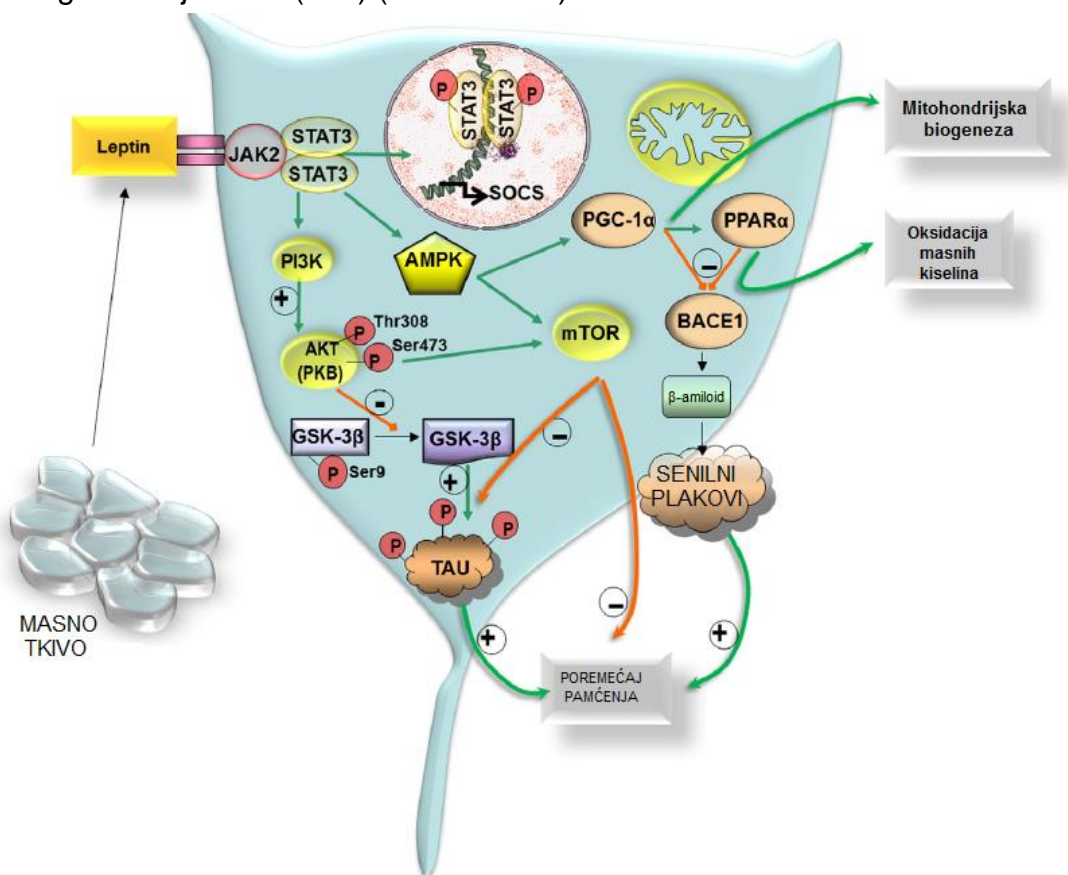


jedan od mehanizama koji potiče leptinsku rezistenciju, a posebice je karakteristična za hipotalamus u kojemu se smanjuje signalizacija leptinom u neuronima područja odgovornih za sitost i hranjenje (144). Jedan od najpoznatijih signalnih puteva leptina – Janus kinaza 2/signalni prijenosnik i aktivator transkripcije 3 (JAK2/STAT3) započinje aktivacijom ObR-a (slika 1.8.2.1).



**Slika 1.8.2.1.** Vežanje leptina za ObRb uzrokuje dimerizaciju receptora i nastanka kompleksa ObRb/JAK2. Aktivirana JAK2 autofosforilira, ali također fosforilira i nekoliko tirozinskih ostataka na ObRb-u. STAT3 i STAT5 vežu se za fosforilirane tirozinske ostatke te i oni bivaju fosforilirani. Aktivni dimeri – STAT3 i STAT5 prenose se u jezgru gdje potiču transkripciju ciljnih gena i uzrokuju promjenu ponašanja vezanog uz hranjenje – sitost. SOCS3 čini glavni cilj STAT3. SOCS3 inhibira JAK2/STAT signalizaciju interakcijom s određenim tirozinskim ostatkom (Tyr985) ili JAK2 te ima ulogu negativne povratne sprege leptinske signalizacije. Protein tirozin fosfataza 1B (PTP1B) također inhibira leptinsku signalizaciju putem defosforilacije JAK2. Nakon aktivacije JAK2, protein koji sadrži SH2 domenu (engl. *SH2-containing protein tyrosine phosphatase 2* – SH2P2) veže se za fosforilirani tirozin 985 i aktivira receptor adaptorskog proteina čimbenika rasta 2 (engl. *adaptor protein growth factor receptor- bound protein 2* – Grb2) što aktivira signalnu kaskadu MAP puta. Slika je preuzeta i prilagođena prema Park, 2004 (145).

STAT3 je transkripcijski čimbenik koji se nakon fosforilacije dimerizira i prenosi u jezgru gdje nadzire transkripciju ciljnih gena. Supresor citokinske signalizacije 3 (engl. *supressor of cytokine signaling 3* – SOCS3) i tirozin fosfataza 1 $\beta$  inhibiraju aktivnost ObRb. Ključni su efektori nizvodnih signalnih puteva leptina i kinaza aktivirana s AMP (AMPK), peroksisomni receptor aktiviran proliferacijom (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor* – PPAR) te BACE1. Jedan je od ciljeva leptinske signalizacije i kinaza koja fosforilira Tau protein – cilj rampamicina (mTOR). Oko 50% osoba s niskim koncentracijama leptina također su i nosioci APOE  $\epsilon$ 4 alela, što čini još jednu poveznicu leptinske signalizacije s AD (146) (slika 1.8.2.2).



**Slika 1.8.2.2.** Leptinska signalizacija u hipokampusu. Leptin aktivira PI-3K/Akt, JAK2/STAT te AMK/SIRT signalne putove i njima potiče preživljavanje neurona, smanjuje izražaj BACE1 čime smanjuje sintezu  $\beta$ -amiloida te potiče njihovo uklanjanje iz mozga. Leptinska signalizacija također smanjuje fosforilaciju Tau proteina. Vezanje leptina za ObR potiče fosforilaciju STAT3 što aktivira transkripciju ciljnih gena iz obitelji SOCS. Osim toga, leptin inhibira pretjeranu fosforilaciju Tau proteina PI-3K i AKT signalnim putevima i potiče nastanak inaktivnog oblika ser-9-GSK3- $\beta$ . Slika je preuzeta i prilagođena prema Folch, 2015 (147).

Leptin potiče neurogenezu i stabilizira sinapse te olakšava učenje. Takva regulacija opada starenjem, a pacijenti oboljeli od AD pokazuju niske koncentracije leptina u krvi. Terapija leptinom u pacijenata s AD pozitivno utječe na učenje i pamćenje, a mehanizam je uočen i u *in vitro* staničnim kulturama primarnih neurona u kojima tretman leptinom smanjuje nakupljanje  $\beta$ -amiloida mehanizmom koji nije u potpunosti poznat (148, 149).

Malobrojna su istraživanja koja povezuju kronični stres i leptinsku signalizaciju, no uglavnom su vezana uz utjecaj kroničnog stresa i pretilosti, posebice u žena tijekom menopauze (150). Koncentracija leptina u krvi je spolno specifična, pri čemu je veća u ženki nego u mušjaka, a poznato je i da se tijekom starenja smanjuje (151).

### **1.8.3 Spolna specifičnost i poveznice inzulinskog i leptinskog signalnog puta**

Spolna specifičnost inzulinskog i leptinskog signalnog puta – posebice u odgovoru na kronični stres – nije dovoljno istražena. U studiji kroničnog stresa na ovariektomiziranim štakoricama, naš je tim pokazao kako kronični stres povećava izražaj IR-a u područjima zahvaćenima neurodegeneracijom u AD (hipokampus te *substantia nigra*). U istoj je studiji pokazano kako ovariektomija pogoršava utjecaj kroničnog stresa na mozak radi smanjenja odgovora neuroprotektivnih spolnih hormona, a također uzrokuje i povećani izražaj ObR u hipotalamičkim središtima odgovornima za sitost i ponašanje usmjereno hranjenju (152).

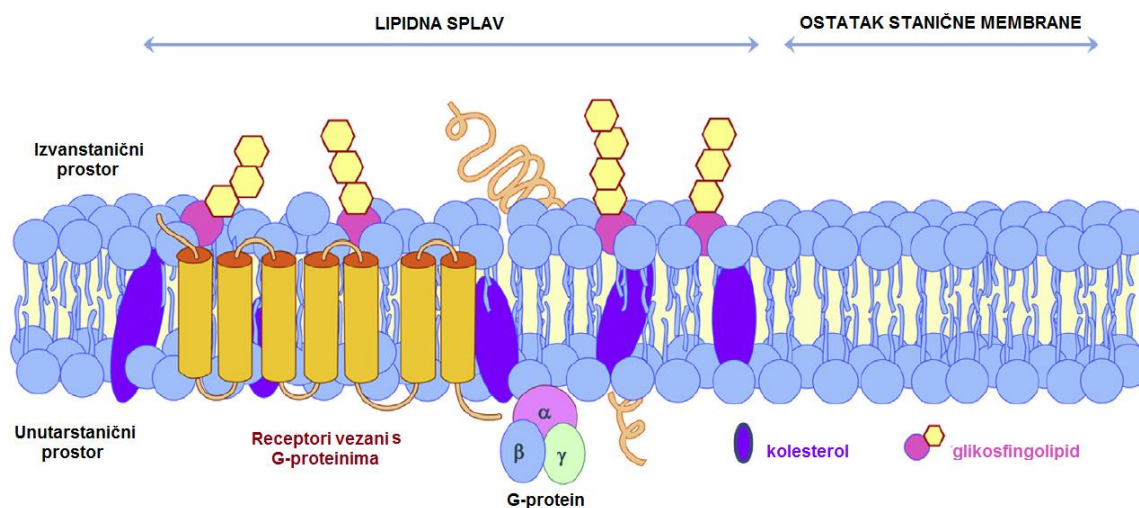
Oba su puta – inzulinski i leptinski – povezana s nadzodom energetskeg metabolizma stanica. Inzulin izravno stimulira otpuštanje leptina iz masnog tkiva, a leptin povratnom spregom smanjuje otpuštanje inzulina i izražaj njegova gena podešavanjem kalijevih ATP kanala koji detektiraju metaboličke promjene u  $\beta$ -stanicama, aktivacijom nukleotid fosfodiesteraze 3B – važnog regulatora koncentracija drugih glasnika AMP-a i cGMP-a u stanicama, te posljedičnog smanjenja količine cAMP-a. Hipokampus je bogat s obje vrste receptora – IR te ObR kao i ključnim dijelovima potrebnima za njihovu signalizaciju

### 1.9. Lipidne splavi – neurodegeneracija, starenje i stres

Tijekom više od 30 godina, Sangerov i Nicholsonov model tekućeg mozaika opisao je staničnu membranu kao more sačinjeno od lipida u kojemu plutaju membranski proteini. Ipak je ustanovljeno kako postoji struktura unutar mora lipida koja utječe na organizaciju i raspodjelu proteina u fosfolipidnom dvosloju (153). Lipidne su splavi uređena područja stanične membrane izgrađena od kolesterola, sfingomijelina, glikosfingolipida i odabranih proteina koji sudjeluju u signalnim i drugim procesima. Fosfolipidi lipidnih splavi sadrže više zasićenih ostataka masnih kiselina od onih izvan lipidnih splavi (154). Zbog velikog sadržaja kolesterola lipidne su splavi manje fluidne od ostatka stanične membrane i radi toga su otporne na otapanje deterdžentima (155, 156) (slika 1.9.1). Najmanje 10% transmembranskih proteina ovisi o glikosfingolipidima, posebice gangliozidima, koji osiguravaju njihovu pravilnu strukturu, prijenos u ciljne membrane i funkciju (156). Gangliozidi pripadaju obitelji glikosfingolipida koji sadrže sijalinsku kiselinu, najčešće N-acetilneuraminsku kiselinu. Karakteristični omjeri različitih gangliozida nalaze se u membranama, posebice lipidnim splavima, svih tkiva, ali posebno ih je mnogo u središnjem živčanom sustavu. Izgrađeni su od ugljikohidratnog lanca na koji je vezan ceramid – sastavljen od sfingozidne baze i dugolančane masne kiseline. Sfingoidne baze su najčešće dihidroksi- ili trihidroksi- dugolančani, zasićeni ili nezasićeni aminoalkoholi. Najčešće sadrže 18 do 20 C atoma i utječu na povećanje bočne organizacije odnosno promjenu položaja proteina iz lipidnih splavi u ostatak stanične membrane i obrnuto. Sastav membrane i njena okolina izravno utječu na funkciju i položaj membranskih proteina, a bočna je organizacija od ključne važnosti za njihovu funkciju (157).

Lipidne se splavi mogu smatrati domenama ključnim za signalizaciju mnogobrojnim proteinima pa se lipidne splavi često naziva i signalosomima (158). Promjene u sastavu glikosfingolipida uzrokuju fino ugađanje kritičnih fizioloških procesa kao što su stanična adhezija, signalizacija, stvaranje barijera, stanična migracija, vezikularni prijenos te apoptoza. Iako su već uočene promjene sastava gangliozida u lipidnim splavima u AD i PD, mehanizam koji tu promjenu uzrokuje i dalje je nepoznat (159, 160). Mnogi proteini uključeni u AD smješteni su upravo u lipidnim splavima – APP, BACE1, a neki proteini važni za neuroprotekciju i stabilizaciju sinapsi također se nalaze u lipidnim splavima ili

stupaju u interakciju s njima – estrogenski receptor koji pripada porodici steroidnih receptora te neuroplastin, protein koji pripada obitelji imunoglobulina – važan za regulaciju sinaptičke plastičnosti, a pod nadzorom je HPA osi (107, 160-162).



**Slika 1.9.1.** Shematski prikaz građe lipidnih splavi. Lipidne su splavi organizirani dio stanične membrane bogati fosfolipidima, glikolipidima te kolesterolom. Čine osnovu signalizacije G-proteinima. Slika je preuzeta i prilagođena prema Villar, 2016 (163).

Signalni putovi koji preusmjeravaju korištenje energije počinju na membranskim receptorima koji za svoju aktivaciju trebaju ispravno lipidno okruženje. ObR i IR u perifernim su tkivima smješteni u lipidnim splavima. Smještaj tih receptora unutar ili izvan lipidnih splavi u mozgu nije u potpunosti razjašnjen pa tako postoje oprečni nalazi o njihovoj lokaciji (164-166). Za takvo su nesuglasje odgovorne i mnogobrojne metode izolacije lipidnih splavi koje koriste različite deterdžente za odvajanje lipidnih splavi, a neki od detergenata mogli bi uzrokovati izmještanje određenog niza proteina iz njihova prirodnog okoliša i na taj način pridonijeti pogrešnoj interpretaciji dobivenih rezultata (156, 167-169). Pokazano je kako često korišteni deterdžent u takvim metodama, Triton-X100 uzrokuje upravo takvo premještanje gangliosida, a vjerojatno i određenog niza proteina u imunohistokemijskom bojanju tkiva mozga korištenjem toga deterdženta (170, 171). Izolacija lipidnih splavi doktorske disertacije koristi blagi deterdžent Brij 98 koji ne uzrokuje takvu preraspodijelu proteina.

Smatra se kako IR koji se nalazi u okruženju u kojemu je mali udio gangliozida GM3 fosforilira i aktivira nizvodne signalne molekule, dok okruženje s većim udjelom GM3 razdvaja receptor od nizvodnih molekula i dovodi do tzv. inzulinske rezistencije. Osim toga, čini se kako IR potiče nastanak  $\beta$ -amiloida uzrokujući nakupljanje GM1 gangliozida u presinaptičkoj membrani (172). Koncentracija gangliozida GD1a također je povećana u mozgu (u svim područja osim kore maloga mozga) AD pacijenata no pokreće li takvo nakupljanje neurodegeneraciju i kojim mehanizmom i dalje je nepoznato (173). Leptinski se receptor nalazi unutar lipidnih splavi, no do sada je analiziran uglavnom u perifernim tkivima te staničnim kulturama hepatocita tako da njegova lokacija unutar ili izvan lipidnih splavi u mozgu i dalje ostaje nerazjašnjena (166). Kao što je već spomenuto, leptin pokazuje učinak na  $\beta$ -amiloidne suprotan inzulinu – u staničnim kulturama primarnih neurona modela za AD – leptin smanjuje njihovu količinu izlučenu iz stanica u medij. Taj je učinak praćen s promjenom lipidnog sastava lipidnih splavi u kojima se nalazi BACE1, a smatra se kako nastale promjene uzrokovane leptinom utječu na aktivnost spomenutog enzima (148).

Promjene sastava lipidnih splavi tijekom starenja, poput manje zastupljenosti dugolančanih višestruko nezasićenih masnih kiselina u sastavu membranskih lipida i nakupljanja gangliozida GM1 potiču amiloidogenezu te su rani pokazatelj neurodegenerativnih poremećaja (174, 175). Mehanizmi kojima promjene u sastavu lipidnih splavi utječu na održavanje stanica, krivo usmjeravanje diferencijacije i smrt stanica, još uvijek nisu poznati. Neki od predloženih mehanizama su: odvajanje aktivnog od neaktivnog oblika istog proteina u različite domene membrane (kao u slučaju inzulinske rezistencije), smanjen membranski izražaj proteina koji migriraju zajedno s određenim glikolipidima, promjene u vezikularnom prometu, interakciji lipidnih splavi i citoskeleta te sinaptičkom prijenosu.

Promjene sastava lipidnih splavi pod utjecajem glukokortikoida slabo su poznate. Ustanovljeno je kako glukokortikoidi utječu na aktivaciju mišjih T stanica putem interakcija s lipidnim splavima no učinak na lipidne splavi u cjelokupnom organizmu ili pojedinim organima nije poznat (176).

## 2. HIPOTEZA

## HIPOTEZA

Hipoteza opisane disertacije je da starenje i kronični stres dovode do promjena sastava lipidnih splavi mozga što utječe na smještaj i funkciju inzulinskog i leptinskog receptora koji su uključeni u regulaciju energetskeg metabolizma stanica. Nepovratne promjene lipidnog sastava membrane povezane su s nizvodnim signalnim mehanizmima inzulinskog i leptinskog receptora i predstavljaju moguću podlogu za razvoj receptorske rezistencije i okidanje mehanizama neurodegeneracije.



### 3. CILJEVI RADA

### 3.1 Opći cilj

Opći je cilj disertacije utvrditi povezanost promjena sastava lipidnih splavi s kroničnim stresom i starenjem na modelu Spragu Dawley štakora

### 3.2 SPECIFIČNI CILJEVI

Specifični su ciljevi disertacije:

1. Odrediti imunohistokemijske biljege neuroprotekcije i neurodegeneracije u mozgu mužjaka i ženki Sprague Dawley štakora starosti 6 te 14,5 mjeseci nakon što su bili izloženi kroničnom ili "sham" stresu.
2. Izolirati lipidne splavi mozga (hipokampus i mali mozak) te ih karakterizirati s obzirom na prisutnost markera lipidnih splavi ili neuređenog stanja membrane.
3. Utvrditi lipidni sastav lipidnih splavi i raspodjelu inzulinskog i leptinskog receptora u mozgu (hipokampus, mali mozak)
4. Usporediti aktivaciju nizvodnih molekula u mozgu mladih i starih životinja izloženih kroničnom i "sham" stresu.

## 4. MATERIЈAL I METODE

## 4.1 Materijal

### 4.1.1 Financiranje

Studija je dio projekta Hrvatske zaklade za znanost naziva "Patofiziološke posljedice promjene sastava lipidnih splavi". Potporu dijelu studije koja je izvedena u Szegedu pružila je Organizacija za međunarodne projekte istraživačkog i inovacijskog programa u medicini medicinskog centra Cedars-Sinai i Udruženja za regionalnu suradnju u zdravstvu, znanosti i tehnologiji (*RECOOP HST Association*), a ERASMUS KA1 programom financiran je jedan odlazak u Szeged i La Lagunu.

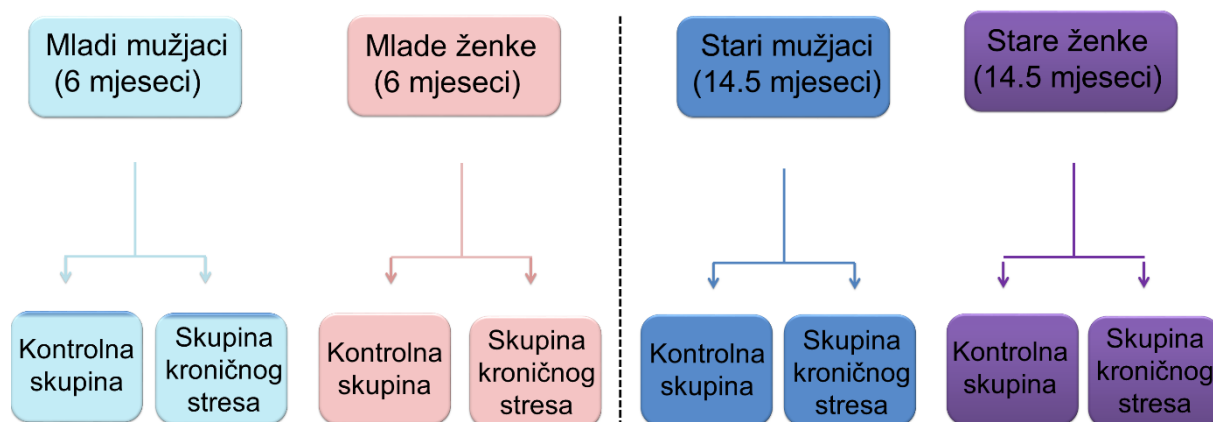
### 4.1.2 Pokusne životinje – opće informacije i dobrobit

U studiji je korišteno moždano tkivo štakora Sprague Dawley-CR soja (Charles River, Wilmington, MA, SAD). Ukupno je korišteno 80 životinja, od toga: 20 mužjaka i 20 ženki štakora starosti 3.5 mjeseci iz vlastitog uzgoja (Vivarij Medicinskog fakulteta u Osijeku, broj odobrenja Vivarija: HR-POK-005) te 20 mužjaka i 20 ženki starosti 12 mjeseci u suradnji sa Sveučilištem u Szegedu, Mađarska, uzgoj na Odjelu za farmakodinamiku i biofarmaciju, u trajanju od svibnja 2016. godine do prosinca 2016. godine, također soj Sprague Dawley-CR. Pokusi na mladim životinjama i pokusi na starijim životinjama, smatraju se dvjema odvojenim studijama i iako su provedene na isti način međusobno nisu statistički uspoređivane. U studiju je bilo uključeno 8 skupina životinja s po 10 životinja u svakoj skupini (slika 4.1.2.1). Studija je odobrena od strane etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Osijeku, Ministarstva Poljoprivrede Republike Hrvatske – klasa: 602-04/14-08/06, broj: 2158-61-07-14-118 te odgovarajućeg etičkog povjerenstva u Mađarskoj – broj: CSI/01/3796-7/2015. Obučena sam za rad s pokusnim životinjama tečajem koji je jednakovrijedan FELASA tečaju (engl. *Federation for Laboratory Animal Science Associations*), C kategorija, broj odobrenja: TPŽ 05/14. Pokusne su životinje korištene u studiji sukladno direktivi Eropske Unije o dobrobiti pokusnih životinja (2010/63).

Štakori su bili smješteni u samoventilirajućim kavezima uz stalnu kontrolu temperature i pet izmjena zraka u minuti te stalnoj vlažnosti od 40-60% (sustav THF3364 EHRET, Feriburg, Njemačka). U svakom je kavezu bilo najviše 3 životinje (u slučaju mladih

pokusnih skupina), a najmanje 2 (u slučaju starijih pokusnih skupina). Standardizirana hrana za pokusne štakore te voda bili su stalno dostupni (Hrana za štakore – Mucedola, Milano, Italija; u slučaju štakora u studiji korištena je hrana kataloškog broja 4RF21 – *MICE and RATS Maintenance for Short and Middle Period*, a tijekom njihova uzgoja korištena je hrana kataloškog broja 4RF25 istog proizvođača – *MICE and RATS Reproduction, Weaning and Growth*). Iznimku *ad libitum* hranjenja čini skupina životinja izloženih kroničnom stresu kojoj je hrana bila nedostupna 12-14 sati prije izvođenja testa tolerancije na glukozu te 3-4 sata prije izvođenja testa tolerancije na inzulin. U pokusnoj je prostoriji ciklus dana trajao od 7.00 h do 19.00 h pri temperaturi prostorije od 20-25 °C.

U disertaciji je primijenjeno 3R načelo (engl. *replacement, reduction, refinement* – zamjena, smanjenje i poboljšanje). Kao što i samo ime govori 3R pristup ujedinjuje 3 glavna načela rada s pokusnim životinjama: zamjenu, smanjenje i poboljšanje.



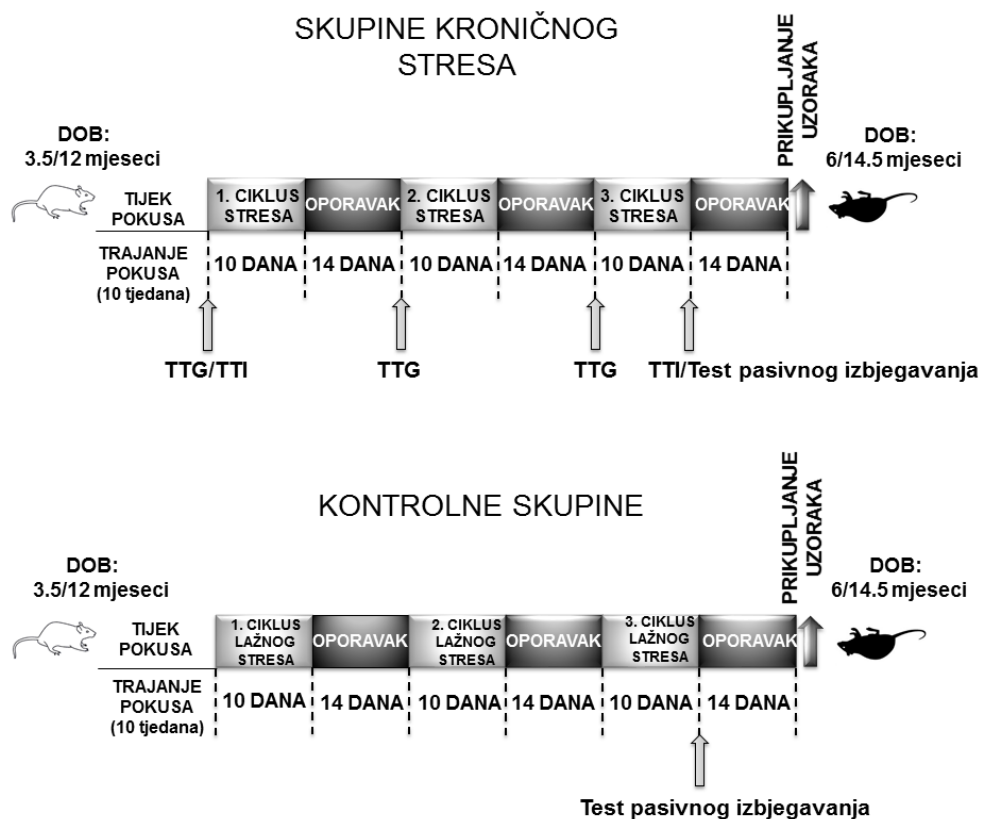
**Slika 4.1.2.1.** Shematski prikaz podjele istraživanih skupina životinja.

Dva puta dnevno praćena je bol i patnja životinja prema skali grimasa prilagođenoj štakorima (177). Praćene su grimase rangirane u 3 stupnja bolnosti: 1. bolnost očigledno nije prisutna, 2. bolnost je blago prisutna i 3. bolnost je očigledno prisutna. Prema skali se u slučaju pretjerane boli i patnje životinja, one odmah eutanaziraju, no u opisanoj studiji nije bilo potrebe za takvim radnjama. Tijekom postupka uzorkovanja krvi iz jezične vene korištena je anestezija, a tijekom žrtvovanja je uz anesteziju korištena i odgovarajuća analgezija. Broj životinja po skupini određen je statističkim proračunom testa jakosti studije, a korišteni su podaci prethodne pilot-studije. Od ukupno 80 korištenih životinja

tijekom studije uginula su 3 štakora tijekom izvođenja testova tolerancije na glukozu i inzulin.

#### 4.1.3 Tijek pokusa

Pokus je ukupno trajao 10 tjedana (slika 4.1.3.1). Izlaganje kroničnom stresu izvedeno je u 3 ponavljanja sa stankom od 2 tjedna između svakog.



**Slika 4.1.3.1.** Shematski prikaz tijeka pokusa. U skupinama kroničnog stresa provedeni su testovi tolerancije na glukozu (TTG) i inzulin (TTI) kako je označeno na shemi. U svim je skupinama na kraju 3. ciklusa kroničnog i lažnog stresa proveden bihevioralni test pasivnog izbjegavanja (engl. *Passive avoidance*).

Izlaganje stresu u skupini mlađih životinja započelo je s navršena 3.5 mjeseca, a u skupini starijih životinja izlaganje stresu započelo je s navršenih 12 mjeseci starosti. Zadnje ponavljanje kroničnog stresa trajalo je do navršenih 5 i pol mjeseci odnosno 14 mjeseci.

Nakon toga, životinje nisu bile izložene stresorima 14 dana, odnosno, do žrtvovanja. Cilj studije bio je pratiti dugotrajne i nepovratne promjene pa je zato ostavljen dovoljan odmak od izlaganja i oporavka od posljednjeg primijenjenog stresora. S obzirom da u istraživanju kroničnog stresa ne postoji jedinstveni, reproducibilni životinjski model, naš je istraživački tim osmislio vlastiti protokol koji je razvijen tijekom nekoliko godina testiranja, a rezultirao je objavom četiri znanstvena članka (152, 178-180). Korišteni su fizički i psihološki stresori koji utječu na sve organske sustave (tablica 4.1.3.1, slika 4.1.3.2), a kako bi se izbjegao specifični odgovor na stres, svaki dan protokola udružena su dva stresora istodobno (tablica 4.1.3.2). Neki su od stresora ponovljeni dva puta u jednom ciklusu. U kontrolnoj je skupini izveden *sham* odnosno lažni stres koji je uključivao isti okoliš kao i u ispitivanoj skupini no bez prisutnih stresora. Na taj je način stresni učinak okoliša te rukovanja sa životinjama bio ujednačen u svim skupinama životinja.

**Tablica 4.1.3.1.** Popis korištenih stresora u protokolu kroničnog stresa

Br.	Stresor
1	Izlaganje svjetlu tijekom noći (12 sati)
2	Boravak kaveza sa štakorima na laboratorijskoj tresilici tijekom 40 minuta
3	Izlaganje zvukovima alarma mobilnog uređaja preko noći (12 sati)
4	Prisilno plivanje štakora u hladnoj vodi (12 do 14 °C) u trajanju od 3 minute
5	Imobilizacija štakora u metalnim tuljcima
6	Izlaganje hladnoći (4 do 8°C) tijekom 1 sata
7	Test tolerancije na glukozu (TTG)
8	Test tolerancije na inzulin (TTI)
9	Gladovanje prije testova tolerancije na inzulin (3 do 4 sata prije testa) i glukozu (12-14 sati prije testa)



**Slika 4.1.3.2.** Primjer korištenih stresora u u kontrolnim skupinama – izvođenje lažnog stresa plivanja i imobilizacije (gore i dolje lijevo) u kontrolnim skupinama te u skupinama kroničnog stresa (gore i dolje desno). Izvorna slika.

**Tablica 4.1.3.2.** Protokol svakog od 3 ciklusa kroničnog stresa

Protokol 1. ciklusa kroničnog stresa	
Dan	Stresori
1	Gladovanje i TTI
2	Oporavak od TTI, gladovanje preko noći prije TTG
3	TTG
4	Boravak kaveza sa štakorima na laboratorijskoj tresilici tijekom 40 minuta i Izlaganje svjetlu tijekom noći (12 sati)
5	Izlaganje svjetlu i zvukovima alarma mobilnog uređaja tijekom noći (12 sati)
6	Prisilno plivanje štakora u hladnoj vodi (12 do 14 °C) u trajanju od 3 minute
7	Imobilizacija štakora u metalnim tuljcima te izlaganje hladnoći (4 do 8°C) tijekom 1 sata
8	Izlaganje svjetlu i zvukovima alarma mobilnog uređaja tijekom noći (12 sati)
9	Prisilno plivanje štakora u hladnoj vodi (12 do 14 °C) u trajanju od 3 minute
10	Imobilizacija štakora u metalnim tuljcima te izlaganje hladnoći (4 do 8°C) tijekom 1 sata

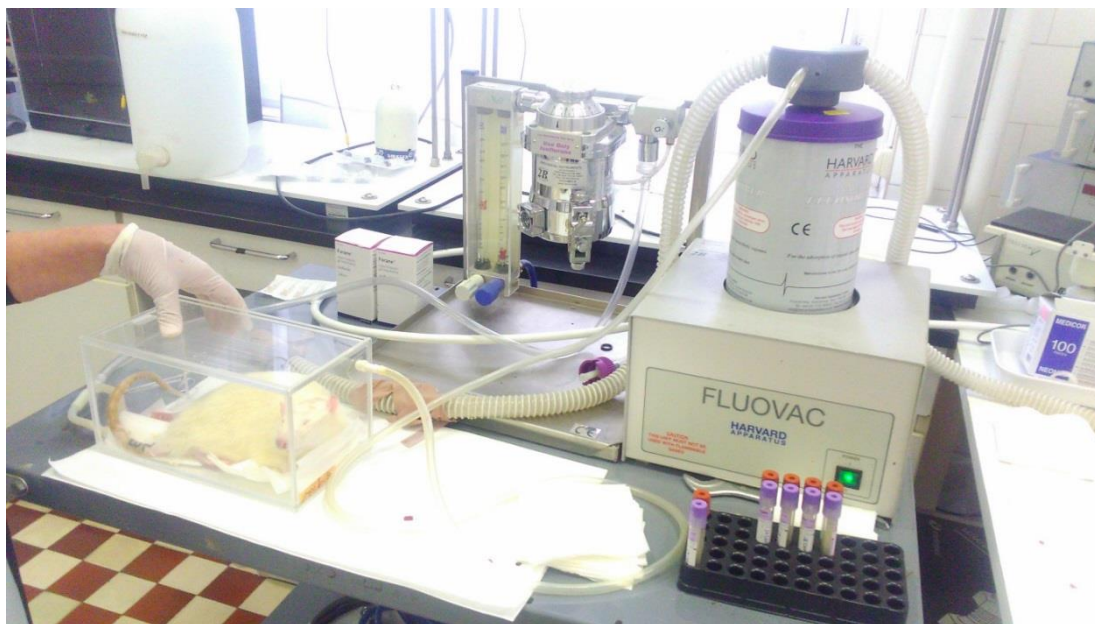


<b>Protokol 2. ciklusa kroničnog stresa</b>	
<b>Dan</b>	<b>Stresori</b>
<b>1</b>	Gladovanje i izlaganje svjetlu tijekom noći (12-14 sati)
<b>2</b>	TTG
<b>3</b>	Imobilizacija štakora u metalnim tuljcima te izlaganje hladnoći (4 do 8°C) tijekom 1 sata
<b>4</b>	Izlaganje svjetlu i zvukovima alarma mobitela tijekom noći (12 sati)
<b>5</b>	Prisilno plivanje štakora u hladnoj vodi (12 do 14 °C) u trajanju od 3 minute
<b>6</b>	Izlaganje svjetlu i zvukovima alarma mobitela uređaja tijekom noći (12 sati)
<b>7</b>	Boravak kaveza sa štakorima na laboratorijskoj tresilici tijekom 40 minuta i izlaganje svjetlu tijekom noći (12 sati)
<b>9</b>	Prisilno plivanje štakora u hladnoj vodi (12 do 14 °C) u trajanju od 3 minute
<b>10</b>	Imobilizacija štakora u metalnim tuljcima uz izlaganje hladnoći (4 do 8°C), 1 sata

<b>Protokol 3. ciklusa kroničnog stresa</b>	
<b>Dan</b>	<b>Stresori</b>
<b>1</b>	Gladovanje i izlaganje svjetlu tijekom noći (12 sati)
<b>2</b>	TTG
<b>3</b>	Imobilizacija štakora u metalnim tuljcima te izlaganje hladnoći (4 do 8°C) tijekom 1h
<b>4</b>	Prisilno plivanje štakora u hladnoj vodi (12 do 14 °C) u trajanju od 3 minute
<b>5</b>	Izlaganje svjetlu i zvukovima alarma mobilnog uređaja tijekom noći (12 sati)
<b>6</b>	Boravak kaveza sa štakorima na laboratorijskoj tresilici tijekom 40 minuta i izlaganje svjetlu tijekom noći (12 sati)
<b>7</b>	Prisilno plivanje štakora u hladnoj vodi (12 do 14 °C) u trajanju od 3 minute
<b>8</b>	Imobilizacija štakora u metalnim tuljcima te izlaganje hladnoći (4 do 8°C) tijekom 1 sata
<b>9</b>	Boravak kaveza sa štakorima na laboratorijskoj tresilici tijekom 40 minuta i izlaganje svjetlu tijekom noći (12 sati)
<b>10</b>	Gladovanje (tijekom 3-4 sata) i TTI

#### 4.1.4 Prikupljanje uzoraka za analizu

Prije žrtvovanja, sve su životinje podvrgnute gladovanju od 2 sata kako bi se mogle analizirati bazalne razine svih mjerenih parametara, posebice steroidnih hormona u serumu. Životinje su žrtvovane korištenjem plinske anestezije izofluranom u smrtonosnoj dozi (Forane® isofluranum, Abbott Laboratories Ltd, Lake Bluff, IL, SAD) te intramuskularnom injekcijom anestetika s analgetskim učinkom – Ketamina (Ketanest, Pfizer Corporation, New York City, NY, SAD) u koncentraciji od 30 mg/kg tjelesne mase. Korišten je Fluovac sustav za anesteziju (Harvard apparatus, Cambridge, MA, SAD) (slika 4.1.4.1). Tijekom žrtvovanja prikupljeni su uzorci tkiva za analizu. Lijeva je hemisfera mozga odmah smznuta u tekućem dušiku za proteinske analize *Western blottingom* te izolaciju i analizu lipidnih splavi, dok je desna hemisfera mozga fiksirana u puferiranom 4% paraformaldehidu (PFA) za imunohistokemijsku analizu. Uzorci namijenjeni imunohistokemijskoj analizi su krioprotektirani po 24 h u otopinama saharoze sljedećih masenih udjela: 10%-tnoj, 20%-tnoj i 30%-tnoj otopini saharoze u fosfatnom puferu (PBS). Uzorci su zatim smrznuti u pothlađenom izopentanu i pohranjeni na -80°C do analize. U mozgu su analizirana područja hipokampusa i malog mozga (lat. *cerebellum*).



**Slika 4.1.4.1.** Prikaz korištene aparature za plinsku anesteziju. Izvorna slika.

## 4.2 Metode

U studiji su korištene sljedeće metode:

1. analiza steroidnih hormona iz seruma
2. praćenje promjene tjelesne mase
3. praćenje promjene tolerancije na glukozu
4. praćenje promjene tolerancije na inzulin
5. test za praćenje promjene pamćenja – pasivno izbjegavanje
6. imunohistokemijska analiza izražaja proteina
7. izolacija lipidnih splavi iz hipokampusa i maloga mozga
8. analiza citosolnih, ukupnih membranskih te proteina lipidnih splavi hipokampusa i maloga mozga *Western blotting* metodom.

## 4.3 Analiza steroidnih hormona iz seruma

Svim je životinjama prikupljena krv te je iz nje izoliran serum u 5. vremenskih stadija pokusa:

1. dan prije početka 1. ciklusa kroničnog stresa
2. dan nakon kraja 1. ciklusa kroničnog stresa
3. dan nakon kraja 2. ciklusa kroničnog stresa
4. dan nakon kraja 3. ciklusa kroničnog stresa
5. Tijekom žrtvovanja

U prve je četiri točke uzorkovanja krv uzeta iz ventralne jezične vene, a u petoj je točki krv uzorkovana kardijalnom punkcijom. U svih je pet točaka uzorkovanja korištena anestezija izofluranom (Forane® isofluranum, Abbott Laboratories Ltd, Lake Bluff, IL, SAD).

Postupak se izvodio na sljedeći način (slika 4.3.1):

1. Svaka se životinja anestezirala korištenjem plinske anestezije izofluranom;
2. Životinja se potom premjestila na radnu površinu;
3. Pincetom je prihvaćen jezik životinje;
4. U ventralnu jezičnu venu uvedena je igla;
5. Izvlačenjem igle iz vene započelo je prikupljanje krvi koja se sakupljala u odgovarajuće epruvete;
6. Od svake je životinje prikupljeno najviše 2 mL krvi, ovisno o dobi životinja (u mlađih je životinja prikupljeno oko 1.5 mL krvi);
7. Nakon prikupljanja krvi, u slučaju produljenog krvarenja životinje iz jezične vene, izravno na jezik primjenjen je dezmodpresin acetat (Minirin – 10 $\mu$ g po potisku, Fering, Kiel, Njemačka);
8. Krv je centrifugirana tijekom 10 minuta pri brzini od 2000g nakon čega je prikupljen serum u tubice od 1.5 mL te pohranjen na -80 °C do analize.



**Slika 4.3.1.** Postupak prikupljanja krvi iz ventralne jezične vene štakora. Izvorna slika.

Serum je analiziran spektrometrijom masa (uređaj LCMS 8050, Shimadzu Corporation, Japan) uz korištenje analitičkog seta *MassChrom® Steroids in Serum/Plasma* (Kataloški broj: 72072, Chromsystems Instruments & Chemicals, Munich, Njemačka) te spektrometrijskog detektora (Nexera and LCMS 8050, Shimadzu Corporation, Japan). Korišteno je 500 µl seruma prikupljenog iz prethodno definiranih vremenskih intervala uzorkovanja s po 5 uzoraka iz svake skupine životinja u oba intervala.

Kvantificirani su sljedeći steroidni hormoni iz seruma:

- kortikosteron
- progesteron
- testosteron

#### **4.4 Mjerenje tjelesne mase**

Svim je životinjama za vrijeme trajanja studije mjerena tjelesna masa te je prema rezultatima izračunata srednja vrijednost njene promjene od početka do kraja studije. Masa je mjerena u sljedećim točkama studije:

1. Početak studije – početak prvog ciklusa kroničnog i "sham" stresa (prvi dan protokola);
2. Kraj prvog ciklusa kroničnog i "sham" stresa (zadnji dan protokola);
3. Početak drugog ciklusa kroničnog i "sham" stresa (prvi dan protokola);
4. Kraj drugog ciklusa kroničnog i "sham" stresa (zadnji dan protokola);
5. Početak trećeg ciklusa kroničnog i "sham" stresa (prvi dan protokola);
6. Kraj trećeg ciklusa kroničnog i "sham" stresa (zadnji dan protokola);
7. Žrtvovanje životinja.

#### 4.5 Testovi tolerancije na glukozu (TTG) i inzulin (TTI)

Homeostaza glukoze ovisi o otpuštanju inzulina iz  $\beta$ -stanica Langerhansovih otočića gušterače i osjetljivosti ciljnih tkiva na inzulin tj. skladištenju i trošenju u ciljnim tkivima. Odnos između ta dva čimbenika određuje ukupnu fiziološku toleranciju životinje na glukozu te njenu sposobnost održanja homeostaze glukoze. TTG moguće je izvesti na nekoliko različitih načina – kvantifikacijom izlučivanja inzulina iz  $\beta$ -stanica Langerhansovih otočića u odgovoru na promjene koncentracije glukoze u plazmi, procjenom osjetljivosti ciljnih tkiva na inzulin te određivanjem tolerancije na glukozu, koje daje informaciju o oba navedena čimbenika (181). S obzirom na ograničenja izvođenja testova u provedenoj studiji na štakorima, odabrana je metoda intraperitonealnog testa tolerancije na glukozu tijekom 4 sata.

TTG je izveden samo u skupinama životinja podvrgnutima kroničnom stresu. Test se smatra snažnim stresorom te stoga nije izveden u kontrolnim skupinama, no izveden je u tri vremenska intervala u životinjama podvrgnutim kroničnom stresu, a prvo se mjerenje smatra kontrolnim.

Test je izveden u sljedećim točkama pokusa:

1. **Početno određivanje koncentracije glukoze u krvi** – izvedeno prije početka pokusa, odnosno dan prije izlaganja životinja stresorima; test ima ulogu kontrolnog mjerenja;
2. **Određivanje koncentracije glukoze u krvi nakon oporavka od prvog ciklusa kroničnog stresa** – izvedeno prije početka drugog ciklusa kroničnog stresa; test ima ulogu mjere oporavka od prvog ciklusa kroničnog stresa;
3. **Određivanje koncentracije glukoze u krvi nakon oporavka od drugog ciklusa kroničnog stresa** – izvedeno prije početka trećeg ciklusa kroničnog stresa; test ima ulogu mjere oporavka od drugog ciklusa kroničnog stresa.

Krv je uzorkovana na sljedeći način:

1. Životinja je smještena u cilindar za pridržavanje, a rep životinje je zagrijan;
2. Rep je obrisan etanolom;

3. U repnu venu je umetnuta igla (oko 3 do 5 mm) na polovini repa; aspiracija se nije radila zbog mogućeg sužavanja (kolapsa) vene;
4. Igla je potom izvučena, a na trakicu za mjerenje glukoze aplicirana je kapljica krvi te je s uređaja očitana vrijednost u mmol/L.

Test je izveden na sljedeći način:

1. Štakori su izloženi gladovanju tijekom 14 do 16 sati;
2. Svakoj je životinji izmjerena bazalna koncentracija glukoze u krvi uzimanjem kapljice krvi iz repne vene (prva točka mjerenja);
3. Nakon toga štakorima je intraperitonealno injicirana glukoza u količini od 2g/kg tjelesne mase;
4. 15 minuta nakon injiciranja glukoze ponovno je određena koncentracija glukoze u krvi (druga točka mjerenja);
5. Određivanje koncentracije glukoze u krvi nadalje je provedeno nakon 30 minuta, 45 minuta, 60 minuta, 90 minuta, 120 minuta te 240 minuta od injiciranja glukoze;
6. Po završetku testa životinje su nahranjene, a iz dobivenih je vrijednosti grafički prikazana krivulja koja opisuje toleranciju štakora na glukozu pod utjecajem kroničnog stresa.

TTI tehnički je vrlo sličan TTG uz razliku intraperitonealne injekcije inzulina. Snižavanje koncentracije glukoze u krvi u odgovoru na injekciju inzulina daje informaciju o inzulinskoj osjetljivosti, primarno u jetri i skeletnim mišićima (182).

TTI izveden je samo u skupinama životinja podvrgnutima kroničnom stresu. Test se smatra snažnim stresorom te stoga nije izveden u kontrolnim skupinama, no izveden je u životinjama podvrgnutim kroničnom stresu na kraju studije uključujući inicijalno određivanje koncentracije glukoze u krvi prije izazivanja stresa kao kontrolnu vrijednost.

Test je izveden u sljedećim fazama pokusa:

1. **Početno određivanje koncentracije glukoze u krvi** – izvedeno prije početka pokusa, odnosno prvi dan prije izlaganja životinja stresorima; test ima ulogu kontrolnog mjerenja;

**2. Određivanje koncentracije glukoze u krvi po završetku trećeg ciklusa kroničnog stresa** – izvedeno na kraju trećeg ciklusa kroničnog stresa; test ima ulogu detekcije utjecaja kroničnog stresa na toleranciju inzulina.

Test je izveden na sljedeći način:

1. Štakori su izloženi gladovanju tijekom 3-4 sata;
2. Svakoj je životinji izmjerena bazalna koncentracija glukoze uzimanjem kapljice krvi iz repne vene (prva točka mjerenja);
3. Nakon toga štakorima je intraperitonealno injiciran inzulin u količini od 0.75 jedinica/kg tjelesne mase.
4. 15 minuta nakon injiciranja inzulina ponovno je izmjerena koncentracije glukoze (druga točka mjerenja);
5. Određivanje koncentracije glukoze u krvi nadalje je nastavljeno nakon 30 minuta, 45 minuta, 60 minuta, 90 minuta, 120, minuta te 180 minuta od injiciranja glukoze;
6. Po završetku testa životinje su nahranjene, a iz dobivenih je vrijednosti grafički prikazana krivulja koja opisuje toleranciju štakora na inzulin pod utjecajem kroničnog stresa.

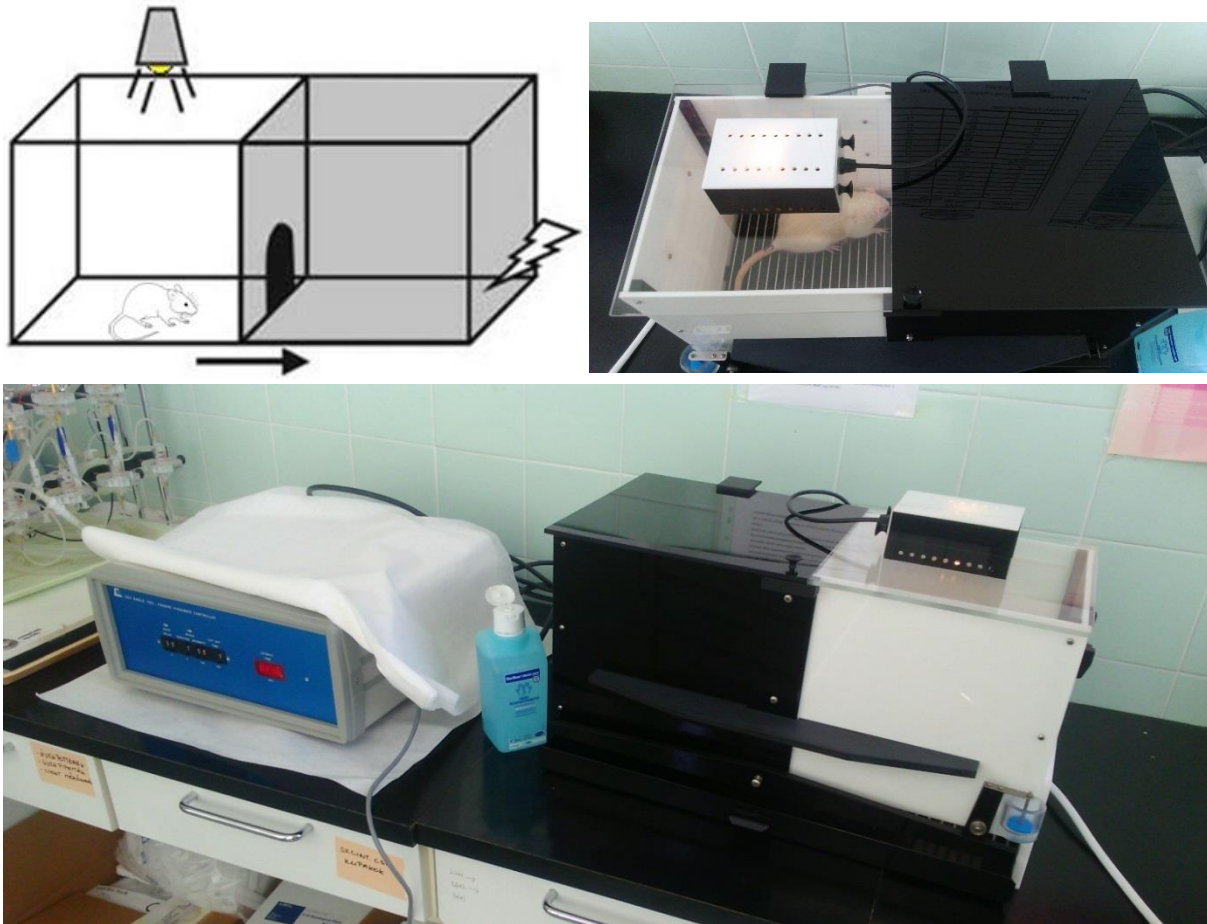
#### **4.6 Test ponašanja – pasivno izbjegavanje**

Za praćenje promjene ponašanja korišten je test pasivnog izbjegavanja za procjenu učenja i pamćenja u životinjskim modelima poremećaja središnjeg živčanog sustava. Cilj je testa učenje životinja izbjegavanju štetnih stimulusa kojima su prethodno bile podvrgnute. Test služi procjeni kratkoročnog ili dugoročnog pamćenja i koristi motivaciju životinja proizašlu iz straha te zahtjeva promjenu prirodnog ponašanja glodavaca koji se inače sklanjaju u tamna područja, a izbjegavaju jarko svjetlo.

Uređaj za provođenje testa (Ugo Basile, Varese, Italija) sastoji se od dviju sobica, jedne bijelih površina s izvorom snažnog osvjetljenja te druge sobice tamnih površina (slika



4.6.1). Dvije su sobice spojene vratašcima koja se automatski otvaraju. Podloga uređaja sastoji se od metalne rešetke putem koje životinje u određenom trenutku primaju električni šok preko šapa. Životinje koje normalno pamte i uspostavljaju pamćenje izbjеći će ulazak u tamnu sobicu u kojoj su prethodno bile izložene električnom šoku.



**Slika 4.6.1.** Shema uređaja za izvođenje testa pasivnog izbjegavanja (gore lijevo) i slika korištenog uređaja (gore desno). Slika čitave aparature prikazana je dolje. Izvorne slike.

Test se izvodi tijekom 3 dana:

**1. Prvi dan testa ima ulogu privikavanja životinja na sam uređaj.** Svaku se životinju smjestilo u osvijetljenu sobicu i omogućilo joj se istraživanje uređaja kroz 3 minute. Nakon 30 sekundi boravka životinje u uređaju, vratašca između dviju sobica su se otvorila pa je životinji omogućen ulazak u tamnu sobicu. Ulaskom životinje u tamnu sobicu, vrijeme na zaslonu uređaja je zaustavljeno i zabilježeno. Tijekom prvoga dana testa životinje nisu primile električni šok nakon ulaska u tamnu sobicu.

## 2. Drugi dan testa životinje su izložene električnom šoku pri ulasku u tamnu sobicu.

Kao i prvi dan, životinje su boravile u uređaju u ukupnom trajanju od 3 minute. Nakon 30 sekundi boravka životinje u uređaju, vratašca između dviju sobica su se otvorila pa je životinji omogućen ulazak u tamnu sobicu. Ulaskom životinje u tamnu sobicu, vratašca su se iza nje zatvorila, a životinja je bila izložena električnom šoku u trajanju 2 sekunde te jakosti 0.5 mA. Ulaskom životinje u tamnu sobicu, vrijeme na zaslonu uređaja se zaustavljeno i zabilježeno.

## 3. Treći dan testa predstavlja testni dan procjene učenja i pamćenja u životinja.

Životinje su boravile u uređaju u ukupnom trajanju od 3 minute. Nakon 30 sekundi boravka životinje u uređaju, vratašca između dviju sobica su se otvorila pa je životinji omogućen ulazak u tamnu sobicu. Ulaskom životinje u tamnu sobicu, vrijeme na zaslonu uređaja je zaustavljeno i zabilježeno. Za kvantitativne analize korišteni su dobiveni podaci iz trećeg dana testiranja, a vrijednosti su grafički prikazane u obliku postotaka ulaska životinja u tamnu sobicu.

## 4.7 Kvalitativna i kvantitativna imunokemijska analiza proteina

Proteini iz dobivenih tkiva analizirani su kvalitativno – imunokemijski te kvantitativno – *Western blotting* metodom. Za obje su metode korištena visokospecifična primarna (tablica 4.2) te odgovarajuća sekundarna protutijela (tablica 4.3). Sve su kvantitativne analize izražaja proteina izmjerene na površini od 0.05 mm<sup>2</sup>, najmanje u tri biološka replikata kada je to bilo moguće. Za statističke je analize korišten Mann Whitneyev test.

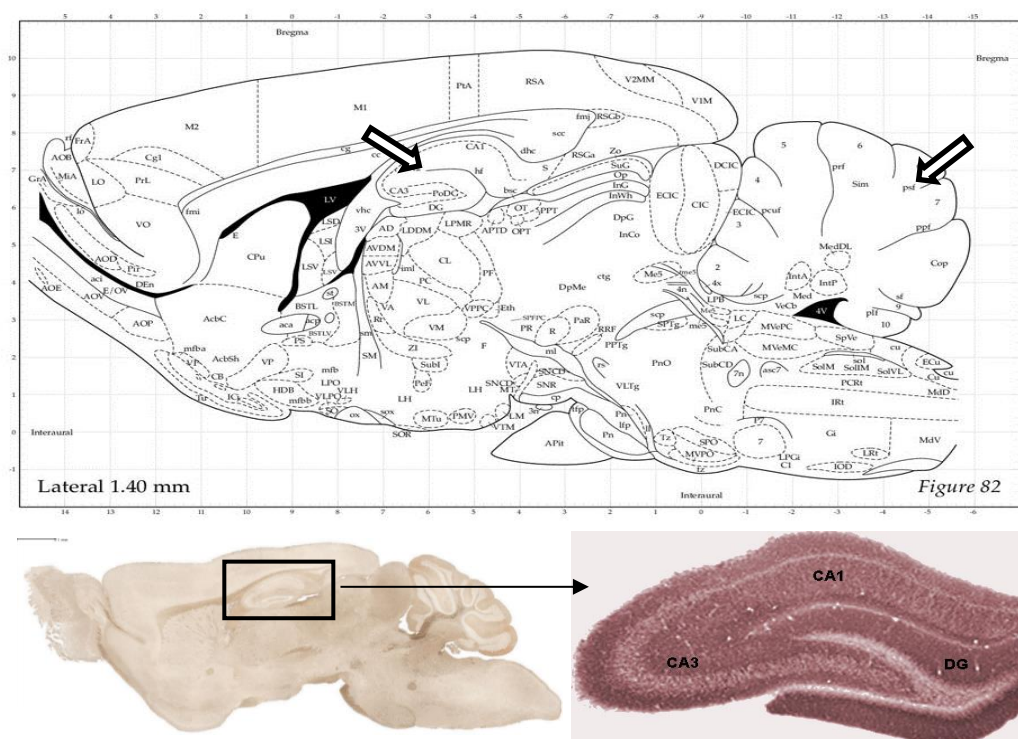
### 4.7.1. Imunohistokemijske analize

Imunohistokemijska analiza slobodnoplutajućih rezova (engl. *free floating*) izvedena je jednostrukim te dvostrukim bojanjem. Analizirani su sagitalni rezovi mozga u područjima hipokampusa te maloga mozga (slika 4.7.1.1). Za sva su bojanja korišteni triplikati rezova tkiva, a unutar hipokampusa su analizirana područja dentatnog girusa te CA1. Jednostruka su bojanja analizirana u hipokampusu i malom mozgu dok su dvostruka bojanja analizirana na sljedeći način:

APP/GD1a – u dentatnom girusu i CA1 području

APP/CTB – u CA1 području

Metodom imunohistokemije istraživani su proteini detektirani visokospecifičnim primarnim protutijelima. Korištena primarna protutijela te njihove specifikacije prikazana su u tablici 4.3. U slučaju jednostrukog bojanja kompleks antigen-protutijelo vizualiziran je primjenom odgovarajućih sekundarnih biotiniliranih protutijela te avidin-biotin kompleksa konjugiranog s peroksidazom iz hrena (engl. *horse radish peroxidase* – HRP) te supstratom za HRP, 3,3'-diaminobenzidina (DAB) nakon čega se na analiziranim rezovima pojavljuje specifično obojenje. Uzorci pohranjeni za imunohistokemijsku analizu uklopljeni su u medij za rezanje na kriostatu (Tissue Freezing Medium; Leica, Nussloch, Njemačka) i narezani na kriostatu (Cryostat CM3050S, Leica, Nussloch, Njemačka) pri temperaturi komore od  $-18^{\circ}\text{C}$  (engl. *chamber temperature* – CT) i temperaturi nosača tkiva od  $-15^{\circ}\text{C}$  (engl. *object temperature* – OT) na sagitalne rezove debljine  $35\ \mu\text{m}$ . Rezovi su čuvani u mikrotitarskim pločicama sa 12 ili 24 jažice ispunjenima PBS-om, pri  $\text{pH}=7,4$ .



**Slika 4.7.1.1.** Imunohistokemijski analizirana područja mozga Sprague-Dawley štakora označena su strelicama – hipokampus i mali mozak. Analizirana su područja prikazana na prilagođenoj slici iz atlasa štakorskog mozga. Donja lijeva slika prikazuje stvarni rez štakorskoga mozga odgovarajuće anatomske razine, a desna slika prikazuje detalje strukture hipokampusa i analiziranih područja CA1 te dentatnog girusa. Gornja je slika preuzeta i prilagođena prema Paxinos 1982 (183).

Rezovi koji se nisu odmah koristili, pohranjeni su u De Olmos otopinu za čuvanje rezova tkiva na  $-20^{\circ}\text{C}$  (184). Imunohistokemijski su analizirani sljedeći proteini: inzulinski receptor alfa (IR- $\alpha$ ), leptinski receptor (ObR), amiloid prekursorski protein (APP), AMPA-receptor (AMPA), Tau protein, neuroplastin (Np65) te gangliozidi GM1 i GD1a.

### Jednostruko bojanje

Protokol jednostrukog imunohistokemijskog bojanja slobodnoplutajućih rezova štakorskog mozga protutijelima IR- $\alpha$ , AMPA-R, ObR, Np65, Tau i GM1 izvodio se na sljedeći način:

- Rezovi pohranjeni u DeOlmos otopini isprani su 8 puta tijekom 15 min u PBS puferu.
- Blokiranje nespecifičnih reakcija: rezovi su inkubirani u otopini za blokiranje (5% kozji serum i 1% albumin iz seruma goveda – BSA u PBS puferu) 2 sata na tresilici pri  $+4^{\circ}\text{C}$ .
- Inkubacija s primarnim protutijelima: Rezovi su preko noći na tresilici pri  $+4^{\circ}\text{C}$  inkubirani u otopinama primarnih protutijela pripremljenima u otopini za blokiranje. Korištena su protutijela u razrjeđenju iz tablice 4.3.
- Ispiranje. Rezovi su isprani 3 puta tijekom 5 min u PBS puferu.
- Inkubacija sa sekundarnim protutijelima. Rezovi su inkubirani 2 sata u otopini sekundarnog protutijela na tresilici pri  $+4^{\circ}\text{C}$ . Sekundarna protutijela su pripremljena u otopini za blokiranje u razrjeđenju 1:500.
- Korištena sekundarna protutijela su anti-kozje, anti-mišje te anti-zečje IgG biotinizirano sekundarno protutijelo (tablica 4.4) u razrjeđenju 1:500.
- Rezovi su zatim ispirani 3 puta tijekom 5 minuta u PBS puferu uz miješanje, a potom su rezovi inkubirani u ABC reagensu (Vector Laboratories, Burlingame, CA, SAD) koji sadrži avidin i biotiniziranu peroksidazu iz hrena tijekom 2 sata na tresilici. Tom se inkubacijom kompleks avidina i biotinizirane peroksidaze vezaao na biotinizirano sekundarno protutijelo.
- Ispiranje. Rezovi su zatim isprani 3 puta tijekom 5 minuta u PBS puferu
- Vizualizacija imunoreaktivnosti postignuta je inkubacijom rezova u setu otopina koje sadrži diaminobenzidin (Vector Peroxidase Substrate Kit, Vector Laboratories,

Burlingame, CA, SAD) pripremljenih prema uputama proizvođača. Diaminobenzidin predstavlja supstrat za peroksidazu iz hrena koja uz prisutnost vodikova peroksida katalizira stvaranje netopljivog obojenog produkta smeđe boje.

-Rezovi su inkubirani u otopini DAB prema uputama proizvođača pri sobnoj temperaturi, a reakcija stvaranja obojenog produkta zaustavljena je premještenjem rezova u PBS pufer.

-Rezovi su navučeni na silanizirana predmetna stakalca i prekriveni Vectamount pokrivalom (Vector Laboratories, Burlingame, CA, SAD).

- Za negativnu kontrolu bojanja poslužili su rezovi koji su tretirani na identičan način kao i ostali rezovi osim što nisu inkubirani u otopini primarnog protutijela.

### Dvostruko bojanje

Za dvostruka bojanja slobodnoplutajućih rezova korištene su kombinacije dvaju primarnih protutijela, a njihove specifikacije prikazane su u tablici 4.3. Korištena su sekundarna fluorescentna protutijela prikazana u tablici 2.4 te 4',6-diamidin-2'-fenilindol dihidroklorid (DAPI) (Merck, NJ, SAD) za obilježavanje jezgara stanica.

Protokol dvostrukog imunohistokemijskog bojanja rezova štakorskog mozga izveden je u sljedećim kombinacijama protutijela: APP/GD1a te APP/kolera toksin podjedinica B obilježena s Alexa fluor 555 fluoroforom (Thermo fisher, Waltham, MA, SAD).

- Rezovi pohranjeni u DeOlmos otopini isprani su 8 puta tijekom 15 min u PBS puferu.

- Blokiranje nespecifičnih reakcija: rezovi su inkubirani u otopini za blokiranje bez deterdženta (5%-tni magareći serum, 1%-tni kozji serum i 1%-tni BSA u PBS puferu) 2 sata na tresilici pri +4°C.

- Inkubacija s primarnim protutijelima: Rezovi su preko noći na tresilici pri +4°C inkubirani u otopinama primarnih protutijela pripremljenima u otopini za blokiranje. Korištena su protutijela u razrjeđenju iz tablice 4.7.1.1.

- Ispiranje. Rezovi su isprani 4 puta tijekom 10 min u PBS puferu

- Inkubacija sa sekundarnim protutijelima. Rezovi su inkubirani 4 sata sa sekundarnim fluorescentnim protutijelima u mraku na tresilici pri +4°C. Sekundarna protutijela su pripremljena u otopini za blokiranje u razrjeđenju 1:500 prema tablici 4.4.
- U slučaju APP/CTB bojanja, CTB-AF555 je dodan u razrjeđenju od 1:500 zadnja dva sata tijekom inkubacije sekundarnog protutijela izravno u otopinu sekundarnog protutijela. Rezovi su inkubirani u mraku na tresilici pri +4°C.
- Rezovi su zatim ispirani 4 puta tijekom 10 minuta u PBS puferu uz miješanje.
- Inkubacija u otopini DAPI, fluorescentne interkalirajuće boje za jezgre u koncentraciji od 1µg/ml tijekom 5 minuta u mraku pri +4°C.
- Ispiranje. Rezovi su zatim isprani jednom tijekom 10 minuta u PBS-u.
- Rezovi su navučeni na silanizirana predmetna stakalca i prekriveni Vectashield pokrivalom (Vector Laboratories, Burlingame, CA, SAD) te analizirani konfokalnim mikroskopom Olympus Fluoview FV1000 (Olympus, Barcelona, Španjolska) uz korištenje imerzijskog objektiva 60X.
- Za negativnu kontrolu bojanja poslužili su rezovi koji su tretirani na identičan način kao i ostali rezovi osim što nisu inkubirani u otopini primarnog protutijela.

**Tablica 4.7.1.1** Popis korištenih primarnih protutijela te njihovih razrjeđenja u metodama imunohistokemijskog bojanja (IHC – imunohistokemijsko bojanje korištenjem HRP/DAB sustava, IHC-F bojanje uz korištenje sekundarnih protutijela obilježenih fluorescentnim fluoroforima) te *Western blottinga*.

Oznaka primarnog protutijela	Puni naziv primarnog protutijela	Klasifikacija protutijela	Organizam porijekla	Proizvođač i kataloški broj	Korišteno razrjeđenje za imunohistokemijsko bojanje/ <i>Western blotting</i>
IR-α	Anti-alfa podjedinica inzulinskog receptora	IgG, poliklonski	Zec	Santa Cruz, CA, SAD, SC-710	IHC 1:250

## MATERIJAL I METODE

<b>IR- <math>\alpha</math></b>	Anti-alfa podjedinica inzulinskog receptora	IgG, poliklonski	Zec	Abcam, Cambridge, UK, 5500	WB 1: 500
<b>IR-<math>\beta</math></b>	Anti-beta podjedinica inzulinskog receptora	IgG, poliklonski	Zec	Santa Cruz, CA, SAD, SC-711	WB 1:500
<b>ObR</b>	Anti-leptinski receptor	IgG, poliklonski	Zec	Santa Cruz, CA, SAD, SC-8325	IHC 1:50
<b>ObR</b>	Anti-leptinski receptor	IgG, poliklonski	Zec	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD, PA1053	WB 1: 1000
<b>APP</b>	Anti-amiloid prekursorski protein	IgG, monoklonski	Zec	Abcam, Cambridge, UK, ab32136	IHC-F 1:500 IHC 1:1000
<b>Np65</b>	Anti-neuroplastin	IgG, poliklonski	Koza	R&D Systems, Minneapolis, MN, SAD, AF5360	IHC 1:500 WB 1: 1000
<b>Tau</b>	Anti- Tau protein	IgG, monoklonski	Miš	Merck, Kenilworth, NJ, SAD, MABN1185	IHC 1:500
<b>GD1a</b>	Anti-GD1a gangliozid	IgG, monoklonski	Miš	Seikagaku, Tokio, Japan, 370705	IHC-F 1:3000
<b>GM1</b>	Anti-GM1 gangliozid	IgG, poliklonski	Miš	Johns Hopkins, donacija	IHC 1:1000

				prof. Ronalda Schnaara	
<b>pSTAT3</b>	Anti-fosforilirani protein pojačivač i aktivator transkripcije 3 (Tyr 705)	IgG, monoklonski	Zec	Cell Signalling Technology, Danvers, MA, SAD, D3A7	WB 1:1000
<b>SOCS3</b>	Anti-protein supresor signalizacije citokinima 3	IgG, monoklonski	Miš	Abcam, Cambridge, UK, ab14939	WB 1:500
<b>GluR2</b>	Anti-podjedinica 2 AMPA receptora	IgG1, monoklonski	Miš	Neuro Mab, Davis, CA, SAD L21/32	IHC 1:500
<b>ER-<math>\alpha</math></b>	Anti-alfa podjedinica, estrogenski receptor	IgG, monoklonski	Miš	Santa Cruz, CA, SAD, SC-787	WB 1:500

**Tablica 4.7.1.2.** Popis korištenih sekundarnih protutijela

Oznaka sekundarnog protutijela	Puni naziv primarnog protutijela	Klasifikacija protutijela	Organizam porijekla/ metoda/ razrjeđenje	Proizvođač i kataloški broj
<b>GO-anti-RB+biotin</b>	kozje protu-zečje protitijelo obilježeno s biotinom	IgG, poliklonski	Koza/IHC 1:500	Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, SAD, 111-065-003
<b>GO-anti-MO+biotin</b>	kozje protu-mišje protutijelo	IgG, poliklonski	Koza/IHC 1:500	Jackson Immunoresearch



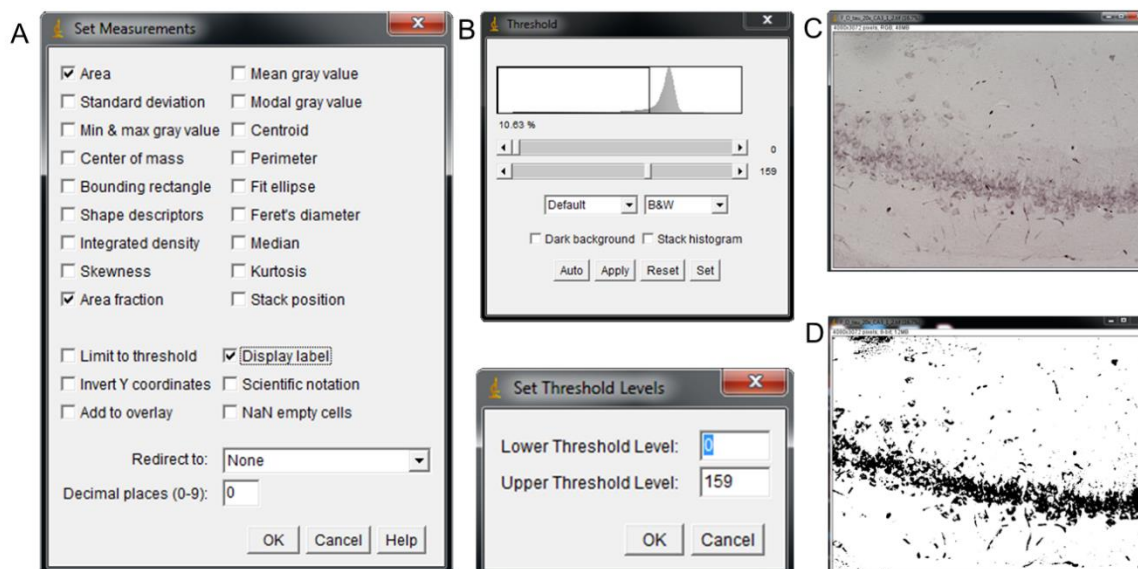
	obilježeno s biotinom			Laboratories, West Grove, PA, SAD, 115-065-166
<b>DO-anti- GO+biotin</b>	magareće protu-kozje protutijelo obilježeno s biotinom	IgG, poliklonski	Koza/IHC 1:500	Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, SAD, 705-065-147
<b>GO-anti- RB+HRP</b>	kozje protu-zečje protutijelo obilježeno s HRP	IgG, poliklonski	WB 1:50 000	Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, SAD 111-035-003
<b>DO-anti- MO+HRP</b>	magareće protu-mišje protutijelo obilježeno s HRP	IgG, poliklonski	WB 1:50 000	Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, SAD 715-035-150
<b>RB-anti- GO+HRP</b>	zečje protu-kozje protutijelo obilježeno s HRP	IgG, poliklonski	WB 1:50 000	Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, SAD 305-035-003
<b>AF488 GO-anti-MO</b>	Alexa fluor 488, kozje-protu-mišje protutijelo	IgG	Koza/IHC-F 1:500	Life technologies, Carlsbad, CA, SAD, A11001
<b>CY3 GO-anti-RB</b>	CY3, kozje-protu-zečje protutijelo	IgG	Koza/IHC-F 1:500	Life technologies, Carlsbad, CA, SAD, A10520

#### 4.7.2 Analiza jednostrukih imunohistokemijskih bojanja

Nakon jednostrukih imunohistokemijskih bojanja, preparati su analizirani mikroskopom Carl Zeiss Axioskop 2 MOT s kamerom Olympus D70 te računalnim programom DP Manager 1.2.1.107. i DP Controller 1.2.1.108. Za svako su područje svakoga reza tkiva prikupljenje najmanje 2 slike istih veličina. Ukupno je za svaku kvantifikaciju korišteno najmanje tri slike iz svake skupine životinja. Sve su slike analizirane u Fiji računalnom

programu (185). Na svim su slikama preparata analizirane promjene u morfologiji prema sljedećem protokolu (slika 4.7.2.1):

1. Nakon pokretanja Fiji programa, odabrani su sljedeći izbornici: *Alatna traka izbornika/Analyze/Set Measurements*;
2. U program je unesena slika u TIFF (engl. *Tagged image file format*) obliku;
3. U alatnoj je traci odabrana radnja *Plugins/Record/Macro* za izradu algoritma analize slika (engl. *macroinstruction* – MACRO);
4. Slika u TIFF obliku prevedena je u oblik 8-bit koji svakom pikselu dodjeljuje vrijednost od 0-255 pomoću naredbe *Alatna traka izbornika/Image/Type/8 bit*;
5. Kako bi se uklonilo pozadinsko obojenje odabran je raspon vrijednosti piksela. Donji prag raspona iznosio je 0, a vrijednost gornjega praga zadana je prema uprosječnoj vrijednosti pri kojoj pozadinsko obojenje kontrolnih reakcije nije vidljivo. Opisani je korak pratila naredba *Alatna traka izbornika/Image/Adjust/Threshold*;
6. U alatnoj je traci potom odabrana naredba *Analyze* te izbornik *Measure*, a rezultati su očitani iz prozora *Results*;



**Slika 4.7.2.1** Primjer korištenja zadanih naredbi u računalnom programu Fiji. (A) Određivanje osnovnih parametara mjerenja te raspona vrijednosti piksela za 8-bitnu sliku (B), neizmijenjena slika (C) i obrađena slika (D).

7. MACRO algoritam je pohranjen i imao je ulogu u analiziranju većeg broja slika jednostavnom naredbom *Process* u alatnoj traci izbornika uz mogućnost *Multiple Image Processor*.

#### 4.7.3 Analiza dvostrukih imunohistokemijskih bojanja

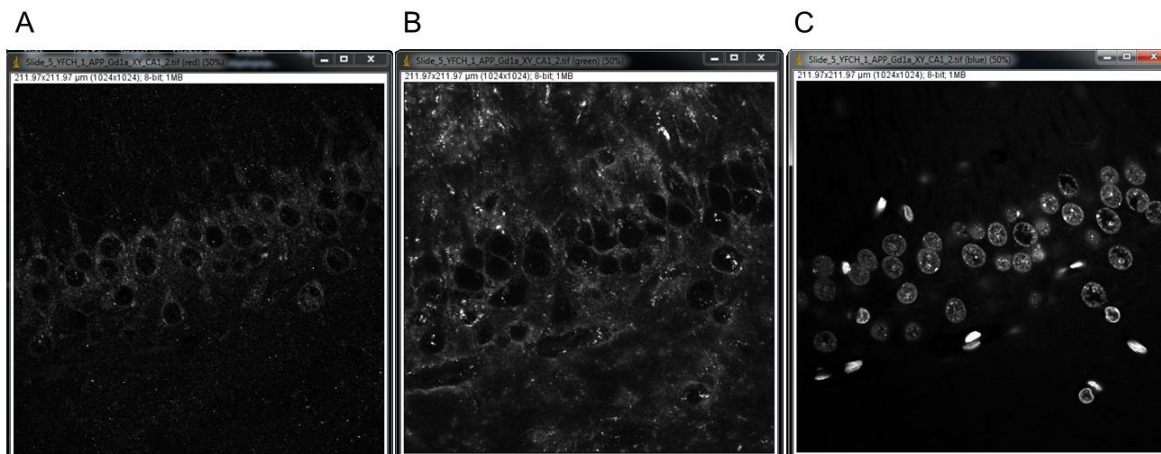
Nakon dvostrukih imunohistokemijskih bojanja, preparati su analizirani mikroskopom Olympus Fluoview FV1000, a slike su dobivene korištenjem kamere te odgovarajućih lasera uz korištenje računalnog programa Olympus FV10-ASW 4.2 Viewer.

U slučaju bojanja APP/GD1a iz svakog su analiziranog područja (dentatni girus te CA1) prikupljene 3 fofografije dimenzija 1024 piksela te po jedna trodimenzionalna (engl. *Z-stack*) slika dimenzija 512 piksela kroz 5 razina – jednim je snimanjem dobiveno 5 slika. Za kvantifikaciju su korišteni preparati tkiva u triplikatu, a za svaku od 8 skupina životinja odabrano je 5 reprezentativnih slika koje su korištene za statističku analizu.

U slučaju bojanja APP/CTB analizirano je područje CA1, a prikupljene su po dvije slike za svaku skupinu životinja, a srednja je vrijednost analiziranog područja izračunata bez statističke obrade.

Sve su slike analizirane u Fiji računalnom programu. Na svim su slikama preparata analizirane promjene integrirane vrijednosti gustoće signala (engl. *Integrated density value* – IDV) prema protokolu Arqués, 2012. (186):

1. Nakon pokretanja programa Fiji odabrane su sljedeće naredbe: *Image/Color/Split Channels* te je slika razdijeljena prema 3 korištena fluorofora (slika 4.7.3.1).
2. Odabran je prozor koji prikazuje obojenje jezgara DAPI fluoroforom;



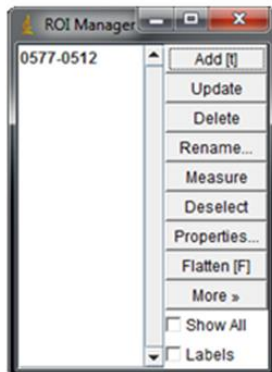
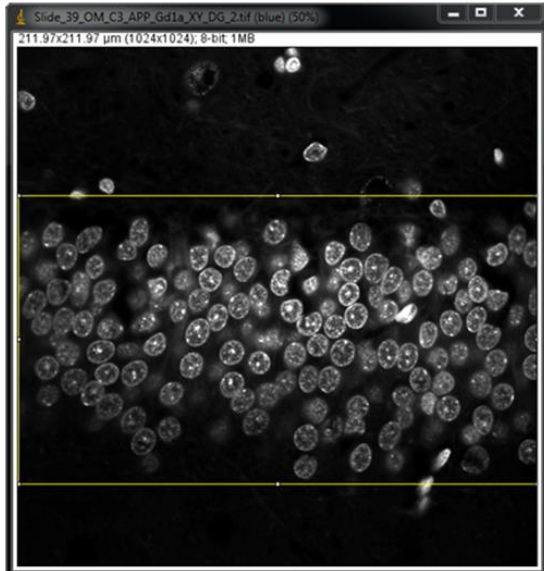
**Slika 4.7.3.1.** Prikaz izgleda razdiobe dobivenih slika prema 3 korištena fluorofora. Slika A prikazuje signal crvenog fluorofora, zeleni je fluorofor prikazan pod B, a C slika prikazuje obojenje jezgara plavim fluoroforom.

3. Na toj se slici obilježi površina koja se želi analizirati korištenjem *Rectangular* ili *Polygonal* oblika iz alatne trake. Potom se odabire izbornik ciljnog područja (engl. *region of interest* – ROI) odabirom naredbi *Analyze/Tool/ROI manager*. Potrebno je odabrano područje dodati u ROI izbornik naredbom *Add* (slika 4.7.3.2 A);

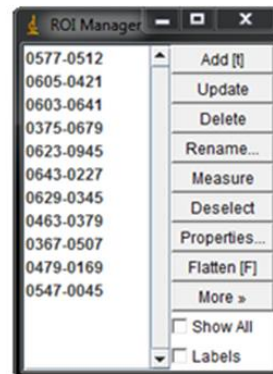
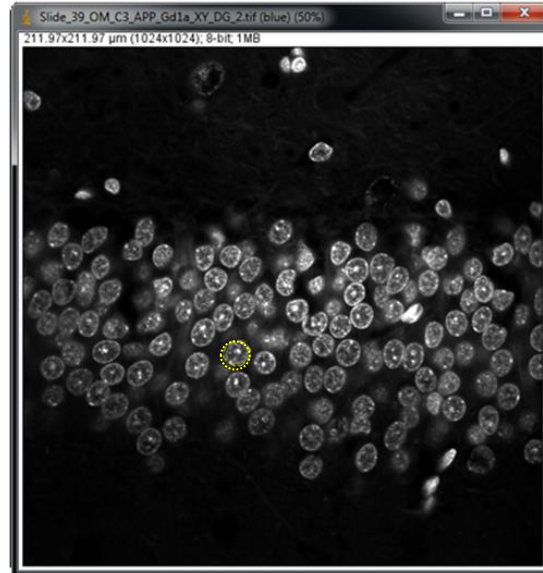
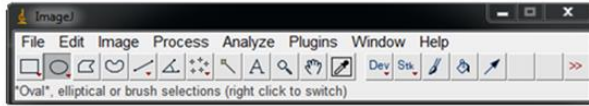
4. Nakon odabira ciljnog područja, na slici se pomoću *Rectangular* oblika iz alatne trake obilježi 10 jezgara. Jezgre se obilježe povlačenjem kružnice oko svake od 10 odabranih jezgara. Nakon podešavanja kružnice potrebno je naredbom *CTRL+T* dodati površinu svake od jezgara u ROI zbornik. U ROI izborniku tada se može vidjeti ukupna površina koja se analizira te površine svake od 10 jezgara (slika 4.7.3.2 B);

5. U ROI se izborniku tada naredbom *SHIFT+A* odabere svih 11 izmjerenih površina (ukupna površina te površine 10 staničnih jezgara) i odabere naredba *Measure* nakon čega se otvara novi prozor s vrijednostima izmjerenih površina – dobivene su vrijednosti odabranih površina – ukupna površina, površina svake od pojedinačno odabranih jezgara i IDV (slika 4.7.3.3).

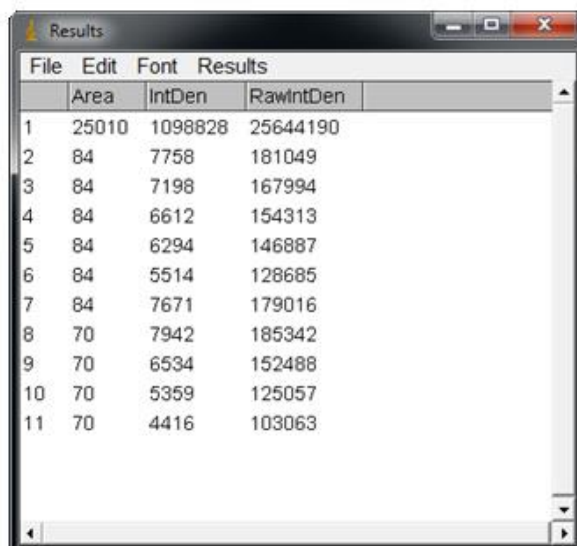
A



B



**Slika 4.7.3.2.** Prikaz odabira ciljnog područja korištenjem *Rectangular* oblika iz alatne trake (A gore) te mjerenja površine odabranog područja (A dolje). Nakon odabira ciljnog područja odabire se 10 reprezentativnih jezgara stanica korištenjem *Elliptical* oblika iz alatne trake (B gore) i svaka se obilježena površina dodaje ROI izborniku (B dolje).



File	Area	IntDen	RawIntDen
1	25010	1098828	25644190
2	84	7758	181049
3	84	7198	167994
4	84	6612	154313
5	84	6294	146887
6	84	5514	128685
7	84	7671	179016
8	70	7942	185342
9	70	6534	152488
10	70	5359	125057
11	70	4416	103063

**Slika 4.7.3.3.** Prikaz dobivenih vrijednosti nakon mjerenja površine ukupnog ciljnog područja (vrijednost broj 1 u tablici na slici) i vrijednosti odabranih 10 jezgara stanica (vrijednosti 2-11 u tablici na slici). U tablici su prikazane vrijednosti površina (*Area*), IDV te vrijednost sirove integrirane gustoće (*RawIntDen*).

6. Iz vrijednosti IDV ukupne analizirane površine te pojedinačno zbrojenih IDV vrijednosti 10 odabranih jezgara izračunata je vrijednost ukupnog broja jezgara odnosno stanica koja se koristi u kasnijim koracima pri izračunu vrijednosti IDV za svaki fluorofor (tablica 4.7.2.1 A).

7. Zatim se odabire iduća slika za analizu željenog fluorofora. U ROI izborniku odabire se ukupna analizirana površina i izvrši naredba *Measure* kojom se u novom izborniku ispisuju vrijednosti IDV za odabrani fluorofor. Iste se naredbe ponavljaju za drugi fluorofor. Izračun IDV vrijednosti za analizirano bojanje po stanici dobiva se dijeljenjem ukupne IDV vrijednosti pojedinačnog signala (primjerice crvenog signala) s brojem stanica pa je tako dobivena IDV vrijednost svakog od signala jednaka vrijednosti po stanici (tablica 4.7.2.1 B).

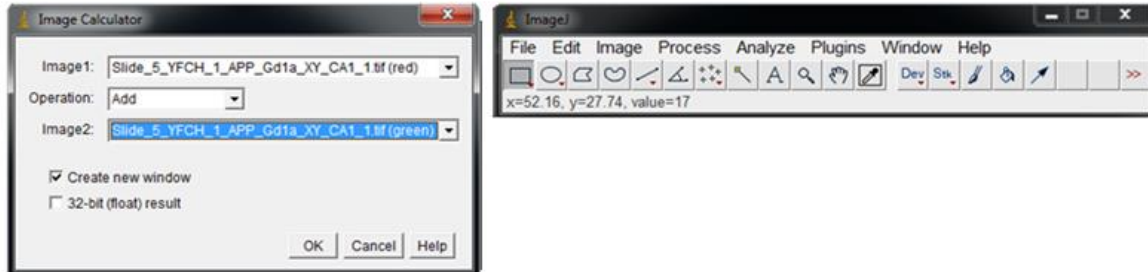
**Tablica 4.7.2.1.** Primjer analize podataka dobivenih kvantifikacijom slika u Fiji računalnom programu. Za analizu obojenja prvo je određen broj stanica u analiziranoj površini korištenjem podataka ukupne vrijednosti IDV za DAPI obojenje te vrijednosti IDV za 10 odabranih jezgara. Iz ta se dva podatka izračunao ukupan broj jezgara analiziranog područja (IDV vrijednost za DAPI/srednja vrijednost IDV za 10 odabranih jezgara) (A). IDV vrijednost pojedinačnog signala izračunao se korištenjem vrijednosti IDV za pojedinačni signal te ukupnog broja jezgara (IDV pojedinačnog signala/ukupni broj jezgara) (B). Analiza kolokalizacije slična je analizi pojedinačnih signala. Nakon dobivene IDV vrijednosti preklapanjem dviju željenih slika ta se vrijednost podijeli s brojem jezgara (IDV vrijednost kolokalizacije/ukupni broj jezgara) (B desno).

<b>A</b>	<b>IDV za DAPI ukupno (pixel)</b>	<b>IDV za odabranih 10 jezgara (pixel)</b>	<b>Srednja vrijednost IDV za 10 odabranih jezgara (pixel)</b>	<b>Ukupni broj jezgara Izračun: IDV DAPI ukupno/Srednja vrijednost IDV za odabranih 10 jezgara</b>
<b>34_MM_K1_APP Gd1a_XY_CA1 1</b>	1151340	15527	15512.6	74.220
		15816		
		18541		
		24370		
		16093		
		18292		
		11535		
		10584		
		11146		
		13222		

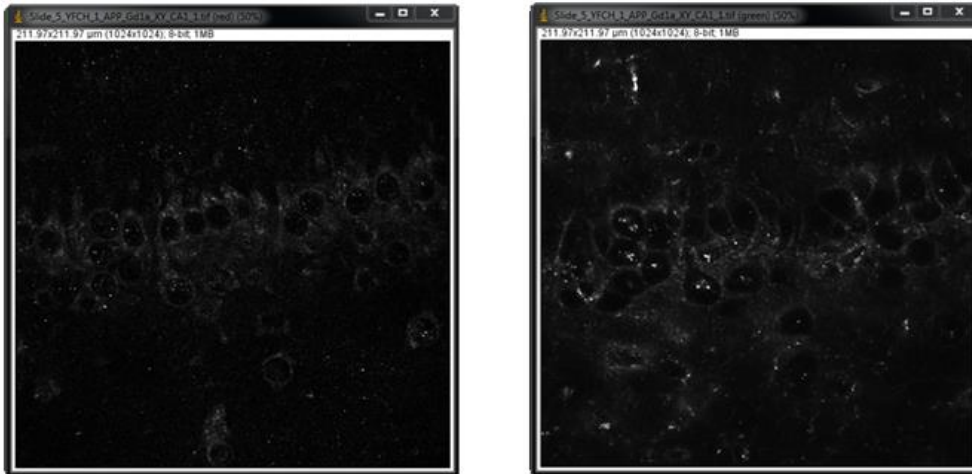
<b>B</b>	<b>IDV za zeleni signal (pixel)</b>	<b>IDV za zeleni signal/ukupni broj jezgara (pixel)</b>	<b>IDV kolokalizacije (pixel)</b>	<b>IDV kolokalizacije/ukupni broj jezgara (pixel)</b>
	309989	4176.642	152559	2055.506

8. Za analizu kolokalizacije u alatnoj se traci odabere naredba *Process/Image calculator* pri čemu se otvara izbornik u kojemu se odabiru dvije slike čija se kolokalizacija želi analizirati (slika 4.7.3.4).

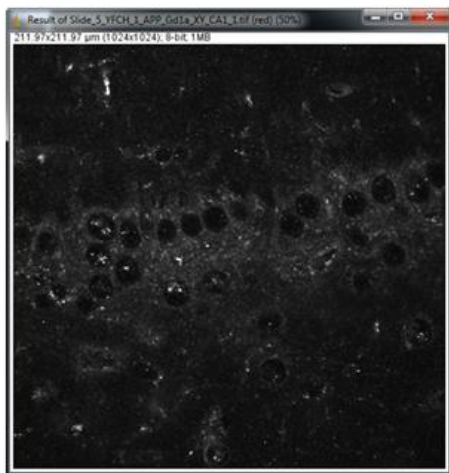
A



B



C



D

	Area	IntDen	RawIntDen
1	15177	509431	11888978

**Slika 4.7.3.4.** Primjer analize kolokalizacije u *Fiji* računalnom programu. Nakon razdiobe slike prema fluoroforima te određivanja ukupnog broja stanica analiziranog područja (opisano u prethodnim koracima) odabire se naredba *Image Calculator* nakon čega se otvara novi prozor. U padajućim se izbornicima prozora odabiru slike koje se uspoređuje (A). Slike čija se kolokalizacija uspoređuje u primjeru prikazane su pod B. Nakon izvršenja naredbe nastaje sjedinjena slika (C) koja se analizira korištenjem ROI izbornika, a rezultati se prikazuju u novootvorenom prozoru (D).



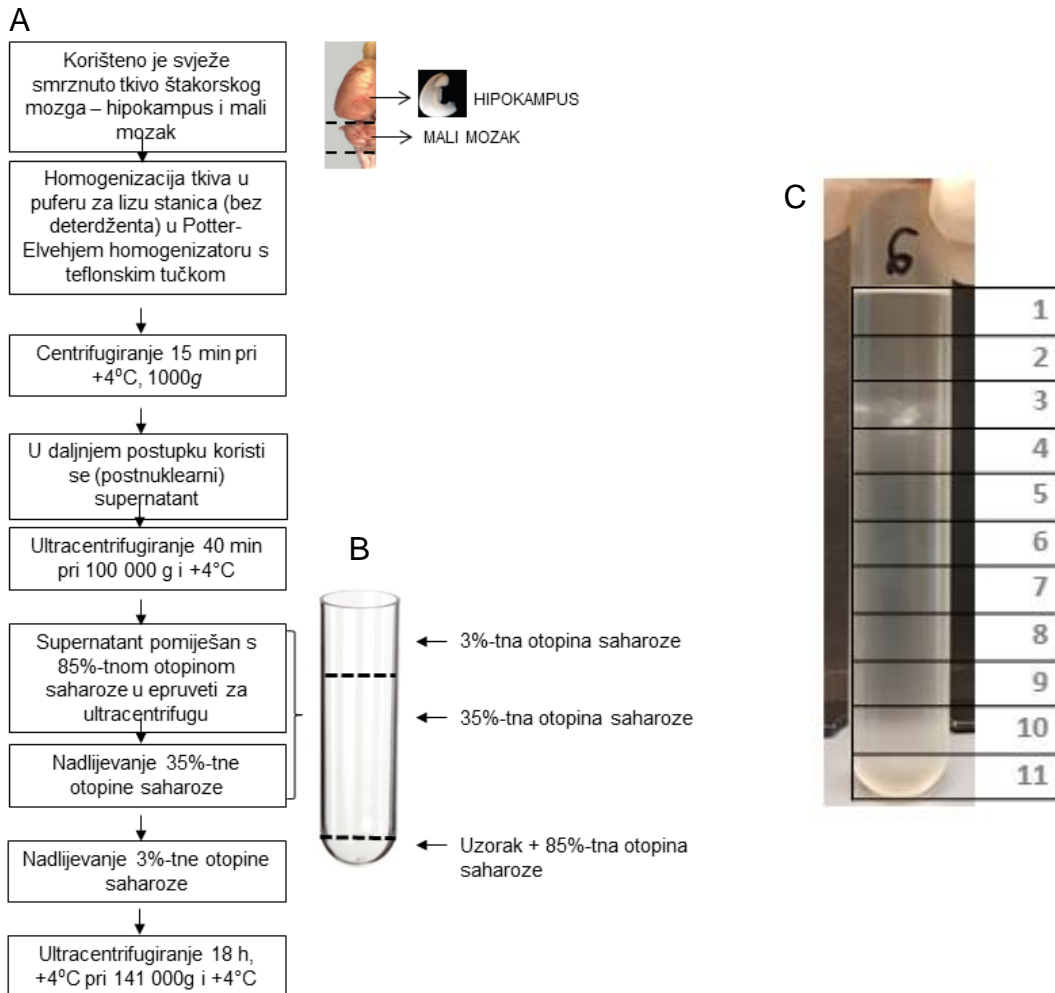
#### 4.7.4. Izolacija lipidnih splavi i kvantitativna analiza proteina

Proteini su analizirani unutar lipidnih splavi, ostatku stanične membrane (ne-splavi), ukupnim membranskim proteinima te u citosolu.

Najčešće korištena metoda izolacije lipidnih splavi za njihovo odvajanje od ostatka stanične membrane koristi deterdžent Triton X-100. Prema dosadašnjim iskustvima i objavljenom članku (171) jasno je kako je takav deterdžent agresivan te uzrokuje redistribuciju gangliozida i proteina usidrenih u membranu GPI sidrom što daje pogrešne rezultate u istraživanjima proteinskog i lipidnog sastava staničnih membrana. U suradnji sa prof. dr. sc. Svjetlanom Kalanj-Bognar, doc.dr.sc. Kristinom Mlinac-Jerković te dr.sc. Katarinom Ilić, u Laboratoriju za neurokemiju, Hrvatski Institut za istraživanje mozga, Medicinski Fakultet u Zagrebu, razvijen je izmijenjeni protokol izolacije lipidnih splavi koji u zamjenu za Triton X-100 koristi deterdžent Brij O20 (u ranijoj nomenklaturi poznat kao Brij 98) (Sigma, NJ, SAD), koji ne uzrokuje opisanu redistribuciju gangliozida i određenog seta istraživanih membranskih proteina. Lipidne splavi iz tkiva hipokampusu i malog mozga u triplikatu za svaku istraživanu skupinu izolirane su prema prilagođenom protokolu nastalom iz uobičajeno korištenog protokola uz izmjenu korištenog deterdženta, a metoda se izvodila prema sljedećem protokolu (slika 4.7.4.1):

1. Obje su vrste tkiva izvagane. Korišteno je između 50 i 80 mg tkiva, a za vaganje je korištena analitička vaga (Sartorius GP1100S; Dana Weighing Systems, Elk Grove, IL, SAD);
2. Nakon vaganja, tkiva su brzo smještena u pothlađeni stakleni Potter-Elvehjem homogenizator s teflonskim tučkom (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) te im je dodan homogenizacijski puferu s 0.32 M saharozom i inhibitorima proteaza (1%-tni koktel inhibitora proteaza, 5 mM NaF, 1 mM PMSF, 1 mM NaVO<sub>4</sub>) bez deterdženta. Tkivo je homogenizirano s točno 30 udaraca tučka o dno homogenizatora.
3. Homogenizirano tkivo je prebačeno u plastičnu epruvetu i centrifugirano 15 min pri 1000 g i +4°C (centrifuga: Hettich Universal 32R; Andreas Hettich GmbH & Co, Tuttlingen, Njemačka). Dobivenom se supernatantu (S1) izmjerio volumen, dok je talog (P1) odbačen.

4. S1 je potom centrifugiran u 50.4 Ti tubicama (Beckman Coulter, Pasadena, CA, SAD) za ultracentrifugu (Beckman Optima XL-80K, rotor 50.4 Ti; Beckman Coulter, Pasadena, CA, SAD) 40 min pri 100 000 g s ciljem razdvajanja staničnih membrana. Dobiveni je supernatant (S2) sadržavao citosolne proteine te je sačuvan za kasnije analize, a talog (T2) je sadržavao ukupne stanične membrane.
5. U T2 iz prethodnog koraka dodan je 1 mL fosfatnog raft pufera koji sadrži 1% deterdžent BrijO20 te inhibitori proteaza. Talog je prenesen u pothlađeni stakleni Potter-Elvehjem homogenizator s teflonskim tučkom (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) te je homogeniziran s točno 15 udaraca tučka o dno homogenizatora.
6. 600  $\mu$ L homogeniziranog T2 otpipetirano je u pothlađene SW 28.1 Ti tubice za ultracentrifugu Beckman Optima XL-80K, rotor SW 28.1 Ti, Beckman Coulter, Pasadena, CA, SAD) i pomiješano sa 600  $\mu$ L 85%-tne saharoze u homogenizacijskom puferu koji sadržava 1% Brij O20. Dobivena je smjesa nadslojena s 10 mL 35%-tne saharoze u homogenizacijskom puferu koji sadržava 1%-tni Brij O20. Na taj je sloj otpipetirano 4 mL 3%-tne saharoze saharoze u homogenizacijskom puferu koji sadržava 1% -tni Brij O20.
7. Dobiveni je gradijent centrifugiran u ultracentrifugi (Beckman Optima XL-80K, rotor SW 28.1 Ti; Beckman Coulter, Pasadena, CA, SAD) 18 h pri 141 000 g i +4<sup>0</sup>C.
8. Nakon završetka ultracentrifugiranja iz svake su epruvete sakupljene frakcije u volumenu od 1.5 mL počevši od gornjeg sloja. Ukupno je dobiveno 10 ili 11 frakcija po uzorku. Frakcije 3 i 4 sadržavale su lipidne splavi, dok su frakcije 9 i 10 ili 10 i 11 sadržavale ostatak stanične membrane nazvan ne-splavima. Frakcije su spremljene na -80°C do mjerenja koncentracije proteina te analize položaja odabranih membranskih proteina *Western blotting* metodom.



**Slika 4.7.4.1.** Shema izolacije lipidnih splavi (A), dizajn gradijenta saharoze (B), prikaz krajnjeg rezultata – epruveta s lipidnim splavima vidljivima u obliku oblačića u frakcijama 3 i 4 te nesplavima u frakcijama 10 i 11 (C).

Iz S2 pripremljeni su uzorci za analizu citosolnih proteina malog mozga i hipokampusa visokospecifičnim primarnim protutijelima koja se vežu za GR, IR- $\beta$  te  $\alpha$  podjedinicu estrogenskog receptora (ER- $\alpha$ ). Uzorci ukupnih membranskih proteina pripremljeni su iz T2 nakon prvog ultracentrifugiranja te su analizirani visokospecifičnim primarnim protutijelima koja se vežu za IR- $\alpha$ , ObR, Np te APP.

Smještaj odabranih membranskih proteina, unutar ili izvan lipidnih splavi, analiziran je u uzorcima lipidnih splavi i uzorcima ne-splavi visokospecifičnim primarnim protutijelima koja se vežu za IR- $\alpha$ , ObR, Np te APP. Budući da koncentracije proteina svih opisanih

uzoraka nisu poznate, za njihovo su određivanje korištene metode određivanja proteina metodama prema Bradfordu i Lowryju.

### Određivanje koncentracije proteina prema Bradfordu

Metoda se temelji na nespecifičnom vezanju anionskog oblika boje Coomassie Brilliant Blue G-250 za bazične i aromatske bočne ogranke proteina, uslijed čega dolazi do stvaranja kompleksa protein-boja, koji u kiselom mediju pokazuje apsorpcijski maksimum pri 595 nm (187). Boja je otopljena u smjesi s metanolom i fosfornom kiselinom te se u tom obliku naziva Bradfordov reagens, a pripremljen je na sljedeći način: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 otopljeno je u 50 mL metanola te je u tu otopinu dodano 100 mL fosfatne kiseline i 850 mL destilirane vode. Nakon što se Bradfordov reagens doda uzorcima, boja se veže za proteine te dolazi do promjene obojenja iz crveno-smeđeg u plavo. Promjena u intenzitetu obojenja ovisi o koncentraciji proteina u uzorku. Protokol određivanja koncentracije proteina metodom prema Bradfordu je sljedeći:

Priprema slijepe probe: u tubicu je otpipetirano 100  $\mu\text{L}$   $\text{dH}_2\text{O}$ .

Priprema standardne otopine: u duplikatu su pripremljene četiri otopine BSA ukupnog volumena 100  $\mu\text{L}$  sljedećih koncentracija:

Standard 1 – 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,

Standard 2 – 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$

Standard 3 – 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$

Standard 4 – 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Priprema uzoraka nepoznate koncentracije: u duplikatu su pripremljene 5 puta razrijeđene otopine uzoraka tako što je u epruvetu uliveno 5  $\mu\text{L}$  otopine uzorka i 20  $\mu\text{L}$   $\text{dH}_2\text{O}$ .

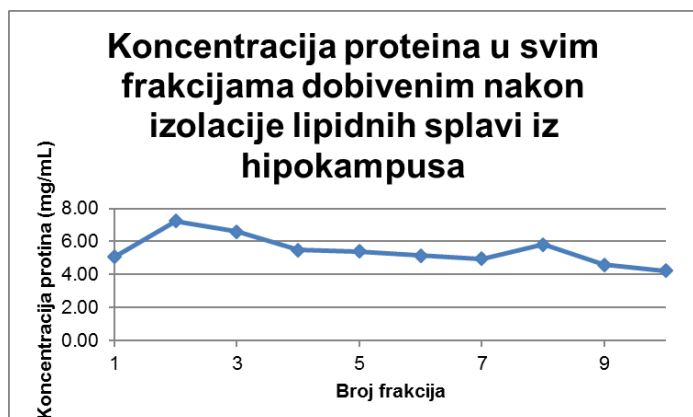
Mjerenje apsorbancije: u sve je epruvete otpipetirano po 1.25 mL Bradfordovog reagensa. Nakon kratkog miješanja i inkubacije od 15 minuta, sadržaj epruvete je premješten u kivetu. Prvo je u spektrofotometar (CamSpec M201; Spectronic Camspec Ltd., Garforth, Leeds, UK) umetnuta kiveta slijepe probe te su pri valnoj duljini od 595 nm podešene

transmitancija na 100% i apsorbancija na 0. Zatim su mjerene apsorbancije standardnih otopina, a onda i apsorbancije uzoraka nepoznate koncentracije.

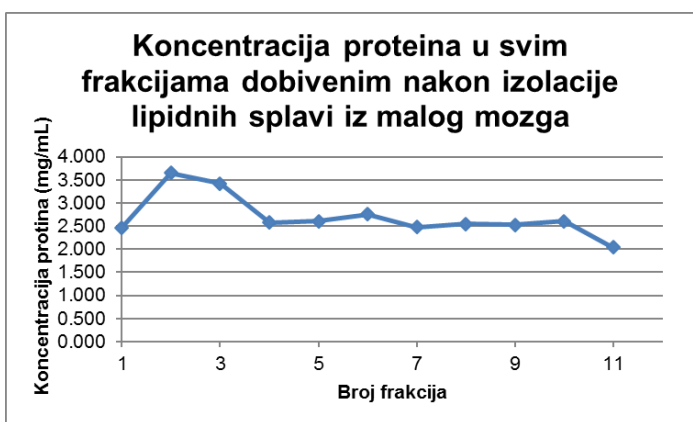
Određivanje koncentracije proteina u uzorcima određeno je prema dobivenim vrijednostima apsorbancija standardnih otopina te je nacrtan interpolirani pravac u koordinatnom sustavu, pri čemu su na apscisu unesene vrijednosti masene koncentracije otopine, a na ordinatu vrijednosti apsorbancije. Zatim je prema prosječnoj vrijednosti izmjerenih apsorbancija uzoraka iz koordinatnog sustava očitana koncentracija proteina. Budući da su uzorci bili razrijeđeni 5 puta, dobivena vrijednost masene koncentracije je množena s 5 (tablica 4.7.4.2).

**Tablica 4.7.2.2.** U tablici su prikazane dobivene vrijednosti masenih koncentracija za reprezentativne uzorke frakcija lipidnih splavi hipokampusa te maloga mozga određenih metodom prema Bradfordu. Pokraj tablica vrijednosti koncentracije proteina prikazane su grafički za po jedan reprezentativni uzorak hipokampusa i maloga mozga.

FRAKCIJE UZORKA HIPOKAMPUSA	Apsorbancija (srednja vrijednost)	$\mu\text{g/mL}$	$\text{mg/mL}$
1	0.422	2465.63	2.466
2	0.611	3646.88	3.647
3	0.5745	3418.75	3.419
4	0.4395	2575.00	2.575
5	0.444	2603.13	2.603
6	0.4685	2756.25	2.756
7	0.4235	2475.00	2.475
8	0.435	2546.88	2.547
9	0.4325	2531.25	2.531
10	0.444	2603.13	2.603
11	0.3535	2037.50	2.038



FRAKCIJE UZORKA MALOGA MOZGA	Apsorbancija (srednja vrijednost)	$\mu\text{g/mL}$	$\text{mg/mL}$
1	0.408	5073.75	5.074
2	0.5805	7230.00	7.230
3	0.5295	6592.50	6.593
4	0.4405	5480.00	5.480
5	0.433	5386.25	5.386
6	0.4135	5142.50	5.143
7	0.399	4961.25	4.961
8	0.4675	5817.50	5.818
9	0.3705	4605.00	4.605
10	0.341	4236.25	4.236



### Određivanje koncentracije proteina prema Lowryju

S obzirom da se tijekom pokusa pokazalo kako deterdžent Brij inteferira s određivanjem proteina prema Bradfordu, koncentracija proteina u svim uzorcima lipidnih splavi i nesplavi određena je i metodom prema Lowryju. Metoda određivanja koncentracije proteina prema Lowryju opisana je 1951. i temelji se na reakciji  $\text{Cu}^{2+}$  vezanih za amino skupine peptidnih veza u proteinima i fenolne skupine bočnog ogranka aminokiseline tirozin u proteinu s Folin-Ciocalteau (Folinovim) reagensom (188). Folinov reagens sadrži fosfovolframatnu i fosfomolibdatnu kiselinu koje bakrovi ioni vezani na dušikove atome peptidne veze u proteinima i fenilne skupine tirozina reduciraju u volframovo i molibdensko modrilo. Pri toj reakciji nastaje kompleks plavo-ljubičaste boje apsorpcijskog maksimuma pri 660 nm.

Za pripremu Lowry otopine 2%-tni  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  otopljen u 0,1 M NaOH, 0,5%-tni  $\text{CuSO}_4$  i 2%-tni K,Na-tartarat miješaju se u omjeru 100:1:1.

Za baždarni je pravac u 200  $\mu\text{L}$  otopine različite koncentracije BSA proteina (0-500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) dodano po 2 mL Lowry otopine i ta je otopina inkubirana na sobnoj temperaturi 15 min.

Priprema slijepe probe: u tubicu je otpipetirano 200  $\mu\text{L}$   $\text{dH}_2\text{O}$ .

Priprema standardnih otopina - korištene su sljedeće standardne otopine BSA u duplikatu:

Standard 1 – 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,

Standard 2 – 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$

Standard 3 – 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$

Standard 4 – 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

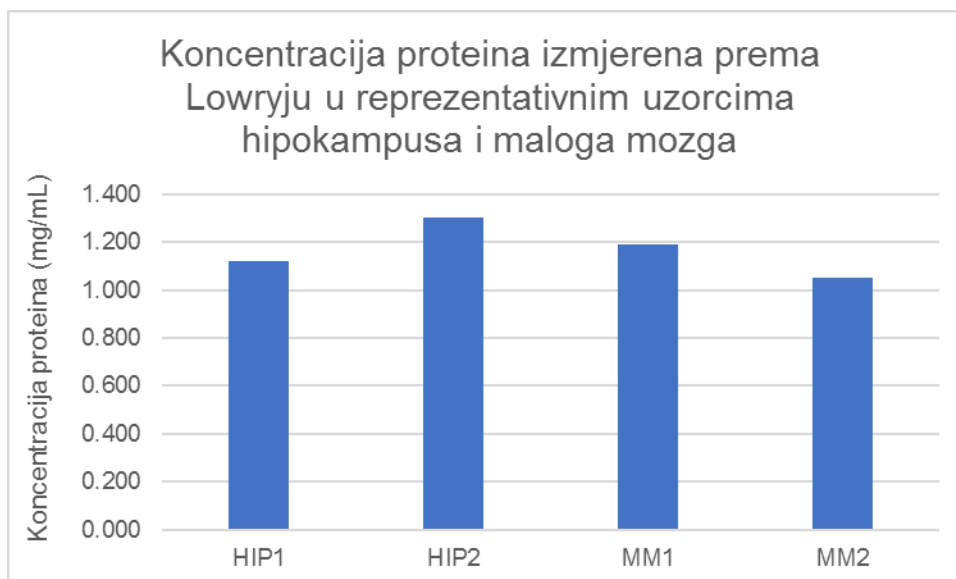
Priprema uzoraka nepoznatih koncentracija: za određivanje koncentracije proteina iz uzoraka po 10  $\mu\text{L}$  svakog uzorka otpipetirano je u plastičnu epruvetu i pomiješano s 190  $\mu\text{L}$   $\text{dH}_2\text{O}$  u duplikatu. Tako pripremljenom uzorku dodano je 2 mL Lowry otopine i inkubirano na sobnoj temperaturi 15 min. Potom je svim standardnim i ispitivanim uzorcima dodano po 200  $\mu\text{L}$  Folinovog reagensa prethodno razrijeđenog s vodom u omjeru 1:2. Nakon inkubacije od 30 min mjerena je apsorbanacija na 750 nm. Određivanje koncentracije proteina u uzorcima: Iz dobivenih vrijednosti apsorbanacija standardnih

otopina nacrtan je interpolirani pravac u koordinatnom sustavu, pri čemu su na apscisu unesene vrijednosti masene koncentracije otopine, a na ordinatu vrijednosti apsorbancije. Zatim je prema prosječnoj vrijednosti izmjerenih apsorbancija uzoraka iz koordinatnog sustava očitana koncentracija proteina. Budući da su uzorci bili razrijeđeni 20 puta, dobivena vrijednost masene koncentracije je množena s 20. Tablica 4.7.4.3 prikazuje dobivene vrijednosti masenih koncentracija za pojedini uzorak ukupnih membranskih proteina.

**Tablica 4.7.2.3.** U tablici su prikazane dobivene vrijednosti masenih koncentracija za reprezentativne uzorke ukupnih membranskih proteina hipokampusu te maloga mozga izmjerenih metodom prema Lowryju. Ispod tablice vrijednosti koncentracije proteina prikazane su grafički za po dva reprezentativna uzorka ukupnih membranskih proteina hipokampusu i maloga mozga.

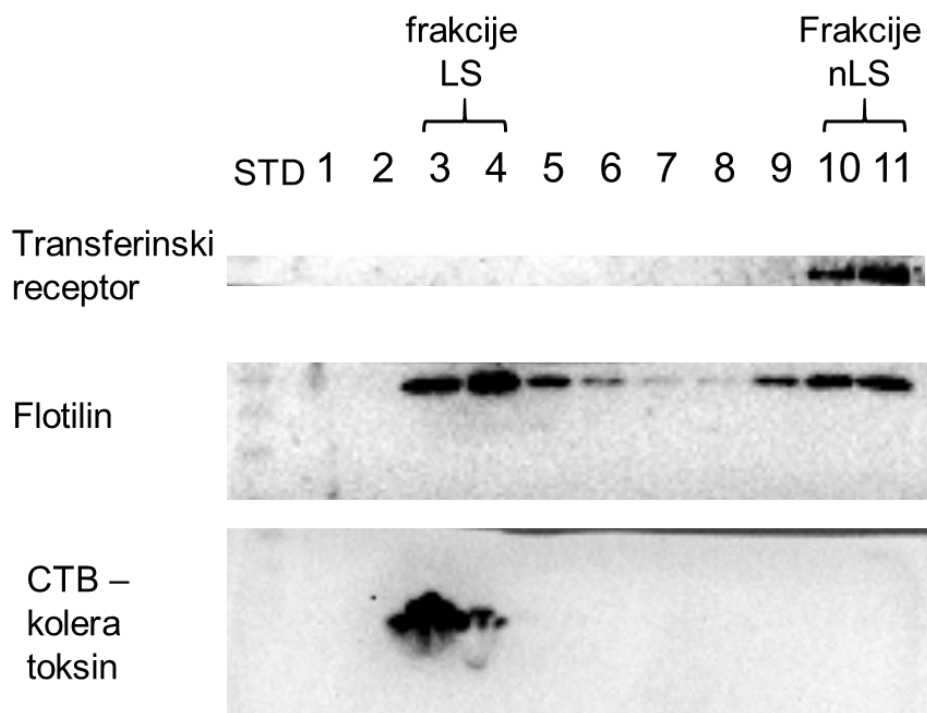
UZORCI UKUPNIH MEMBRANSKIH PROTEINA MALOGA MOZGA			
Broj uzorka	Srednja vrijednost apsorbancije	$\mu\text{g/mL}$ U UZORKU	$\text{mg/mL}$ U UZORKU
1	0.120	1120.00	1.120
2	0.137	1304.21	1.304

UZORCI UKUPNIH MEMBRANSKIH PROTEINA HIPOKAMPUSA			
Broj uzorka	Srednja vrijednost apsorbancije	$\mu\text{g/mL}$ U UZORKU	$\text{mg/mL}$ U UZORKU
1	0.126	1188.42	1.1884
2	0.113	1051.58	1.0516



#### 4.7.5. Analiza proteina *Western blotting* metodom

Položaj IR- $\alpha$ , ObR, Np te APP utvrđen je *Western blotting* metodom u odnosu na biljege lipidnih splavi – protein flotilin (Flot) i gangliozyd GM1 (detektiran podjedinicom B kolera toksina) te na biljeg ostatka stanične membrane – transferinski receptor (TfR) (slika 4.7.5.1). *Western blotting* metodom analizirano je nekoliko vrsta uzoraka izdvojenih iz tkiva hipokampusa i maloga mozga: frakcije izolata lipidnih splavi i lipidnih ne-splavi, ukupni citosolni proteini (za detekciju GR, IR- $\beta$  te ER- $\alpha$ ) te ukupni membranski proteini (za detekciju IR- $\alpha$ , ObR, APP i neuroplastina).



**Slika 4.7.5.1.** Prikaz reprezentativnog rezultata biljega lipidnih splavi i nesplavi *Western blottingom*. Biljezi lipidnih splavi – Flot i CTB (GM1) uočeni su u najvećoj mjeri u frakcijama 3 i 4, a biljeg nesplavi – Tfr, odnosno ostatka stanične membrane uočen je u frakcijama 10 i 11.

Protokol *Western blotting* metode je sljedeći:

Iz supernatanta dobivenog nakon prvog ultracentrifugiranja pripremljeni su uzorci za analizu citosolnih proteina maloga mozga i hipokampusa visokospecifičnim primarnim protutijelima koja se vežu za GR, IR- $\beta$  i ER- $\alpha$ . Uzorci su pripremljeni uzimanjem volumena koji sadrži 15  $\mu$ g proteina te miješanjem s 5  $\mu$ l pufera za uzorke (Novex NuPage LDS



sample buffer 4x; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) prethodno pomiješanog s reducirajućim agensom (NuPage sample reducing buffer; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) u omjeru pufer za uzorke: reducirajući agens = 2:1. Pripremljena je smjesa inkubirana 5 min na 95°C na termogrijaču (Eppendorf Thermomixer Compact; Eppendorf, Hamburg, Njemačka).

Uzorci ukupnih membranskih proteina pripremljeni su iz taloga nakon prvog ultracentrifugiranja te su analizirani visokospecifičnim primarnim protutijelima koja se vežu za IR- $\alpha$ , ObR, Np i APP. Uzorci su pripremljeni uzimanjem volumena koji sadrži 15  $\mu$ g proteina te su pomiješani s 5  $\mu$ l pufera za uzorke (Novex NuPage LDS sample buffer 4x; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) prethodno pomiješanog s reducirajućim agensom u omjeru pufer za uzorke:reducirajući agens = 2:1. Pripremljena je smjesa inkubirana 5 min na 95°C na termogrijaču.

Smještaj odabranih membranskih proteina, unutar ili izvan lipidnih splavi, analiziran je u uzorcima lipidnih splavi i uzorcima ne-splavi visokospecifičnim primarnim protutijelima koja se vežu za IR- $\alpha$  ObR, Np i APP. Po 15  $\mu$ L frakcije je pomiješano s 5  $\mu$ L pufera za uzorke prethodno pomiješanog s reducirajućim agensom.

#### Elektroforetsko razdvajanje proteina

Svaki je uzorak nanesen u jažicu poliakrilamidnog gela za elektroforezu: 4-12% BisTris gelovi izrađeni su za analizu citosolnih proteina, dok su za analizu ukupnih membranskih proteina te proteina lipidnih splavi i nesplavi izrađeni gelovi korištenjem TGX Stain-Free FastCast seta (BioRad, Hercules, CA, SAD). U prvu je jažicu uvijek nanesen proteinski standard (Page Ruler Protein Ladder, 180 kDa, Thermofisher, Waltham, MA, SAD ili Precision Plus Dual Color Marker; Bio-Rad, Hercules, CA, SAD). Elektroforeza je trajala 80 minuta pri naponu od 120 V.

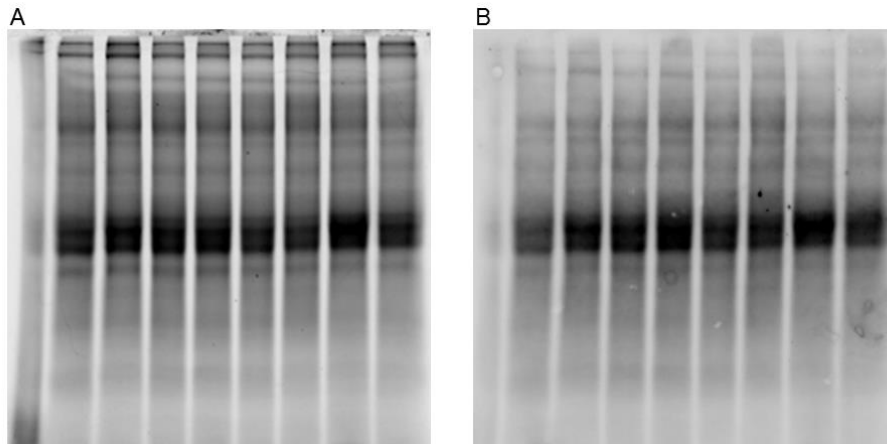
#### Prijenos proteina na membranu za 4-12% Bis Tris gelove

Po završetku elektroforeze u slučaju analize citosolnih proteina, gel s elektroforetski razdvojenim proteinima priljubljen je na PVDF (engl. *Polyvinyl difluoride*) membranu veličina pora 0.45  $\mu$ m, a proteini su preneseni na membranu pomoću NuPage Mini Blot

sustava za polusuhi prijenos proteina (ThermoFisher, Waltham, MA, SAD). Prijenos proteina na membranu izveden je u puferu za transfer tijekom 1h na 30V.

#### Prijenos proteina na membranu za TGX Stain-Free gelove

TGX Stain-Free gelovi ne zahtijevaju analizu proteina unutarnje kontrole. Nakon elektroforeze proteina, gel se prenese u Chemidoc sustav te se fluorescentno detektiraju ukupni proteini razdvojeni na gelu. To je omogućeno detekcijom aminokiseline triptofana koja je prisutna u većine proteina, a na koju su vezane trihalo komponente gela (slika 4.7.5.2. A). Dobivene se slike pohranjuju u digitalnom obliku. Prijenos proteina na PVDF membranu odvija se kao i u slučaju analize citosolnih proteina na standardnim poliakrilamidnim gelovima s tim što se nakon postupka membrana prenese u Chemidoc sustav gdje se vizualiziraju ukupni preneseni proteini na PVDF membranu, a slike se pohranjuju za daljnju kvantifikaciju rezultata (slika 4.7.5.2.B).



**Slika 4.7.5.2.** Reprezentativni prikaz gela TGX Stain-Free Fast Cast nakon aktivacije (A) te membrane nakon prijenosa proteina. Vizualizirano u sustavu BioRad Chemidoc u računalnom programu Image Lab.

#### Imunodetekcija

Nakon prijenosa na membranu uslijedila je imunodetekcija. Nespecifične reakcije blokirane su otopinom 5% nemasnog mlijeka u prahu u PBS puferu s Tween deterdžentom (PBST) ili 3% BSA u PBST puferu u slučaju APP protutijela. Nakon koraka blokiranja, membrana je inkubirana u otopini primarnog protutijela (GR, ER- $\alpha$ , IR- $\beta$ , IR- $\alpha$ ,

APP te Np) preko noći na tresilici pri temperaturi od +4°C u razrjeđenjima prikazanima u tablici 4.7.1.1. Nakon ispiranja membrane, 4 puta tijekom 10 minuta u PBST puferu uslijedila je inkubacija s odgovarajućim sekundarnim protutijelom (tablica 4.7.1.2) konjugiranim s HRP tijekom 1h na sobnoj temperaturi. Vizualizacija je provedena korištenjem seta kemikalija za kemiluminiscentnu detekciju (Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Thermo Scientific, Waltham, MA, SAD) prema uputama proizvođača, a vidljivi je signal vizualiziran korištenjem Biorad Chemidoc XRS<sup>+</sup> sustava (Biorad, Hercules, CA, SAD). Dobivene su slike pohranjene u digitalnom obliku za kasniju analizu. Učinkovitost prijenosa proteina provjerena je bojanjem gela *Coomassie* bojom (Coomassie Brilliant Blue G-250, Thermo Scientific, Waltham, MA, SAD). Gel je inkubiran preko noći.

#### Kvantitativna analiza citosolnih proteina

Kako bi se kvantitativno analizirao izražaj citosolnih proteina (GR, IR- $\beta$  te ER- $\alpha$ ) korišten je Fiji računalni program u kojemu je denzitometrijom analizirana pojedinačna proteinska vrpca. Analiza je izvedena na sljedeći način (slika 4.7.5.3):

1. U računalni program Fiji unesena je slika rezultata u TIFF digitalnom obliku naredbom *Alatna traka izbornika/File/Open/Odabir slike*;
2. U alatnoj je traci izbornika odabran oblik *Rectangular*, pomoću kojega na slici obilježio pravokutnik unutar kojega su se nalazili signali proteinskih vrpca za analizu;
3. Uspostavljena je površina za analizu naredbom *Alatna traka izbornika/Analyze/Gels/Select first lane*;
4. Iz uspostavljene površine za analizu dobiven je grafički prikaz izražaja proteinskih vrpca naredbom *Alatna trana izbornika/Analyze/Gels/Plot lanes*;

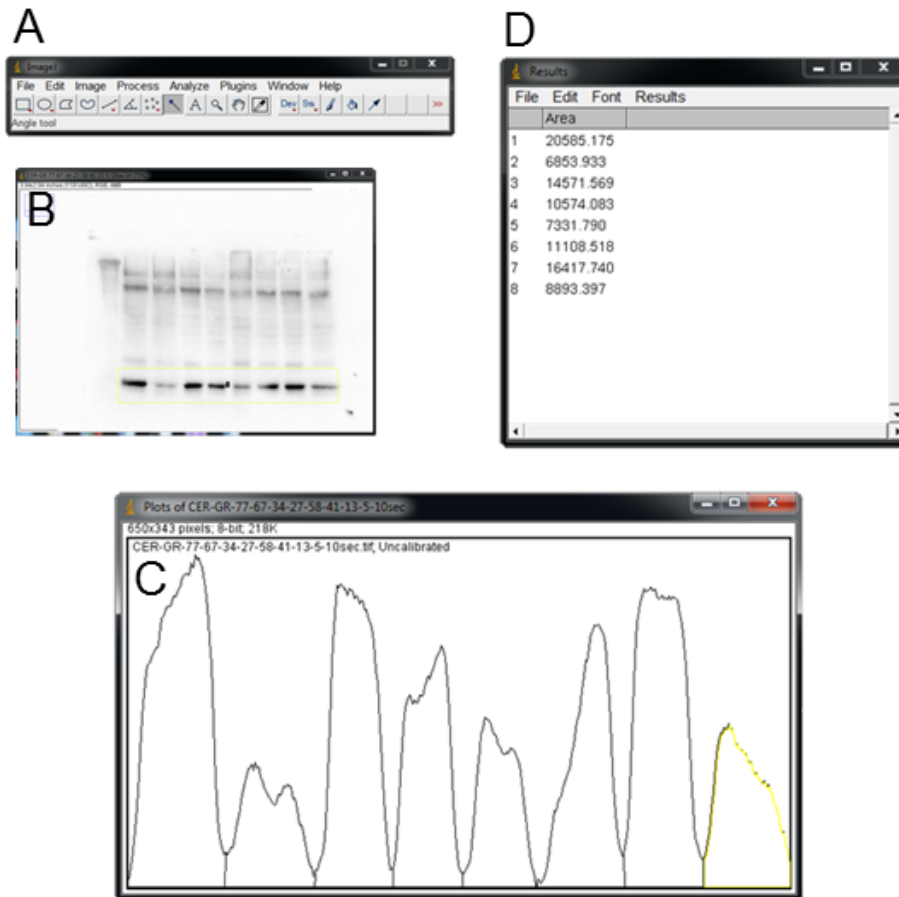
5. Iz grafičkog su prikaza pojedinim proteinskim vrpama pridružene vrijednosti odgovarajućih površina pod krivuljom povlačenjem vertikalnih granica između proteinske vrpce svakog uzorka naredbom *Alatna traka izbornika/Straight*;

6. Uspostavljene su pojedinačne površine svake proteinske vrpce naredbom *Alatna traka izbornika/Wand*;

7. Dobivene su vrijednosti površine pojedine proteinske vrpce iz ukupne površine ispod krivulje naredbom *Alatna traka izbornika/Analyze/Gels/Label/Peaks*;

8. Rezultati su ispisani u novom prozoru te su korišteni za izračun izražaja svakog od analiziranih proteina u svim skupinama životinja.

Na isti je način analiziran protein korišten kao unutarnja kontrola – gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH) ili  $\beta$ -tubulin te je detektirani signal normaliziran računanjem omjera signala istraživanog proteina i proteina unutarnje kontrole.

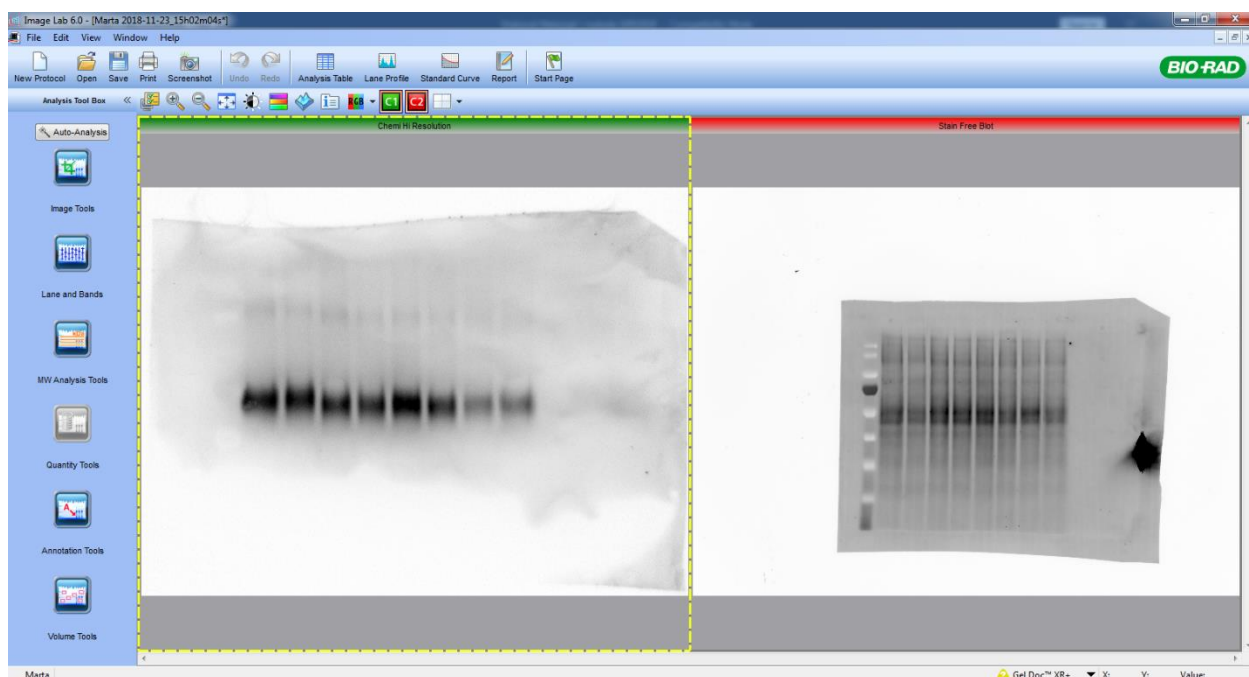


**Slika 4.7.5.3.** Primjer kvantitativne analize *Western blottinga* citosolnih proteina u računalnom programu Fiji. U alatnoj se traci odabiru naredbe (A) kojima se obilježi područje za analizu (B), potom se rezultat prikazuje grafički (C) te u obliku tablice (D).

#### Kvantitativna analiza ukupnih membranskih te proteina lipidnih spavi i nesplavi

Kako bi se kvantitativno analizirao izražaj IR- $\alpha$ , ObR, Np te APP u ukupnim membranskim proteinima te odredio njihov smještaj u lipidnim splavima ili izvan njih korišten je javno dostupan ImageLab 6.0 računalni program kompatibilan s Chemidoc sustavom za vizualizaciju. Za kvantitativnu su se analizu koristile slike ukupnih proteina te pojedinačnih signala istraživanih proteina. Analiza je izvedena na sljedeći način (slika 4.7.5.4 i 4.7.5.5):

1. U računalni program ImageLab unesena je slika ukupnih proteina te pojedinačno analiziranih proteina od interesa. Slike su unesene u program u TIFF digitalnom obliku naredbom *Alatna traka izbornika/File/Open/Odabir slike*;
2. Potom se slike pripreme za obradu odabirom naredbe *Alatna traka izbornika/File/Create Multi Channel Image*. Nakon otvaranja novog prozora ukloni se oznaka s kućice RGB te u prozoru ostaju dvije slike – ona ukupnih proteina te proteinskih vrpce pojedinačno analiziranog proteina.

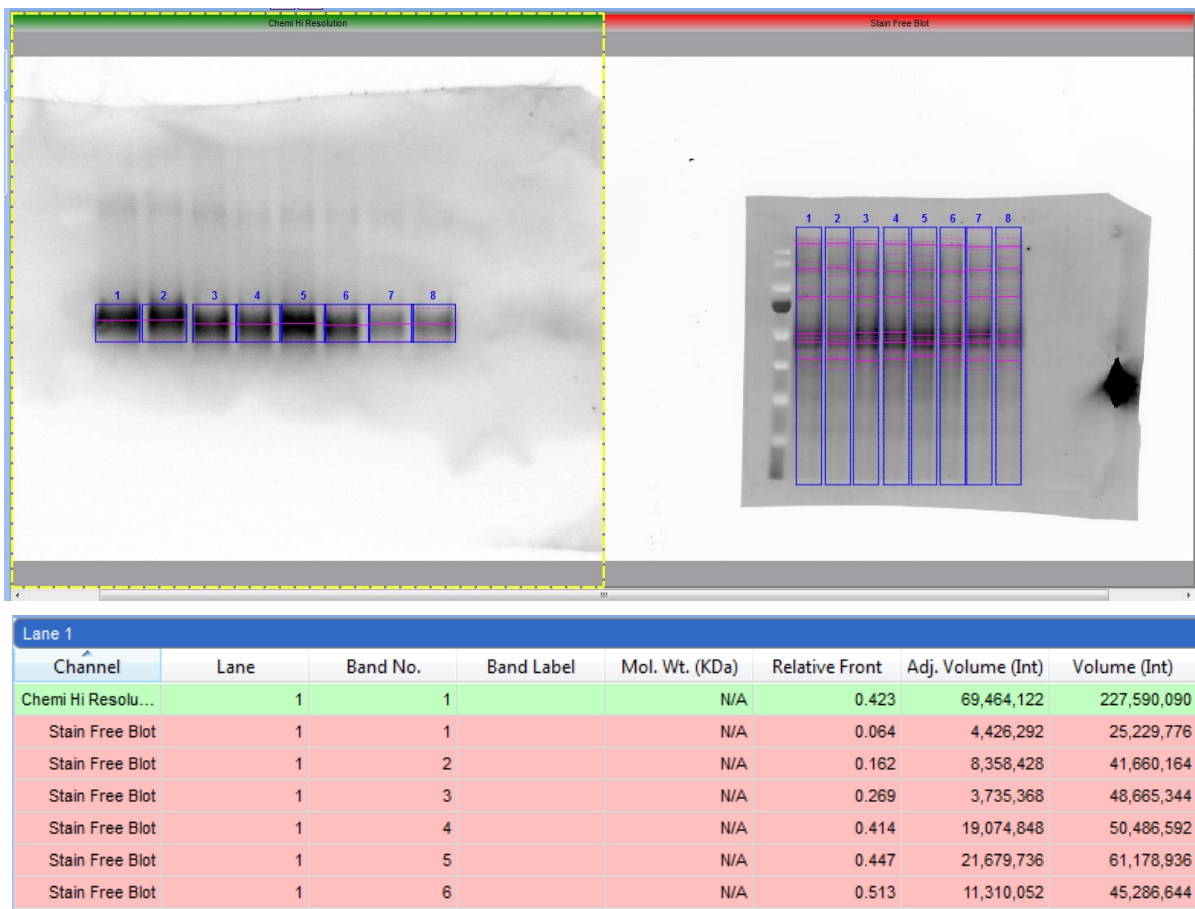


**Slika 4.7.5.4.** Prikaz sučelja ImageLab 6.0 računalnog programa te izgleda pripremljenih slika za obradu. Na lijevoj je strani primjer pojedinačno analiziranih proteinskih vrpce neuroplastina, a na desnoj primjer ukupnih proteina na istoj PVDF membrani.

3. Potom se u lijevom dijelu alatne trake odabire naredba *Lane and Bands* i na svakoj se slici automatski ili ručno označuju širine i visine jažica koje će se analizirati naredbama *Automatic* odnosno *Manual*;
4. Nakon označavanja jažica, analiziraju se signali proteinskih vrpce odabirom naredbe *Bands*. Automatska detekcija proteinskih vrpce vrši se naredbom *Detect*, a ručna detekcija

vrši se korištenjem alata *Add* kojim se pojedinačno ručno označava svaka proteinska vrpca za analizu (slika 4.7.4.5);

5. Potom se u alatnoj traci odabire naredba *Analysis Table* koja ispisuje dobivene podatke koji se mogu pohraniti u obliku Excel dokumenta (slika 4.7.4.5).



**Slika 4.7.5.5.** Primjer označavanja područja za analizu (gore lijevo) i ukupnih signala za obradu (gore desno) te dobivenih podataka za konačni izračun (dolje) u računalnom programu ImageLab 6.0.

6. Iz dobivene se tablice koriste vrijednosti intenziteta signala. Vrijednost intenziteta pojedinačno analizirane proteinske vrpce podijeli se s intenzitetom ukupnih proteinskih vrpca, a dobivena se vrijednost dalje koristi za statističku obradu.

#### 4.8. Korištene otopine

U izradi disertacije korištene su kupljene ili otopine pripremljene u laboratoriju. Popis korištenih otopina naveden je u tablici 4.8.1.

**Tablica 4.8.1.** Popis i sastav korištenih otopina i pufera

Naziv otopine	Kratica	Kemijski sastav
10%-tna, 20%-tna i 30%-tna otopina saharoze u PBS puferu	fiksacijske otopine saharoze	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4; 0. 292 M saharoze za 10%-tnu otopinu, 0.584 M za 20%-tnu otopinu 0.876 M za 30%-tnu otopinu
4% paraformaldehyd	4% PFA	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4, 4% paraformaldehyd
Elektroforetski pufer	<i>Running</i> pufer	25 mM Tris, 192 mM glicin, 0,1% natrij dodecil sulfat
Fosfatni pufer s dodatkom deterdženta Tween-a	PBST	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,1% Tween-20
Fosfatni pufer	PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4
Homogenizacijski pufer za izolaciju proteina	<i>Raft</i> -pufer	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM CaCl <sub>2</sub> , 1 mM PMSF, 5 mM NaF, 1mM NaVO <sub>4</sub> , 1% otopina proteaznih inhibitora
Otopina za inhibiciju endogenih peroksidaza	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1%-tna otopina H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> u dH <sub>2</sub> O
Otopina za krioprotekciju rezova	de Olmos otopina	100 mM fosfatni pufer (pH 7,2), 30% w/v saharoza, 1% w/v PVP-40, 30% v/v etilen glikol
Otopina za određivanje koncentracije proteina prema Bradfordu	Bradfordov reagens	1%-tna otopina Coomasie Brilliant plave boje, 5% (v/v) metanol, 8,5% (v/v) H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
Otopina za protokol određivanja koncentracije proteina prema Lowryju	Lowryjev reagens	0,005% CuSO <sub>4</sub> , 0,02% K,Na-tartarat 2% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> u 0,1 M NaOH
Pufer za prenošenje proteina s gela na membranu	<i>Transfer</i> pufer	25 mM Tris, 192 mM glicin, 20% (v/v) metanol
Reagens za određivanje proteina metodom prema Lowryju	Folin-Ciocalteu reagens	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O



#### 4.9. Statističke analize

Za statističke analize korišten je računalni program Statistica 12 (TIBCO, Palo Alto, CA SAD). Normalnost distribucije podataka testirala se Shapiro-Wilk testom. U slučaju normalne raspodjele rezultata u populaciji, za testiranje značajnosti razlike između dva uzorka koristio se t-test. Odabir vrste t-testa ovisio je o veličini i o tome jesu li uzorci zavisni ili nezavisni. U slučaju kada raspodjela rezultata nije bila normalna zaključivanje o razlikama među distribucijama dvaju nezavisnih neprekidnih slučajnih varijabli temeljilo se na osnovi Mann-Whitney-Wilcoxonova testa. U slučaju više od dva uzorka, a ovisno o prirodi rezultata, koristile su se parametrijska ili neparametrijska analiza varijance (ANOVA). Kao neparametrijska analiza za više nezavisnih uzoraka koristio se Kruskal-Wallisov test, a u slučaju više zavisnih uzoraka koristio se Friedmanov test. U svim analizama p-vrijednost je određena s  $p < 0.05$  ili  $p < 0.001$ . Za svaku statističku analizu koristio se uzorak u minimalnom biološkom triplikatu.

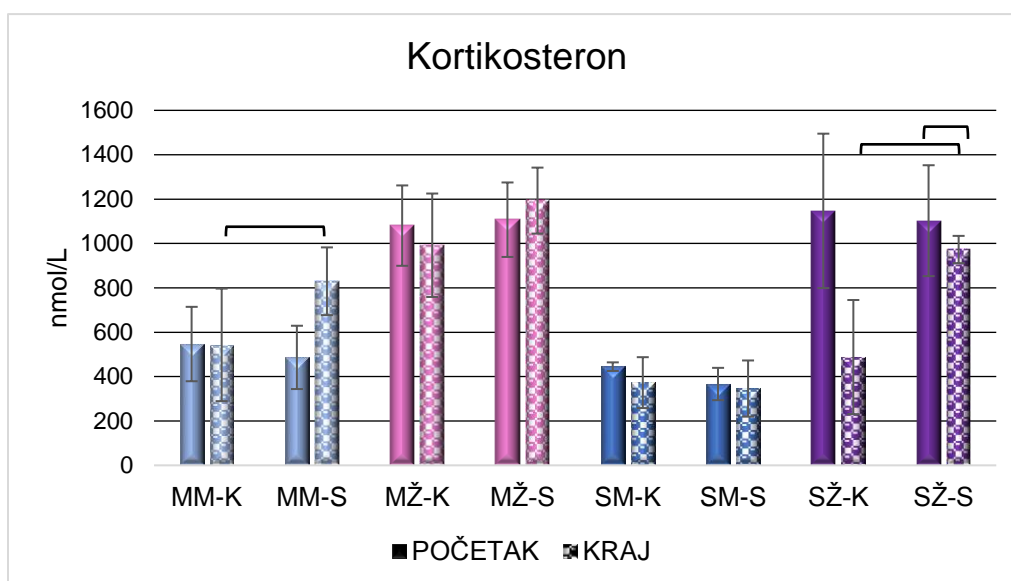
## 5. REZULTATI

## 5.1 Analiza steroidnih hormona iz seruma

Spektrometrijom masa određena je koncentracija kortikosterona, progesterona i testosterona u 5 seruma iz svake skupine životinja na početku studije te na dan žrtvovanja. Usporedbe između dviju različitih skupina u istom vremenskom intervalu mjerenja statistički su analizirane Mann Whitneyevim testom, a za usporedbu uzoraka iz iste životinje na početku i kraju studije korišten je Wilcoxonov test.

### 5.1.1 Određivanje koncentracije kortikosterona

Koncentracija kortikosterona u serumu najviše se mijenja pod utjecajem kroničnog stresa u mladih mužjaka i starijih ženki (slika 5.1.1.1).

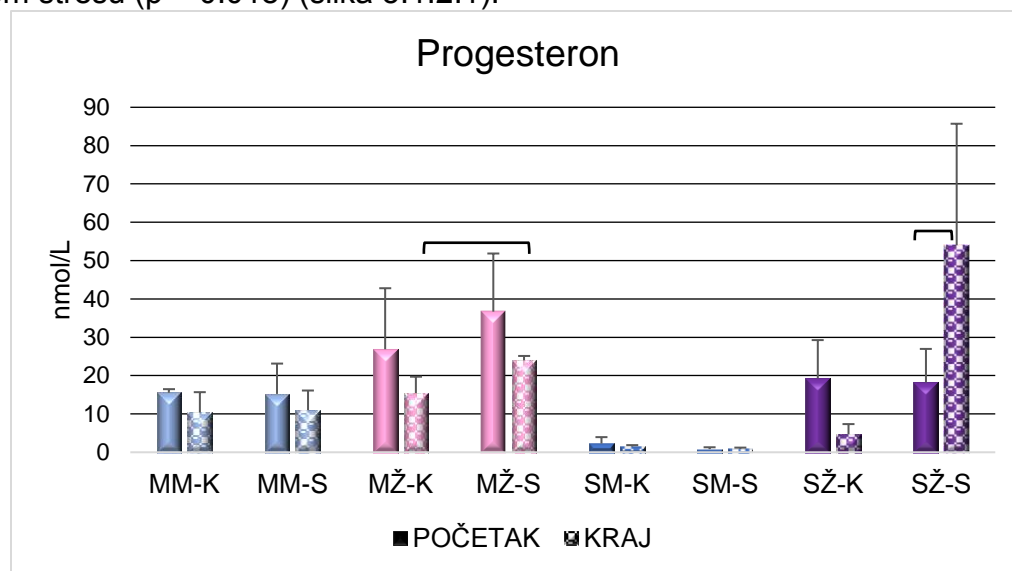


**Slika 5.1.1.1.** Grafički prikaz vrijednosti kortikosterona u serumu izmjenjenih spektrometrijom masa u svih skupina štakora na početku te na kraju studije (tijekom žrtvovanja). Stupići u jednoj boji prikazuju mjerenje na početku studije dok stupići s uzorkom predstavljaju mjerenje na kraju studije tijekom žrtvovanja. Zaobljenim su crtama označene statistički značajne razlike;  $p < 0.05$ . Za statističku je analizu usporedbi između dvaju različitih skupina u istoj točki mjerenja korišten Mann Whitneyev test, a za usporedbu uzoraka seruma iz iste životinje na početku i kraju studije korišten je Wilcoxonov test za parove ovisnih uzoraka; MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu.

Rezultati pokazuju dramatično povećanje kortikosterona na kraju studije u skupini starijih ženki pod utjecajem kroničnog stresa u usporedbi s odgovarajućom kontrolnom skupinom ( $p = 0.036$ ) te također u usporedbi početnog i krajnjeg mjerenja ( $p = 0.009$ ). Mladi mušjaci također pokazuju povećane koncentracije kortikosterona prema kraju studije u usporedbi s početnim mjerenjem ( $p = 0.008$ ). U mladih ženki i starijih mužjaka ne dolazi do promjene koncentracije kortikosterona pod utjecajem kroničnog stresa.

### 5.1.2. Određivanje koncentracije progesterona

Koncentracija progesterona u serumu povećala se u starijih ženki nakon izlaganja kroničnom stresu ( $p = 0.018$ ) (slika 5.1.2.1).

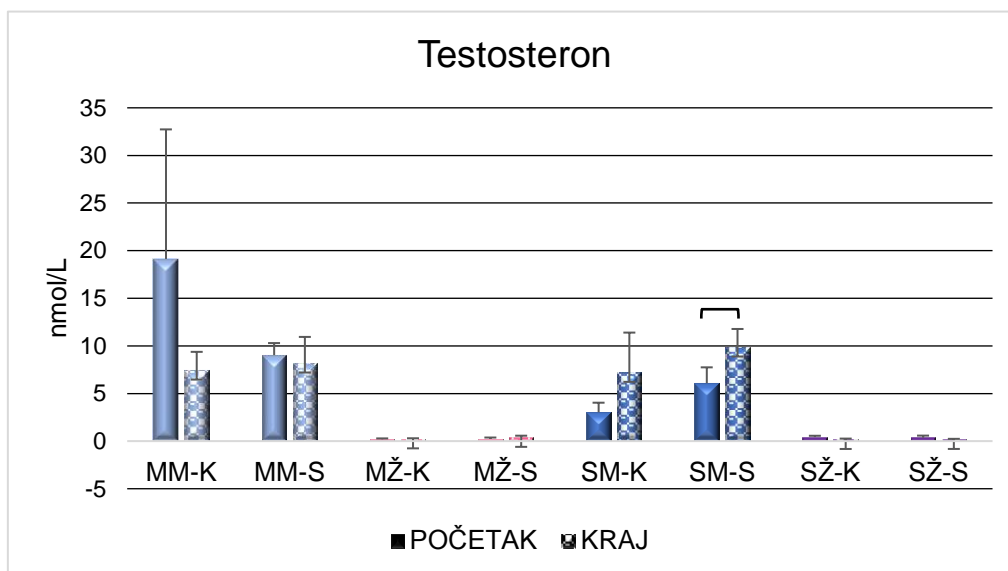


**Slika 5.1.2.1.** Grafički prikaz vrijednosti koncentracija progesterona u serumu izmjerenih spektrometrijom masa u svih skupina štakora na početku te na kraju studije (tijekom žrtvovanja). Stupići u jednoj boji prikazuju mjerenje na početku studije dok stupići s uzorkom predstavljaju mjerenje na kraju studije tijekom žrtvovanja. Zaobljenim su crtama označene statistički značajne razlike;  $p < 0.05$ . Za statističku je analizu usporedbi između dviju različitih skupina u istoj točki mjerenja korišten Mann Whitneyev test, a za usporedbu uzoraka seruma iz iste životinje na početku i kraju studije korišten je Wilcoxonov test za parove ovisnih uzoraka; MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu.

Koncentracije progesterona u serumu u mladih se ženki smanjuju pod utjecajem stresa ( $p = 0.03$ ), no ne toliko dramatično kao u starijih ženki. Koncentracije progesterona su niske tijekom početnog mjerenja u mužjaka, a ne mijenjaju se pod utjecajem kroničnog stresa.

### 5.1.3. Određivanje koncentracije testosterona

U serumu ženskih skupina uočene su niske koncentracije testosterona koje se tijekom studije ne mijenjaju. U kontrolnim skupinama mladih mužjaka izmjerena je najviša bazalna koncentracija testosterona koja opada prema kraju studije, a najveća je promjena uočena u skupini starijih mužjaka izloženih kroničnom stresu koji pokazuju povećanje testosterona u usporedbi s odgovarajućom kontrolnom skupinom ( $p = 0.012$ ) (slika 5.1.3.1).

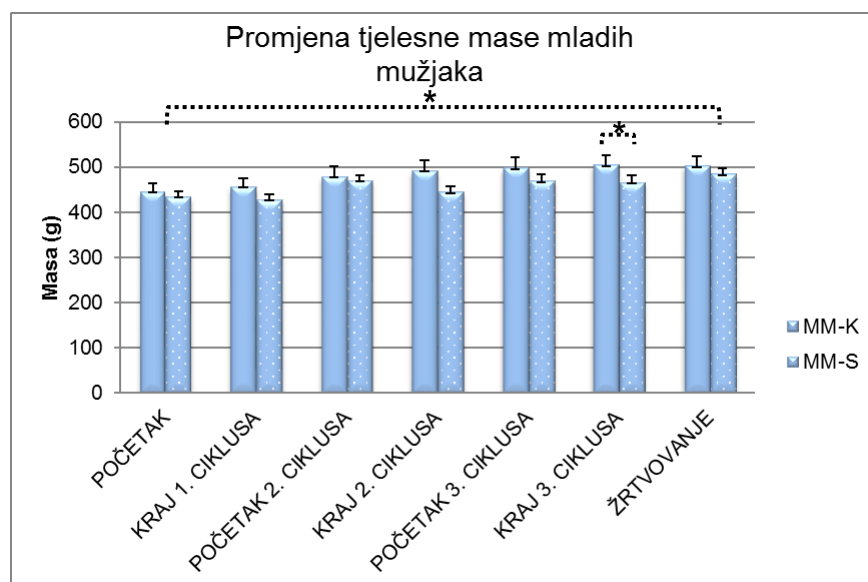


**Slika 5.1.3.1.** Grafički prikaz koncentracija testosterona u serumu izmjerenih spektrometrijom masa svih skupina štakora na početku te na kraju studije (tijekom žrtvovanja). Stupići u jednoj boji prikazuju mjerenje na početku studije dok stupići s uzorkom predstavljaju mjerenje na kraju studije tijekom žrtvovanja. Zaobljenim su crtama označene statistički značajne razlike;  $p < 0.05$ . Za usporedbu uzoraka seruma iz iste životinje na početku i kraju studije korišten je Wilcoxonov test za parove ovisnih uzoraka; MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu.

## 5.2 Promjene tjelesne mase tijekom studije

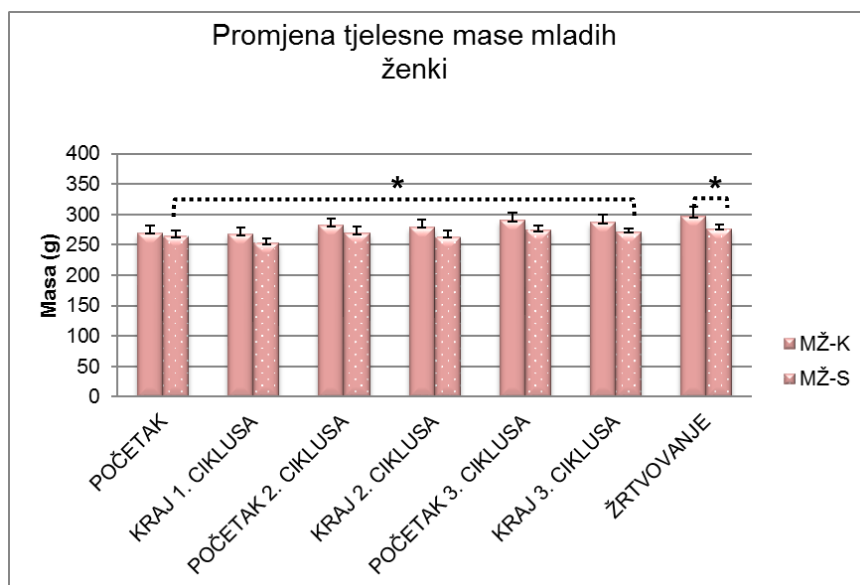
### 5.2.1. Promjena tjelesne mase u mladim životinja pod utjecajem kroničnog stresa

Mlade skupine životinja pokazuju statistički značajno blago povećanje tjelesne mase na dan žrtvovanja (u slučaju mužjaka – slika 5.2.1.1) te na kraju studije (u slučaju ženki – slika 5.2.1.2) u usporedbi s početnim vrijednostima. Dobivene su razlike utvrđene Mann Whitneyevim testom ( $p = 0.005$  u slučaju mužjaka,  $p = 0.015$  u slučaju ženki). S obzirom da se radi o mladim životinjama utvrđeno blago povećanje tjelesne mase moguće je objasniti normalnim rastom životinja koje bi se utvrdilo neovisno o utjecaju kroničnog stresa.



**Slika 5.2.1.1.** Grafički prikaz promjena tjelesne mase mladih mužjaka tijekom studije. Stupići u jednoj boji prikazuju kontrolnu skupinu dok stupići s točkicama prikazuju skupinu kroničnog stresa. Za statističku je usporedbu korišten Mann Whitneyev test;  $p < 0.05$ . Zvezdicom su označeni statistički značajni rezultati. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu.

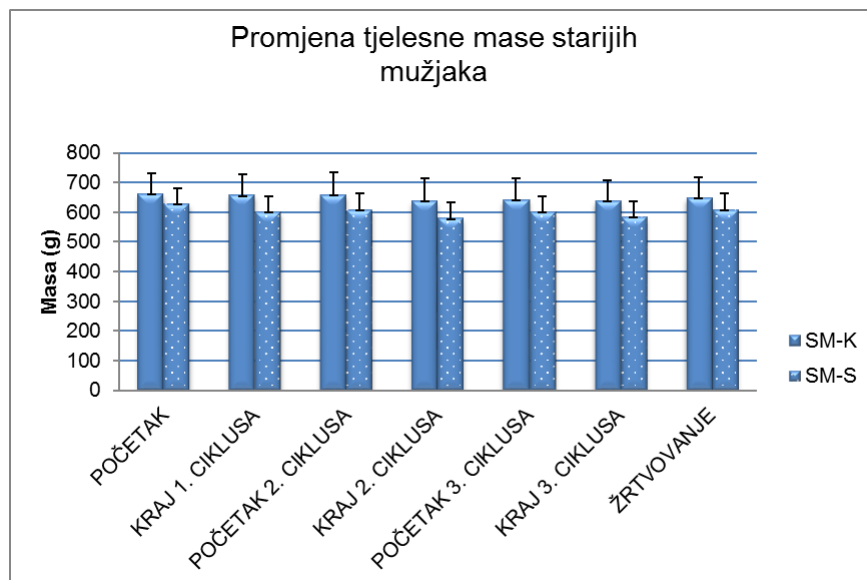
Osim razlike između početka i kraja studije utvrđeno je i statistički značajno smanjenje tjelesne mase Mann Whitneyevim testom u obje skupine izložene stresu u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama po završetku 3. ciklusa kroničnog stresa (u slučaju mužjaka,  $p = 0.001$ ) te na dan žrtvovanja (u slučaju ženki,  $p = 0.002$ ).



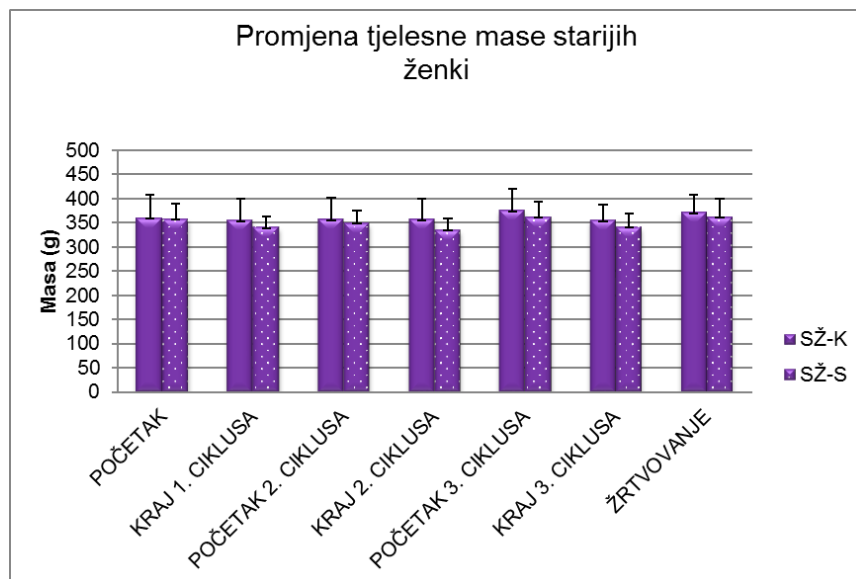
**Slika 5.2.1.1.** Grafički prikaz promjena tjelesne mase mladih ženki tijekom studije. Stupići u jednoj boji prikazuju kontrolne skupine dok stupići s točkicama prikazuju skupinu kroničnog stresa. Za statističku je usporedbu korišten Mann Whitneyev test;  $p < 0.05$ . Zvezdicom su označeni statistički značajni rezultati. MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MM-S = skupina mladih ženki izloženih stresu.

### 5.2.2. Promjena tjelesne mase u starijih životinja pod utjecajem kroničnog stresa

Za razliku od mladih skupina štakora, starije životinje pokazuju spolno specifične promjene tjelesne mase pod utjecajem stresa. U usporedbi početne točke pokusa te kraja pokusa (u slučaju mužjaka – slika 5.2.2.1) ili dana žrtvovanja životinja (u slučaju ženki – slika 5.2.2.2) mužjaci pokazuju smanjenje tjelesne mase dok u ženki nije primijećena promjena tjelesne mase.



**Slika 5.2.2.1.** Grafički prikaz promjena tjelesne mase starijih mužjaka tijekom studije. Stupići u jednoj boji prikazuju kontrolne skupine dok stupići s točkicama prikazuju skupine kroničnog stresa. Usporedbom prikazanih podataka nije uspostavljena statistička značajnost. SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu.

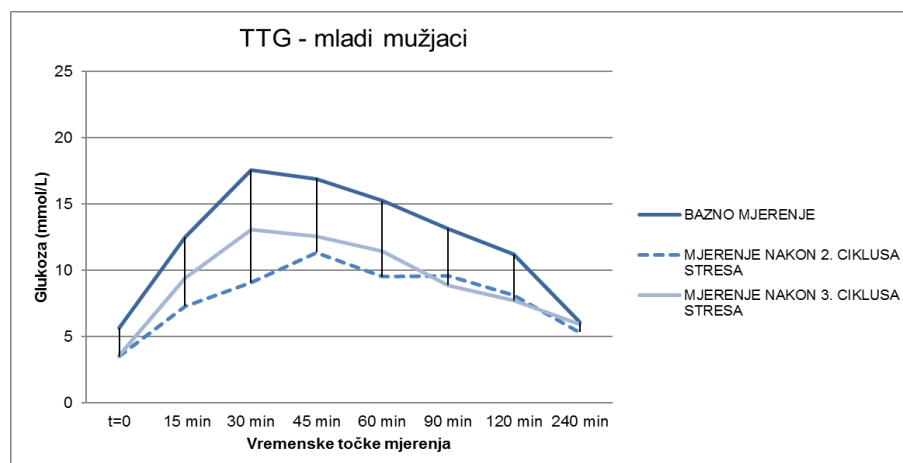


**Slika 5.2.2.2.** Grafički prikaz promjena tjelesne mase starijih ženki tijekom studije. Stupići u jednoj boji prikazuju kontrolne skupine dok stupići s točkicama prikazuju skupine kroničnog stresa. Usporedbom prikazanih podataka nije uspostavljena statistička značajnost. SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu.



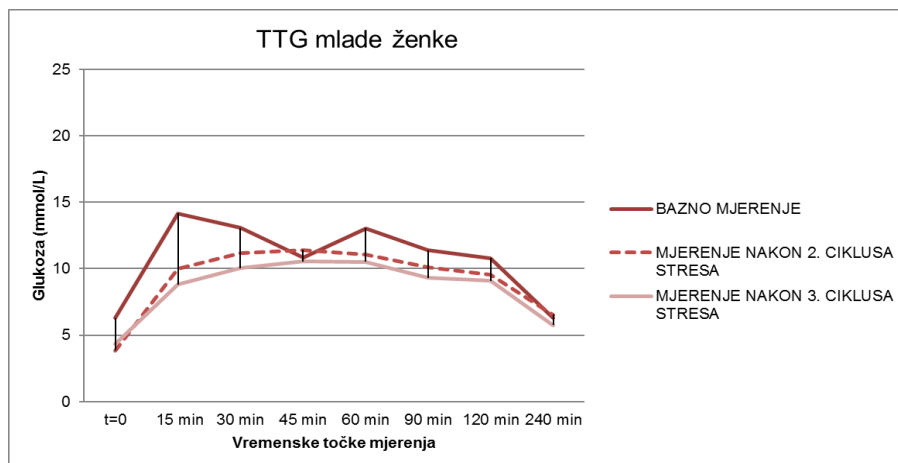
### 5.3.1 Usporedba tolerancije opterećenja glukozom pod utjecajem stresa u mladim životinja

Test tolerancije na glukozu proveden je tri puta samo u skupinama životinja pod utjecajem kroničnog stresa – prije početka prvog ciklusa kroničnog stresa te nakon drugog i trećeg ciklusa stresa. U mladim je životinja uočena relativno normalna bazalna tolerancija na glukozu, no u usporedbi s preostala dva mjerenja, tolerancija se prema kraju studije poboljšala (slika 5.3.1.1 i 5.3.1.2). Za statističku analizu korištene su izračunate ukupne površine pod dobivenom grafičkom krivuljom, a izračun statističkih značajnosti dobiven je Wilcoxonovim testom.



SKUPINA MLADIH MUŽJAKA IZLOŽENIH STRESU	STATISTIČKA ANALIZA POVRŠINA POD KRIVULJOM		
	BAZNO ODREĐIVANJE/ POČETAK 2. CIKLUSA	BAZNO ODREĐIVANJE/ POČETAK 3. CIKLUSA	POČETAK 2. CIKLUSA/ POČETAK 3. CIKLUSA
p-vrijednost	0.018	0.018	0.042

**Slika 5.3.1.1.** Grafički prikaz rezultata testa tolerancije na glukozu u skupini mladih mužjaka izloženih kroničnom stresu. Statistički značajni rezultati određeni su Wilcoxonovim testom ( $p < 0.05$ ) i prikazani su u tablici ispod grafičkog prikaza.

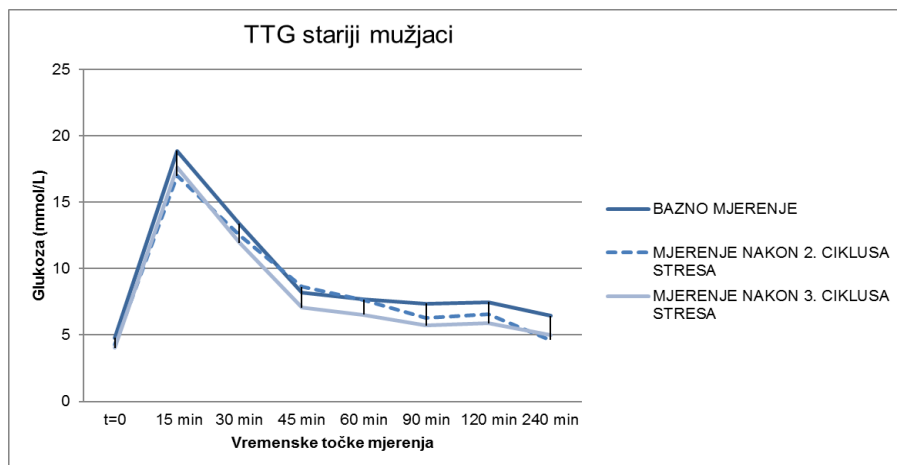


SKUPINA MLADIH ŽENKI IZLOŽENIH STRESU	STATISTIČKA ANALIZA POVRŠINA POD KRIVULJOM		
	BAZNO ODREĐIVANJE/ POČETAK 2. CIKLUSA	BAZNO ODREĐIVANJE/ POČETAK 3. CIKLUSA	POČETAK 2. CIKLUSA/ POČETAK 3. CIKLUSA
p-vrijednost	0.018	0.018	0.018

**Slika 5.3.1.2.** Grafički prikaz rezultata testa tolerancije na glukozu u skupini mladih ženki izloženih kroničnom stresu. Statistički značajni rezultati određeni su Wilcoxonovim testom ( $p < 0.05$ ) i prikazani su u tablici ispod grafičkog prikaza.

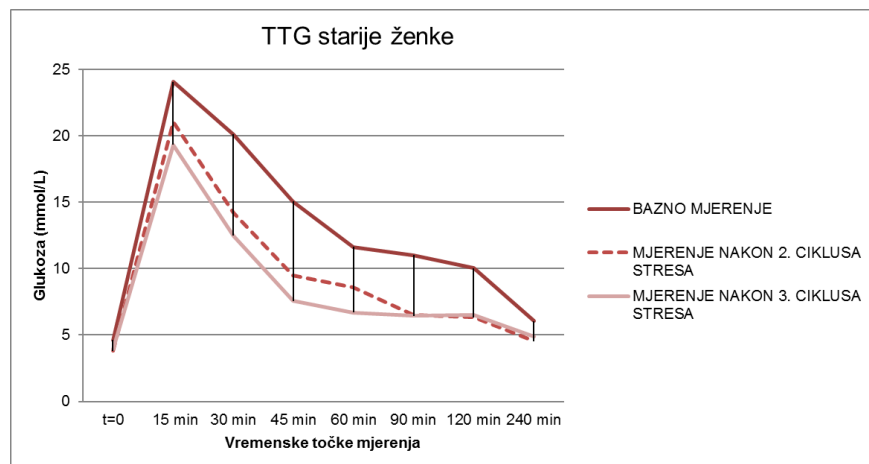
### 5.3.2 Usporedba tolerancije opterećenja glukozom pod utjecajem stresa u starijih životinja

U starijim se skupinama životinja izloženima kroničnom stresu tolerancija glukoze također poboljšava prema kraju studije no drukčijim obrascem nego u mladih životinja (slika 5.3.2.1 i 5.3.2.2). U starijih skupina životinja, glukoza postiže najveće vrijednosti u 15. minuti mjerenja te naglo opada pri kraju testa.



SKUPINA STARIJIH MUŽJAKA IZLOŽENIH STRESU	STATISTIČKA ANALIZA POVRŠINA POD KRIVULJOM		
	BAZNO ODREĐIVANJE/ POČETAK 2. CIKLUSA	BAZNO ODREĐIVANJE/ POČETAK 3. CIKLUSA	POČETAK 2. CIKLUSA/ POČETAK 3. CIKLUSA
p-vrijednost	0.028	0.018	X

**Slika 5.3.2.1.** Grafički prikaz rezultata testa tolerancije na glukozu u skupini starijih mužjaka izloženih kroničnom stresu. Statistički značajni rezultati određeni su Wilcoxonovim testom ( $p < 0.05$ ) i prikazani su u tablici ispod grafičkog prikaza.

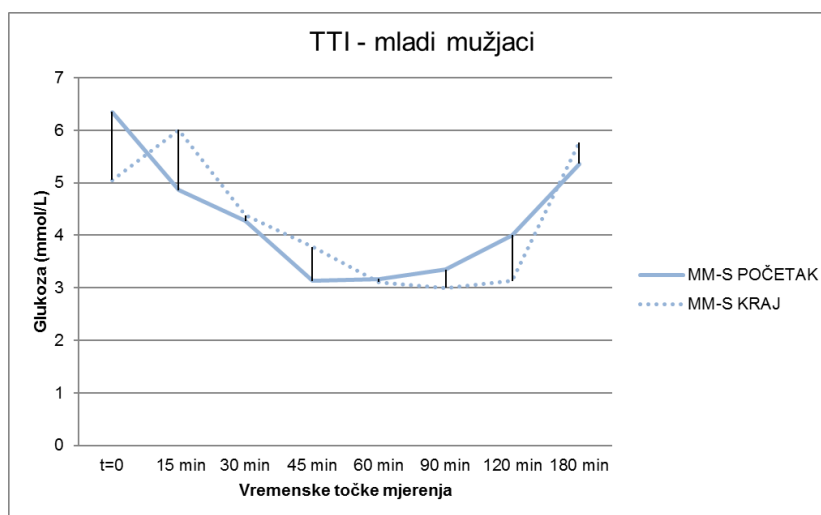


SKUPINA STARIJIH ŽENKI IZLOŽENIH STRESU	STATISTIČKA ANALIZA POVRŠINA POD KRIVULJOM		
	BAZNO ODREĐIVANJE/ POČETAK 2. CIKLUSA	BAZNO ODREĐIVANJE/ POČETAK 3. CIKLUSA	POČETAK 2. CIKLUSA/ POČETAK 3. CIKLUSA
p-vrijednost	0.018	0.018	X

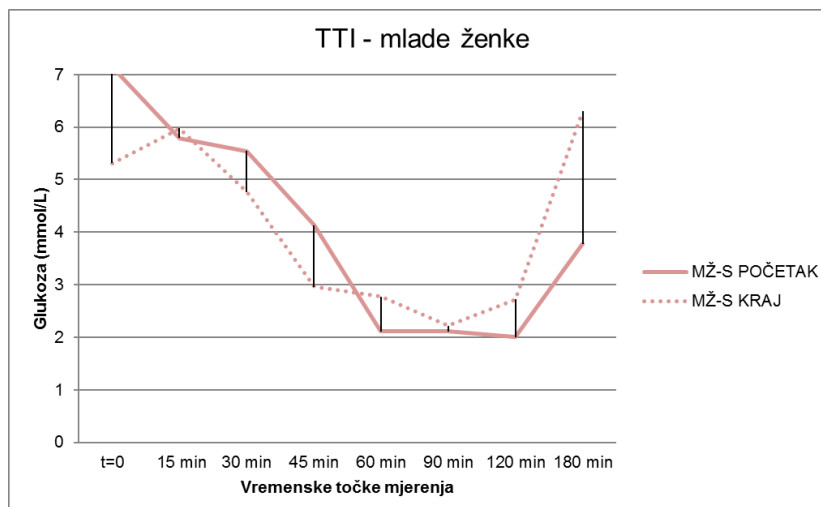
**Slika 5.3.2.2.** Grafički prikaz rezultata testa tolerancije na glukozu u skupini starijih ženki izloženih kroničnom stresu. Statistički značajni rezultati određeni su Wilcoxonovim testom ( $p < 0.05$ ) i prikazani su u tablici ispod grafičkog prikaza.

### 5.3.3 Tolerancija na inzulin u mladih životinja pod utjecajem kroničnog stresa

Test tolerancije na inzulin proveden je dva puta – na početku i kraju studije, samo u skupinama kroničnog stresa. U mladim mužjaka i ženki krivulja nakon opterećenja inzulinom pokazuje nepravilan trend na kraju studije (slika 5.3.3.1.1 i 5.3.3.2). U mladim su mužjaka bazalne vrijednosti glukoze smanjene pod utjecajem kroničnog stresa u usporedbi s početnim mjerenjem. U zadnjoj točki mjerenja (180. minuta) vrijednosti glukoze u krvi veće su nego na početku testa. U mladim ženki trend je sličan mladim mužjacima s nešto većim koncentracijama glukoze pri kraju testa. U mladim skupina nije postignuta statistička značajnost utvrđenih promjena. Primjenom Wilcoxonova testa nisu dobiveni statistički značajni rezultati opisanih rezultata.



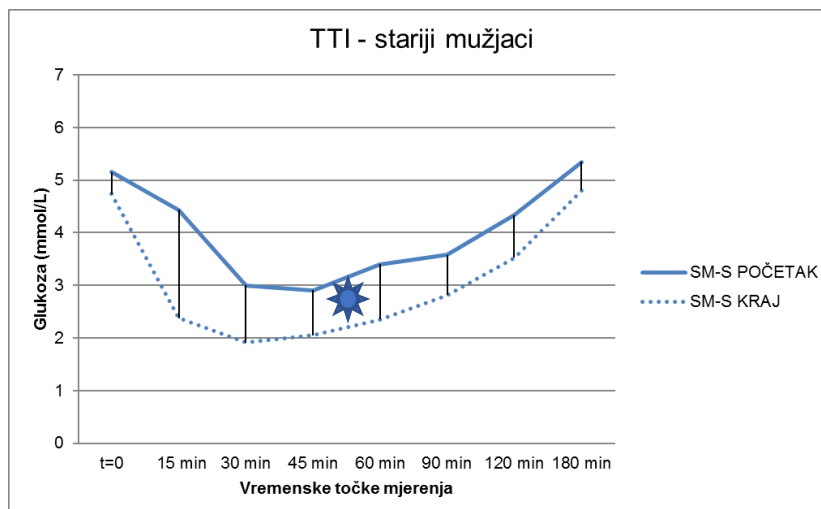
**Slika 5.3.3.1.** Grafički prikaz testa tolerancije na inzulin u mladim mužjaka na početku i na kraju studije. Krivulje punih linija pokazuju trend prije početka ciklusa kroničnog stresa, a istočkane linije pokazuju trend tolerancije na inzulin nakon završetka studije. Nije utvrđena statistički značajna promjena usporedbe površine pod dobivenom krivuljom. MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu.



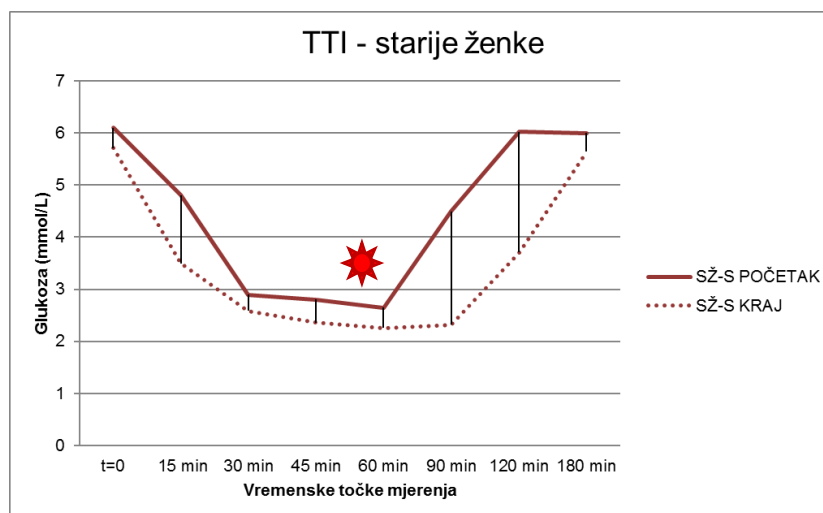
**Slika 5.3.3.2.** Grafički prikaz testa tolerancije na inzulin u mladim ženki na početku i na kraju studije. Krivulje punih linija pokazuju trend prije početka ciklusa kroničnog stresa, a istočkane linije pokazuju trend tolerancije na inzulin nakon završetka studije. Nije utvrđena statistički značajna promjena usporedbe površine pod dobivenom krivuljom. MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu.

#### 5.3.4. Tolerancija na inzulin u starijih životinja pod utjecajem kroničnog stresa

Opterećenje inzulinom u starijih se životinja također poboljšava pod utjecajem kroničnog stresa (slika 5.3.4.1 i 5.3.4.2). Poboljšanje pokazuje statističku značajnost usporedbom ukupnih površina pod krivuljom na početku i kraju studije u mužjaka i ženki ( $p = 0.018$  u obje skupine). Izračun statističkih značajnosti dobiven je Wilxonovim testom.



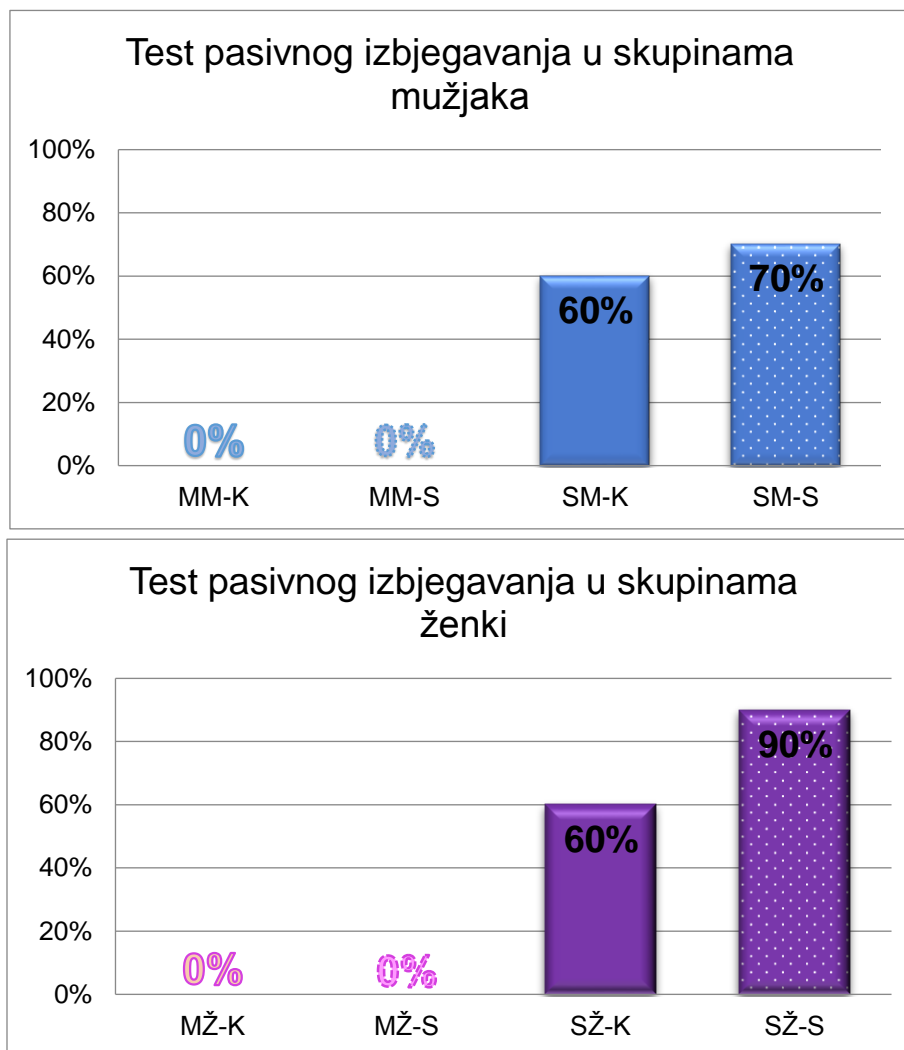
**5.3.4.1.** Grafički prikaz testa tolerancije na inzulin u starijim mušjacima na početku i na kraju studije. Krivulje punih linija pokazuju trend prije početka ciklusa kroničnog stresa, a istočkane linije pokazuju trend tolerancije na inzulin nakon završetka studije. Utvrđena je statistički značajna promjena usporedbe površine pod dobivenom krivuljom Wilcoxonovim testom, a zvjezdicom je označena statistički značajna promjena;  $p < 0.05$ . SM-S = skupina starijih mušjaka izloženih stresu.



**5.3.4.2.** Grafički prikaz testa tolerancije na inzulin u starijim ženjkama na početku i na kraju studije. Krivulje punih linija pokazuju trend prije početka ciklusa kroničnog stresa, a istočkane linije pokazuju trend tolerancije na inzulin nakon završetka studije. Utvrđena je statistički značajna promjena usporedbe površine pod dobivenom krivuljom Wilcoxonovim testom, a zvjezdicom je označena statistički značajna promjena;  $p < 0.05$ . SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu.

### 5.4 Test za praćenje promjene pamćenja – pasivno izbjegavanje

U svim je skupinama životinja odmah po završetku trećeg ciklusa kroničnog stresa utvrđena promjena pamćenja bihevioralnim testom pasivnog izbjegavanja. Rezultati testa izraženi su u obliku postotaka i grafički prikazani na slici 5.4.1.



**Slika 5.4.1.** Grafički prikaz rezultata testa pasivnog izbjegavanja u svim skupinama životinja izvedenog na kraju studije (mužjaci – gornja slika, ženke – donja slika). Prikazani su rezultati trećeg dana testiranja u obliku postotka ulazaka životinja u tamnu sobicu uređaja. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu.

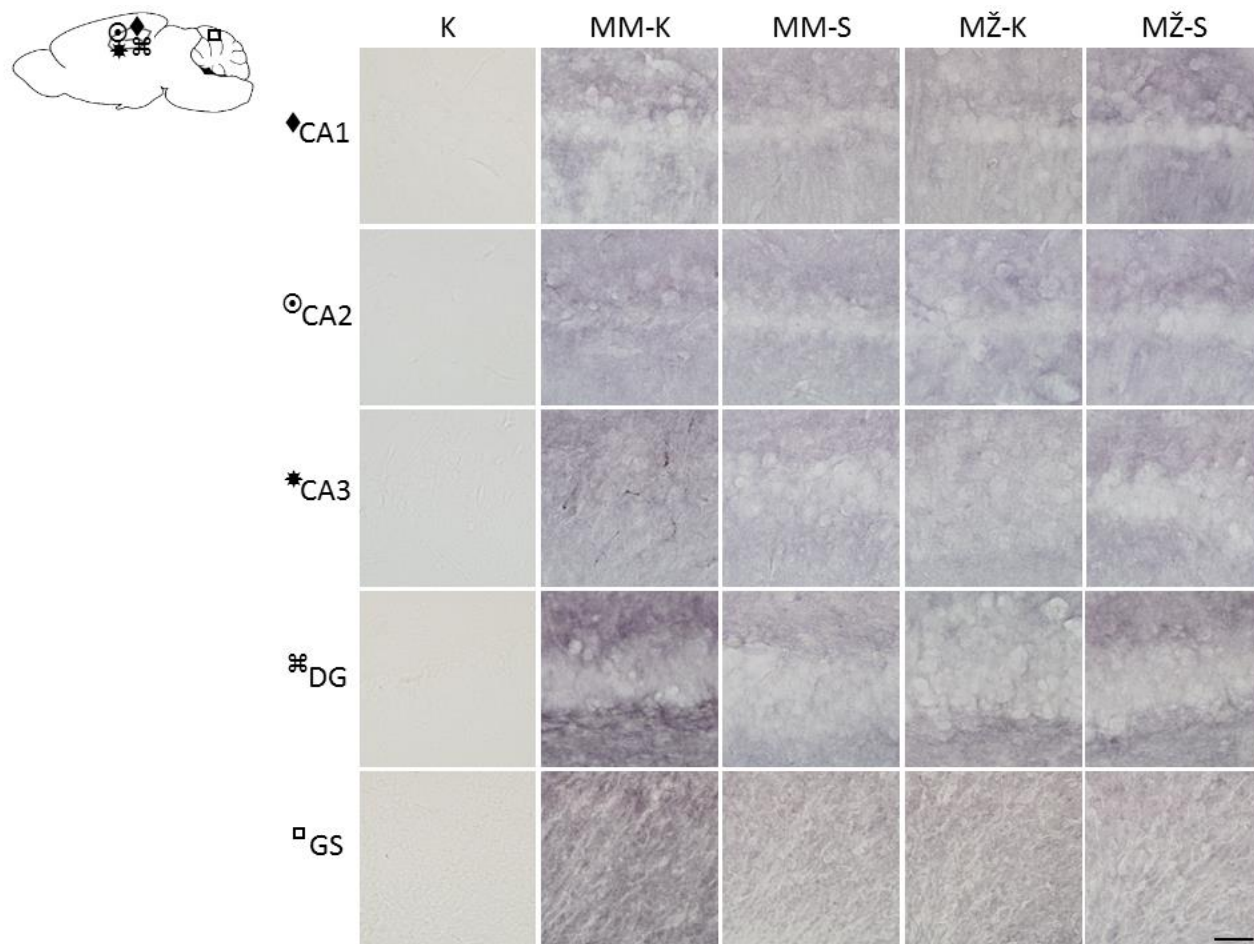
Skupine mladih životinja ne pokazuju promjene pamćenja pod utjecajem kroničnog stresa te niti jedna životinja iz mladih skupina ne ponavlja ulazak u tamnu sobicu tijekom trećeg dana testa. U starih se mužjaka već u kontrolnoj skupini pojavljuje poremećaj pamćenja koji se može pripisati normalnom kongitivnom propadanju koje se odvija tijekom starenja, a u skupini koja je bila izložena kroničnom stresu taj je učinak povećan no bez postizanja statističke značajnosti. U starijoj se kontrolnoj skupini ženki može uočiti identičan trend kao i u starijih mužjaka no u skupini koja je bila izložena stresu uočava se još snažniji poremećaj pamćenja. Statistička značajnost između pojedinih skupina izloženih stresu te odgovarajućih kontrolnih skupina nije utvrđena.

## **5.5. Imunohistokemijska analiza izražaja proteina**

### **5.5.1. Izražaj $\alpha$ -podjedinice inzulinskog receptora i leptinskog receptora u hipokampusu i malom mozgu**

Inzulinski receptor (IR) je primarno izražen u CA1 i DG području hipokampusa mužjaka i ženki štakora neovisno o dobi i utjecaju kroničnog stresa. U mladim je životinjama izražaj IR manji nego u starijih životinja (slika 5.5.1.1 i 5.5.1.3). Najveći izražaj IR uočen je u starijim štakorima koji nisu izloženi kroničnom stresu što je vidljivo u svim regijama hipokampusa (slika 5.5.1.2 i 5.5.1.3), a moglo bi se protumačiti kako su oni najosjetljiviji na varijaciju glukoze u krvi.

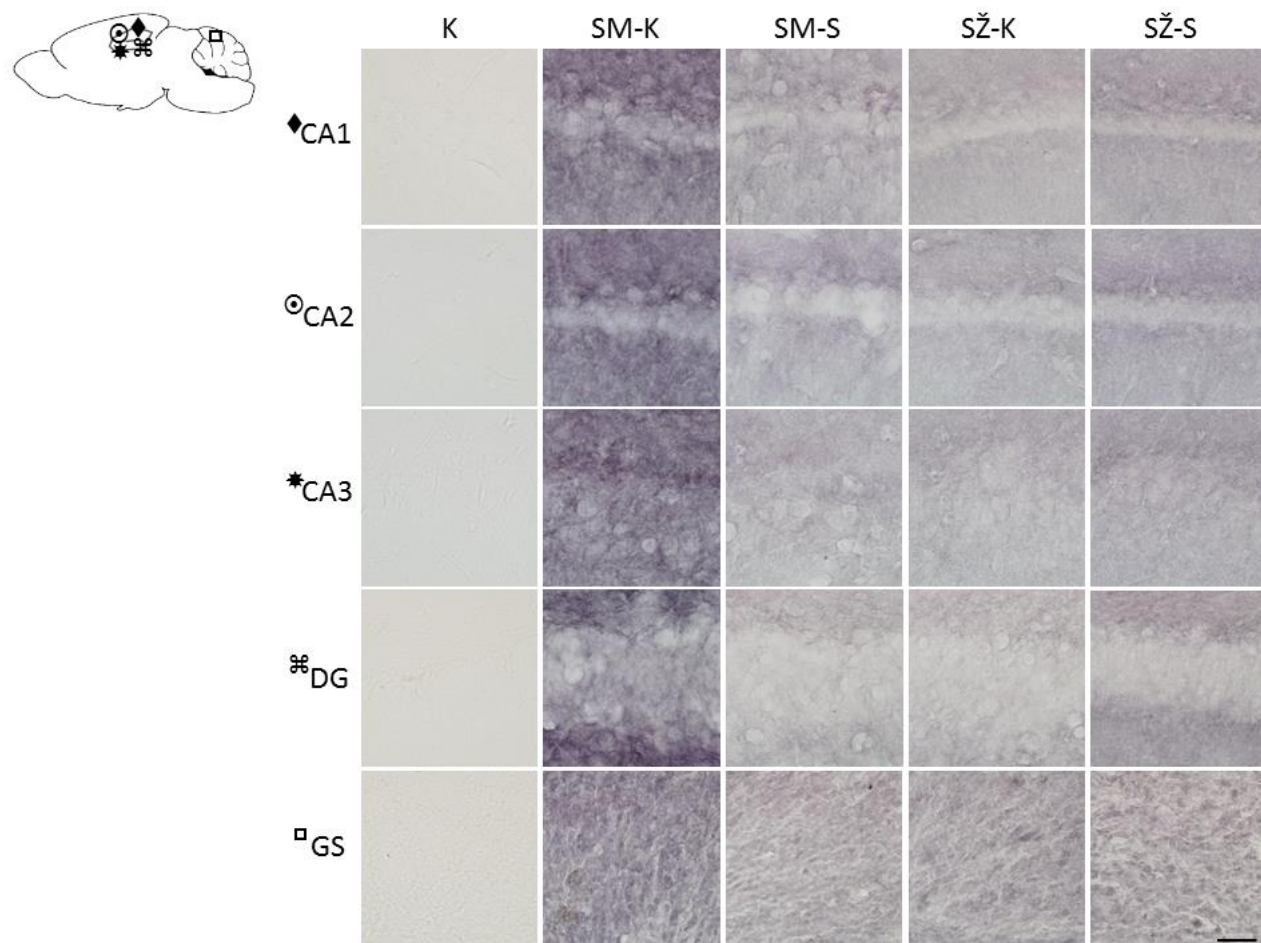




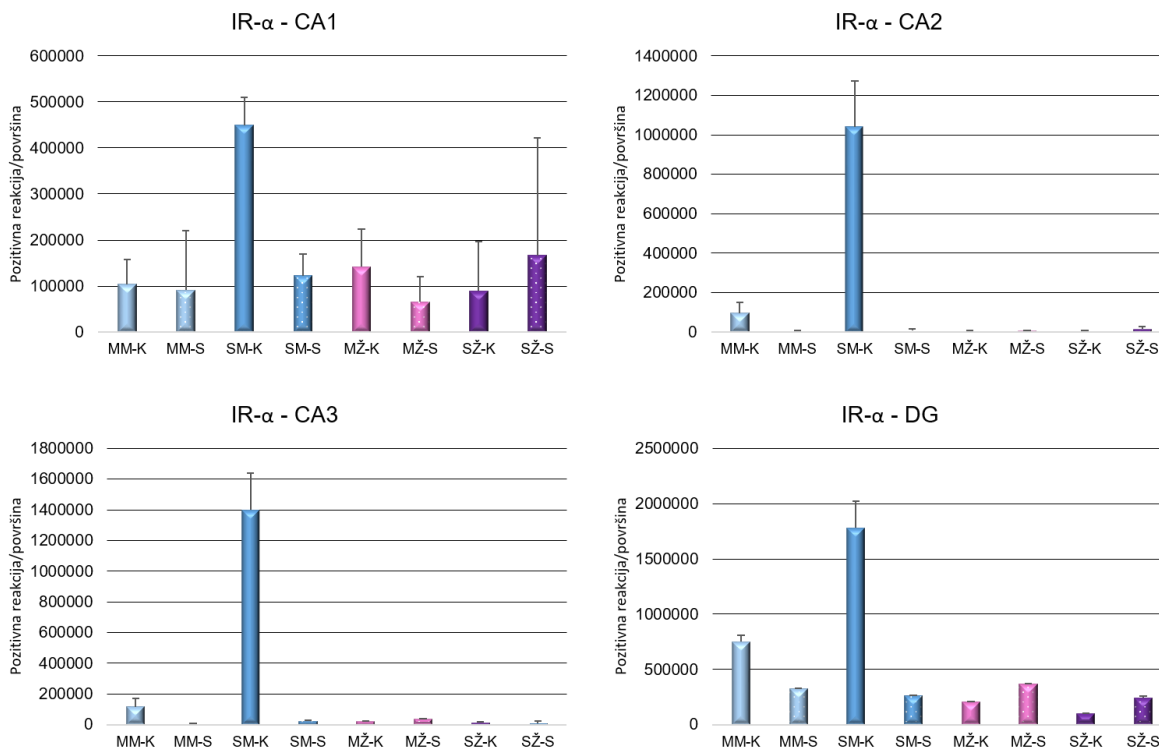
**Slika 5.5.1.1.** Izražaj  $\alpha$ -podjedinice inzulinskog receptora u hipokampusu i malom mozgu mladih mužjaka i ženki štakora. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, K = kontrolno bojanje, oznaka veličine = 50  $\mu$ m, DG = dentatni girus, GS = granularni sloj malog mozga, IR- $\alpha$  =  $\alpha$ -podjedinica inzulinskog receptora.

U starijih štakora koji su izloženi kroničnom stresu uočen je trend znatnog smanjenja izražaja, što bi odgovaralo smanjenju osjetljivosti na promjene koncentracije glukoze u krvi, ali se nije utvrdila statistička značajnost rezultata. Dobiveni rezultati pokazuju da neovisno o spolu i dobi u cjelokupnom hipokampusu nema značajne promjene izražaja IR kao posljedice kroničnog stresa (slika 5.5.1.3).

Jednako kao i u hipokampusu, u granularnom sloju malog mozga najveći izražaj IR opažen je u skupini starijih mužjaka koji nisu bili izloženi kroničnom stresu. U granularnom sloju malog mozga izražaj IR je neovisan o spolu, dobi i izloženosti kroničnom stresu (slika 5.5.1.3). Zbog nedovoljnog broja bioloških replikata, dobivene razlike u području malog mozga nisu statistički analizirane.

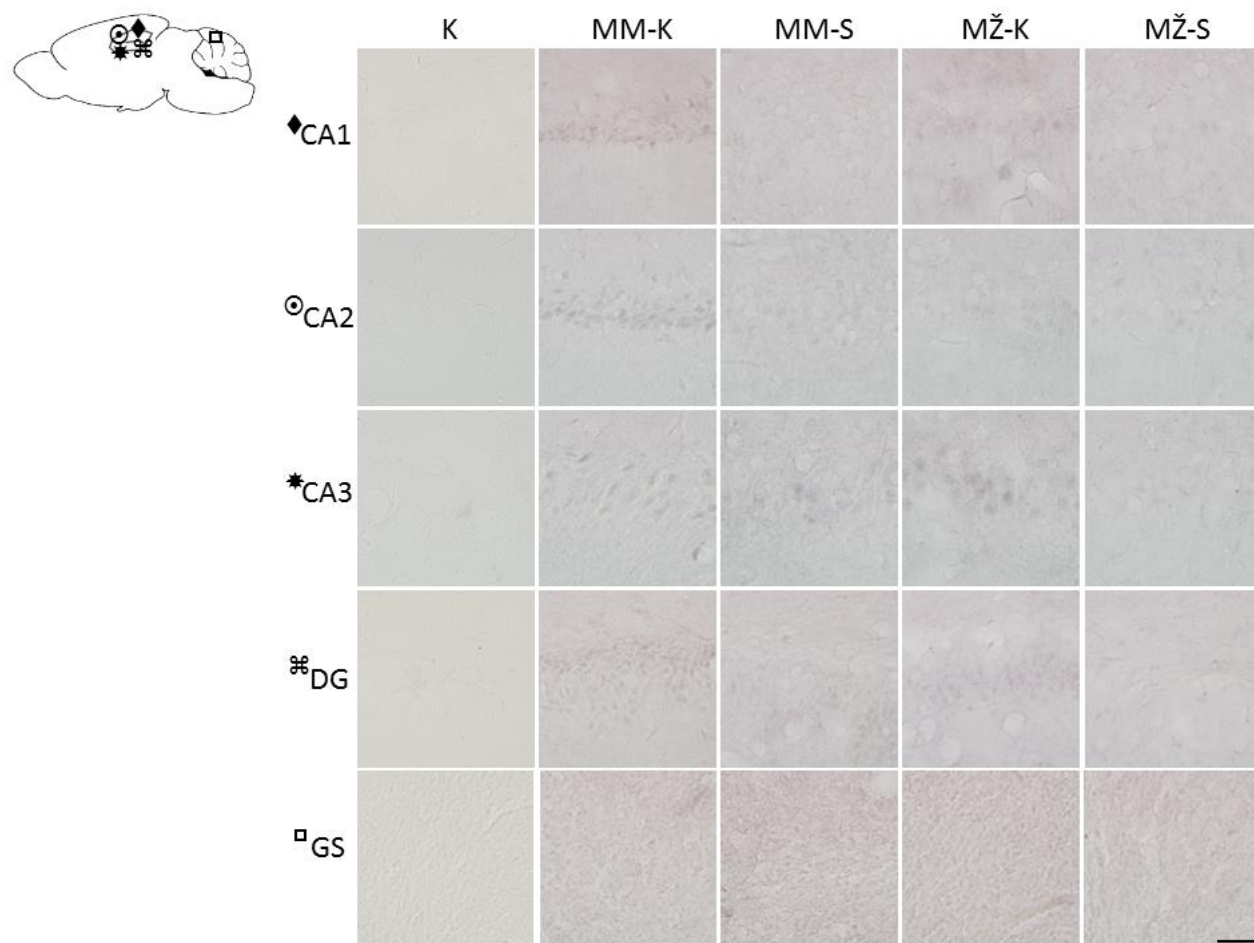


**Slika 5.5.1.2.** Izražaj  $\alpha$ -podjedinice inzulinskog receptora u hipokampusu i malom mozgu starijih mužjaka i ženki štakora. SM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, SM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, SŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, K = kontrolno bojanje, oznaka veličine = 50  $\mu$ m, DG = dentatni girus, GS = granularni sloj malog mozga, IR- $\alpha$  =  $\alpha$ -podjedinica inzulinskog receptora.



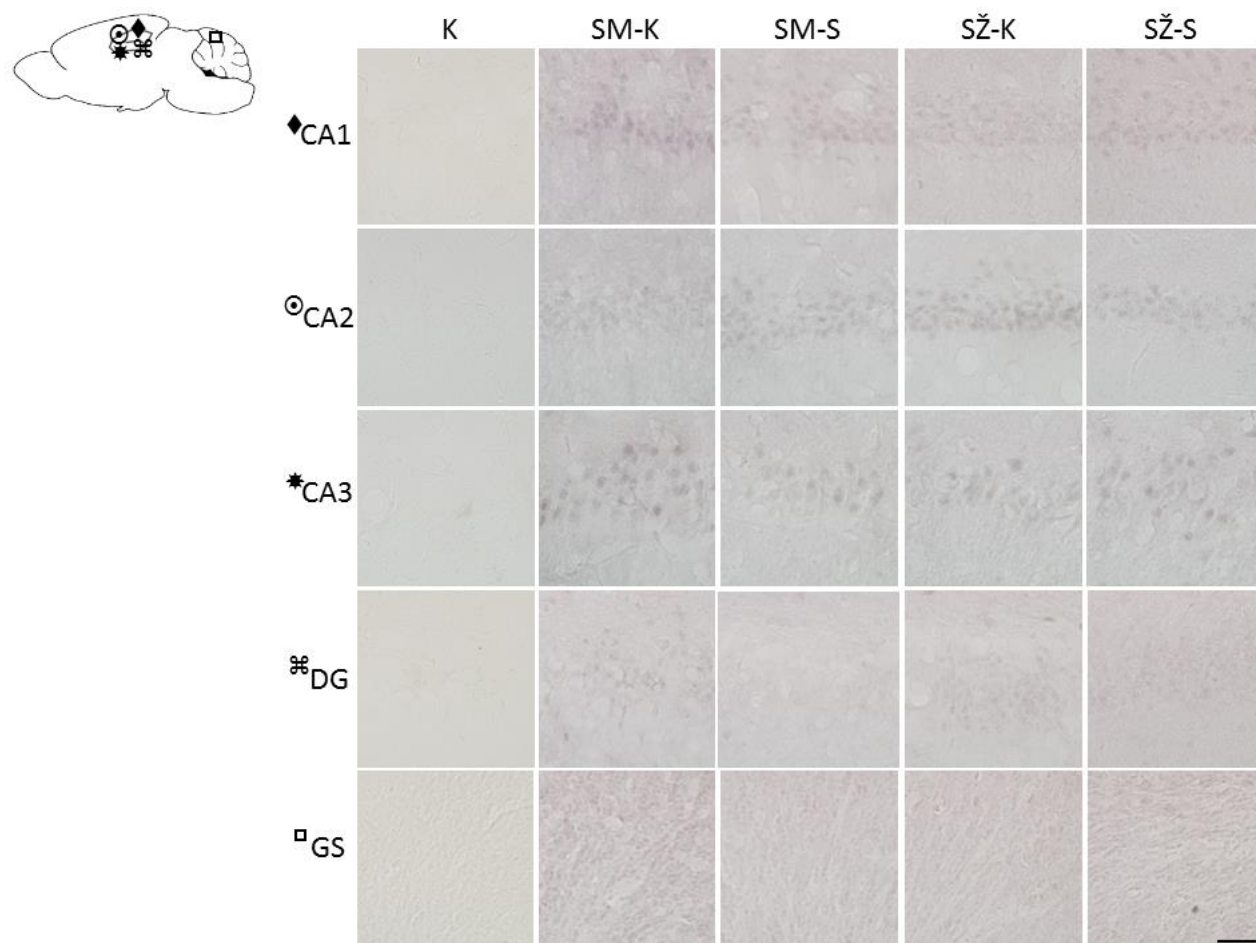
**Slika 5.5.1.3.** Grafički prikaz kvantitativne analize izražaja  $\alpha$ -podjedinice inzulinskog receptora u hipokampusu mladih i starih mužjaka i ženki štakora pod utjecajem kroničnog stresa. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka; SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu; SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki; SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu. IR- $\alpha$  =  $\alpha$ -podjedinica inzulinskog receptora.

Za razliku od IR, leptinski je receptor (ObR) podjednako izražen u sve tri CA regije hipokampusa dok su manje količine ObR-a prisutne u dentatnom girusu. Dobiveni rezultati pokazuju da neovisno o spolu i dobi niti u jednoj regiji hipokampusa (slike 5.5.1.4 i 5.5.1.5) nema značajne promjene izražaja ObR-a kao posljedice kroničnog stresa (slika 5.5.1.6).

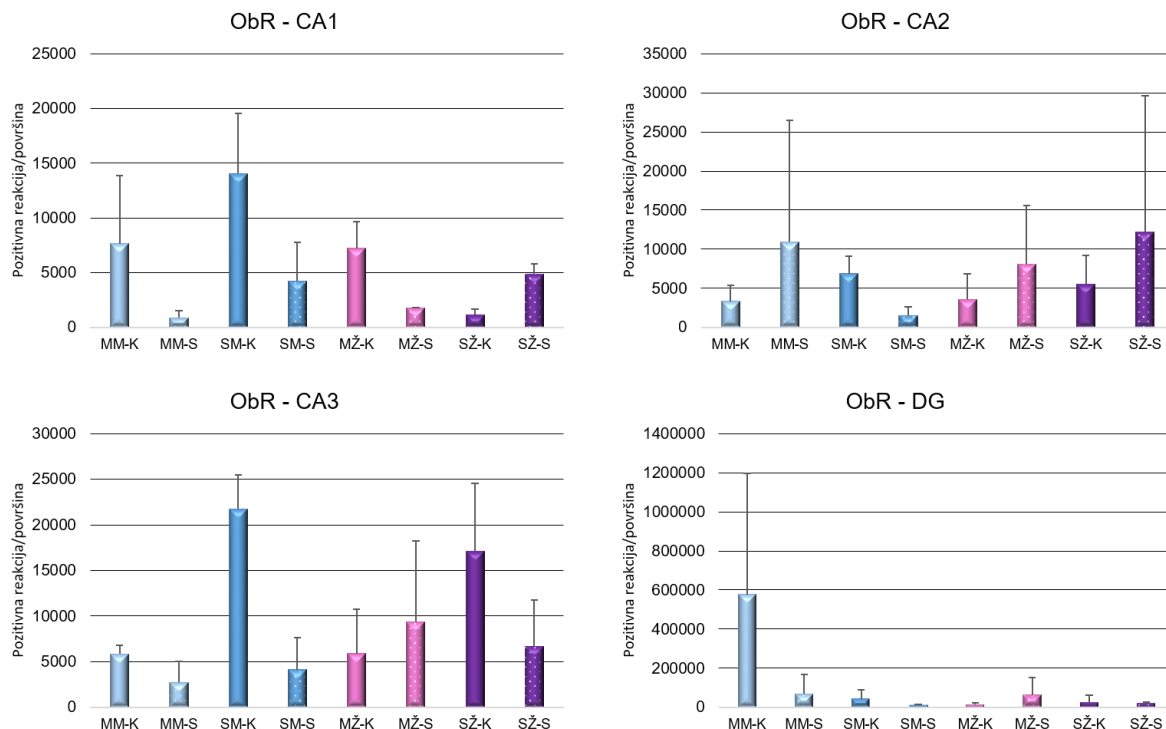


**Slika 5.5.1.4.** Izražaj leptinskog receptora u hipokampusu i malom mozgu mladih mužjaka i ženki štakora. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, K = kontrolno bojanje, oznaka veličine = 50 μm, DG = dentatni girus, GS = granularni sloj malog mozga, ObR = leptinski receptor.

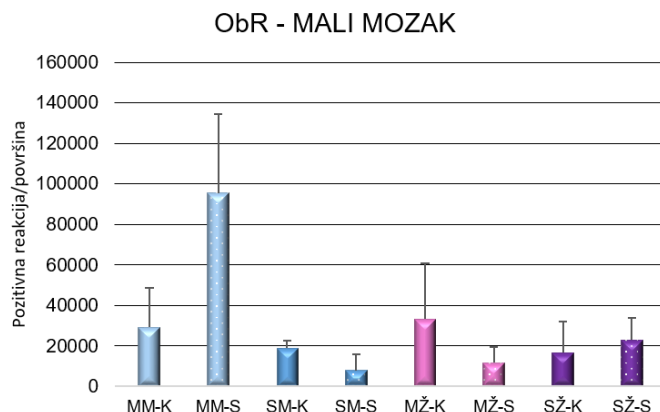
Za razliku od izražaja IR, najveća količina ObR-a prisutna je u granularnom sloju malog mozga mladih mužjaka (slika 5.5.1.4) koji su bili izloženi kroničnom stresu. U granularnom sloju malog mozga izražaj ObR-a je neovisan o spolu, dobi i izloženosti kroničnom stresu. Nastale razlike nisu statistički značajne (slika 5.5.1.7).



**Slika 5.5.1.5.** Izražaj leptinskog receptora u hipokampusu i malom mozgu starijih mužjaka i ženki štakora. SM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, SM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, SŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, K = kontrolno bojanje, oznaka veličine = 50  $\mu$ m, DG = dentatni girus, GS = granularni sloj malog mozga, ObR = leptinski receptor.



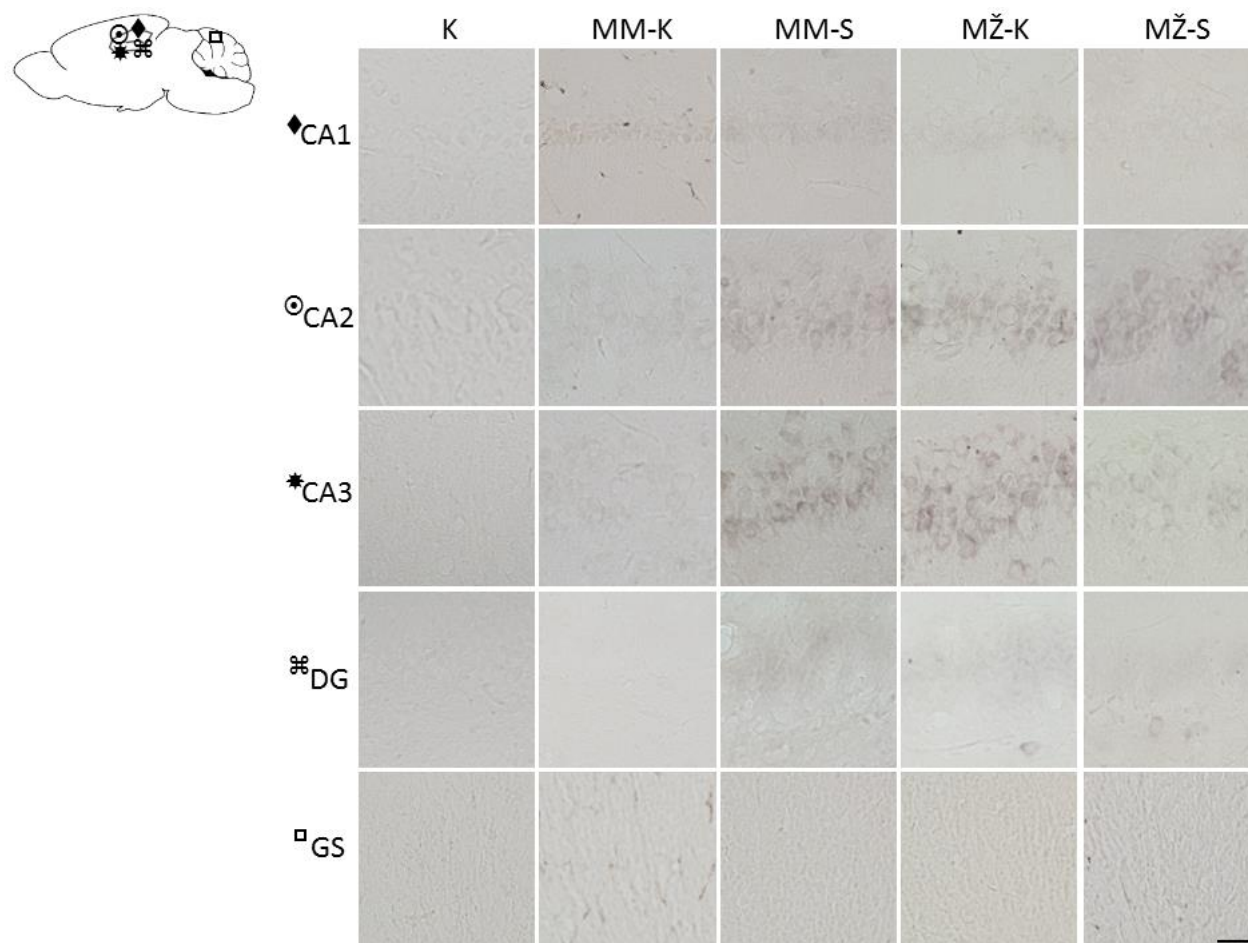
**Slika 5.5.1.6.** Grafički prikaz kvantitativne analize izražaja leptinskog receptora u hipokampusu mladih i starijih mužjaka i ženki štakora pod utjecajem kroničnog stresa. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka; SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu; SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki; SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu. ObR = leptinski receptor.



**Slika 5.5.1.7.** Kvantitativna analiza izražaja leptinskog receptora u granularnom sloju malog mozga mladih i starih mužjaka i ženki štakora pod utjecajem kroničnog stresa. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka; SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu; SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki; SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu. ObR = leptinski receptor.

### 5.5.2. Izražaj Tau i AMPA receptora u hipokampusu i malom mozgu

Izražaj Tau proteina različit je u sve četiri regije hipokampusu. U CA1 regiji nema promjena ovisno o dobi, spolu i utjecaju kroničnog stresa. U CA2 regiji dolazi do povećanja izražaja Tau samo u skupini mladih mužjaka ( $p = 0.014$ ) i ženki ( $p = 0.005$ ) (slika 5.5.2.1) izloženih kroničnom stresu.

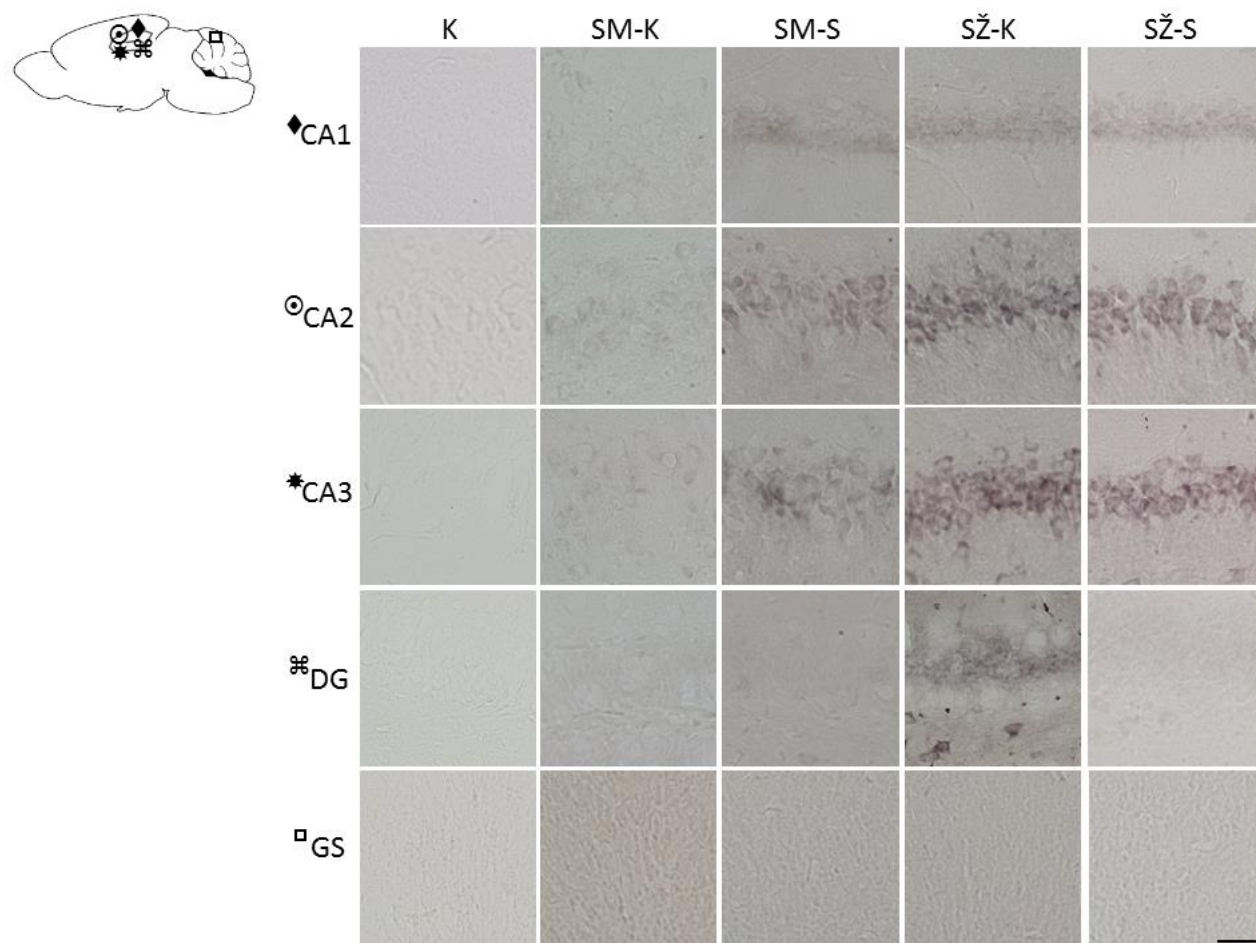


**Slika 5.5.2.1.** Izražaj Tau proteina u hipokampusu i malom mozgu mladih mužjaka i ženki štakora. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, K = kontrolno bojanje, oznaka veličine = 50 μm, DG = dentatni girus, GS = granularni sloj malog mozga.

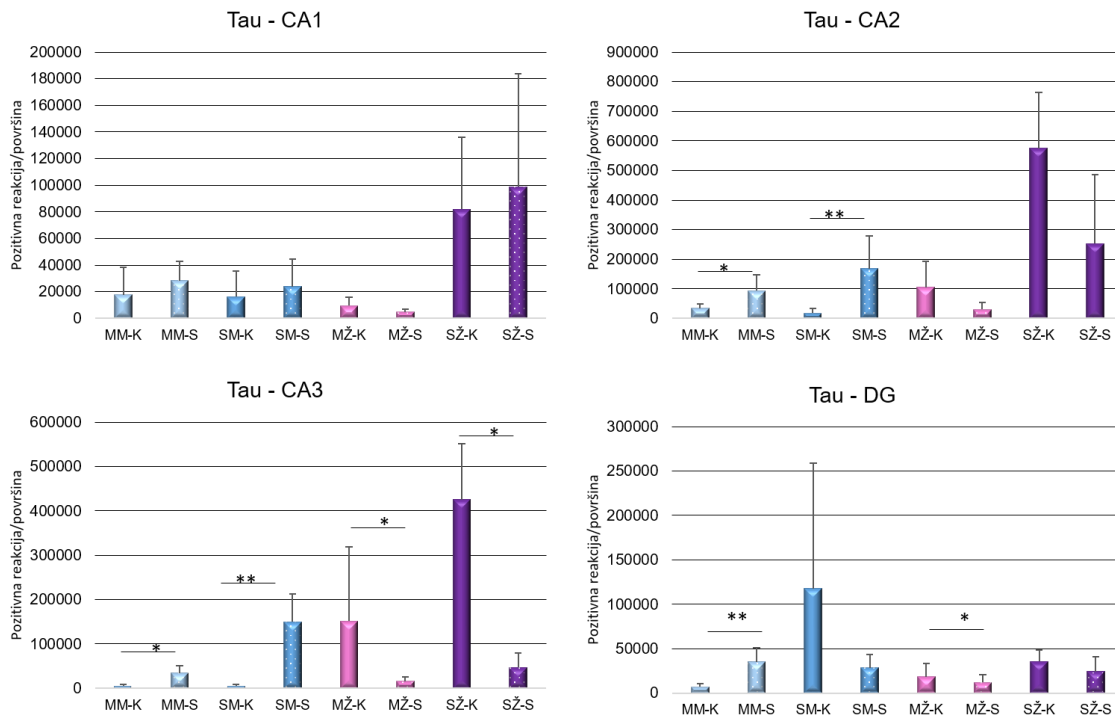
U starijih štakora oba spola nisu uočene značajne promjene Tau proteina u uvjetima stresa (slika 5.5.2.2). U CA3 regiji razlike su spolno specifične. U mužjaka dolazi do povećanja izražaja ( $p = 0.014$  mladi mužjaci i  $p = 0.008$  stari mužjaci), a u ženki stres je izazvao smanjeni izražaj Tau u mladih ( $p = 0.038$ ) i starijih ženki ( $p = 0.019$ ).

U DG regiji kronični je stres također izazvao spolno specifičan učinak na izražaj Tau. U mladih mužjaka izražaj Tau se povećao ( $p = 0.003$ ), a u ženki smanjio ( $p = 0.033$ ) (slika 5.5.2.3).



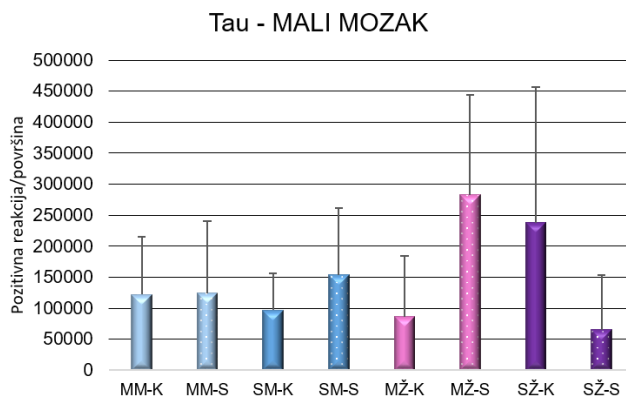


**Slika 5.5.2.2.** Izražaj Tau proteina u hipokampusu i malom mozgu starijih mužjaka i ženki štakora. SM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, SM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, SŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, K = kontrolno bojanje, oznaka veličine = 50 μm, DG = dentatni girus, GS = granularni sloj malog mozga.



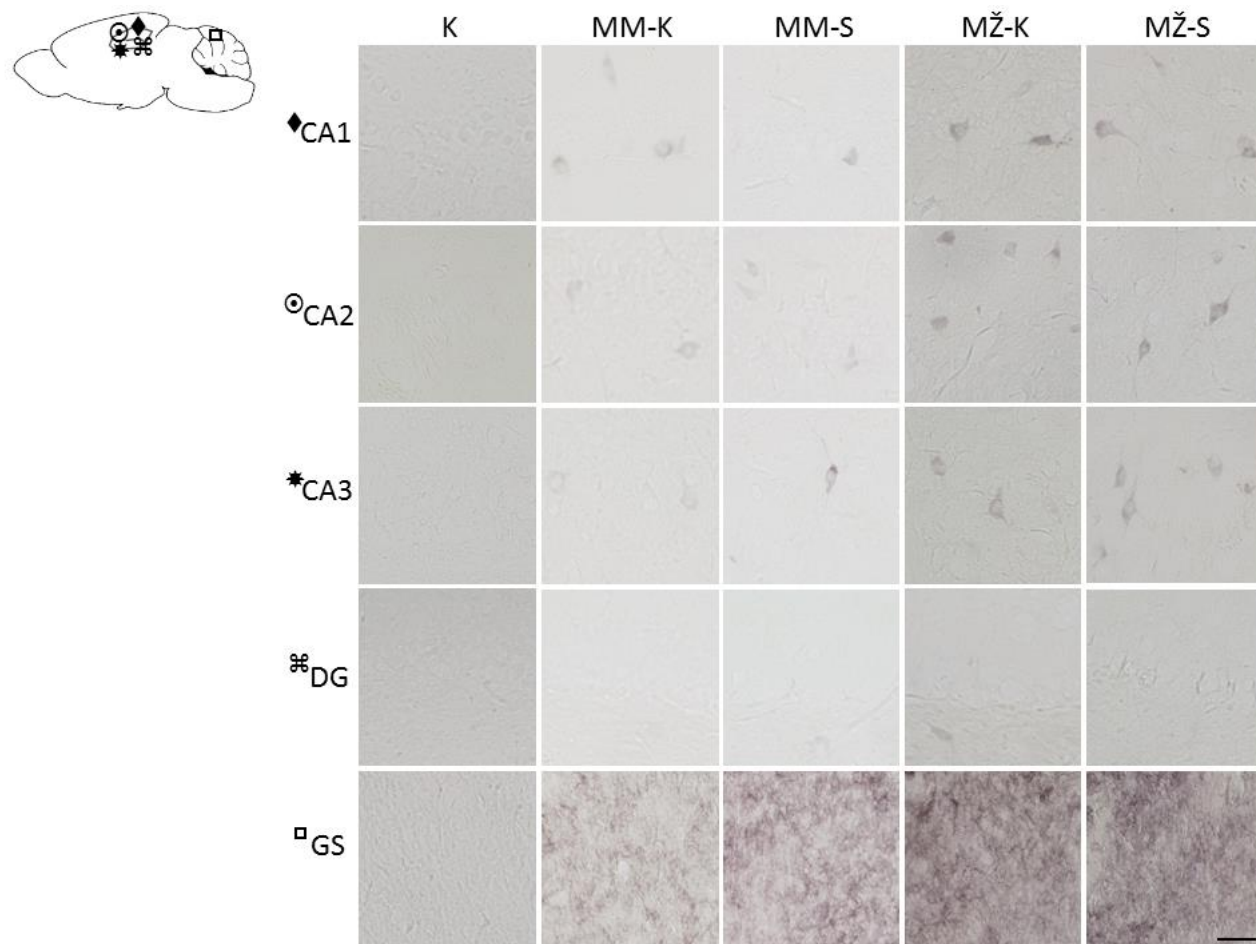
**Slika 5.5.2.3.** Kvantitativna analiza izražaja Tau proteina u hipokampusu mladih i starih mužjaka i ženki štakora. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka; SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu; SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki; SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu. Statistički značajne razlike utvrđene su Mann Whitneyevim testom ( $p \leq 0.05$  \*;  $p \leq 0.01$  \*\*).

U granularnom sloju malog mozga izražaj Tau nevisan je o spolu, dobi i utjecaju kroničnog stresa (Slika 5.5.2.4).

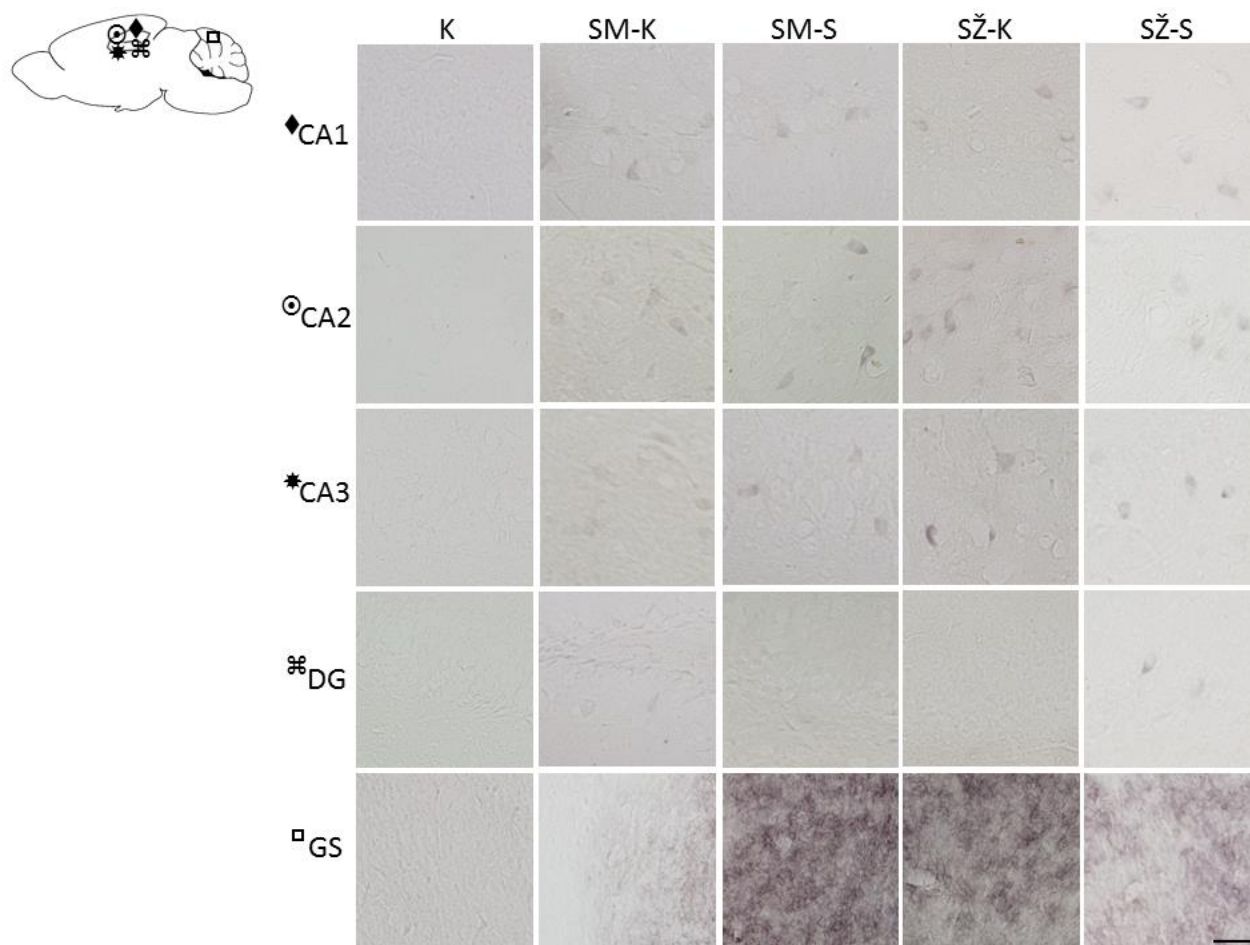


**Slika 5.5.2.4.** Kvantitativna analiza izražaja Tau proteina u granularnom sloju malog mozga mužjaka i ženki štakora pod utjecajem kroničnog stresa. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka; SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu; SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki; SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu.

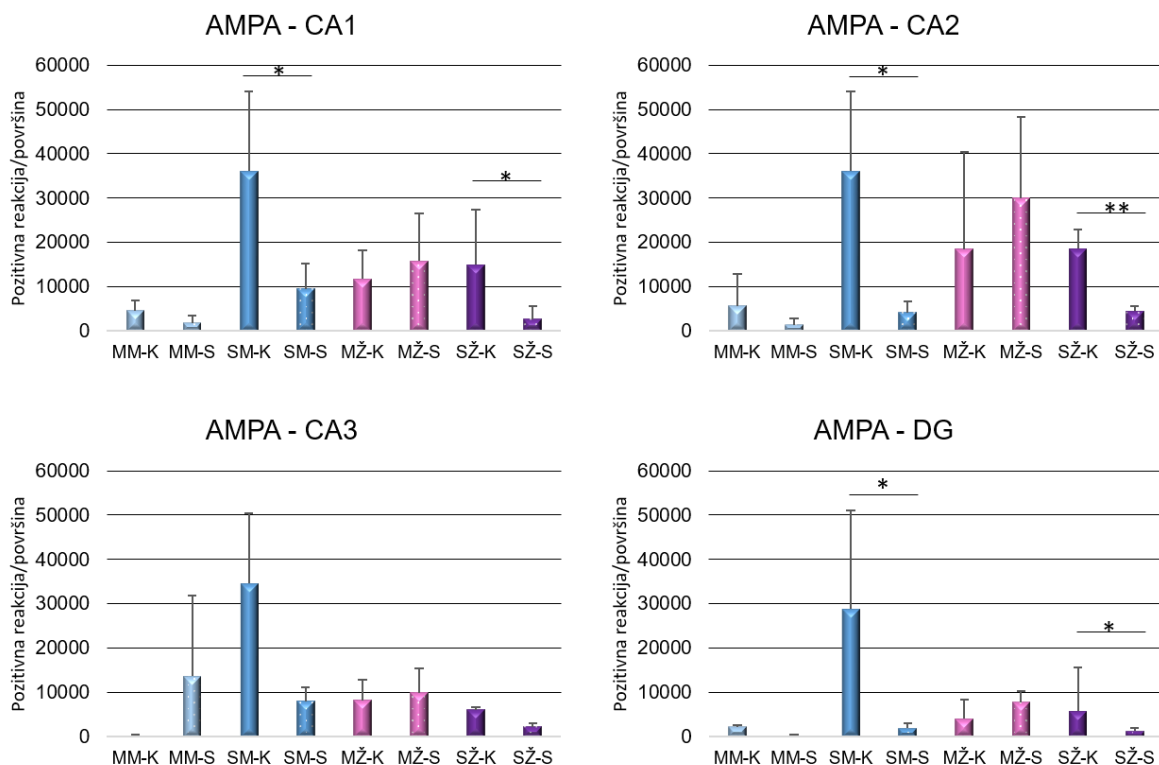
AMPA receptor detektiran je korištenjem GluR2 protutijela. Utjecaj kroničnog stresa na izražaj AMPA receptora u hipokampusu ovisan je o dobi. U mladih ženki i mužjaka nije utvrđena razlika u izražaju (slika 5.5.2.5), dok se u starijih ženki (slika 5.5.2.6) izražaj AMPA receptora smanjio u odgovoru na stres ( $p$  (CA1) = 0.045;  $p$  (CA2) = 0.005 i  $p$  (DG) = 0.008)). U mužjaka se također smanjuje izražaj AMPA receptora nakon izlaganja stresu ( $p$  (CA1) = 0.028;  $p$  (CA2) = 0.036 i  $p$  (DG) = 0.028). Promjena je vidljiva u svim regijama osim u CA3 u kojoj promjena nije uočena čak ni u starijih štakora (slika 5.5.2.6).



**Slika 5.5.2.5.** Izražaj AMPA receptora u hipokampusu i malom mozgu mladih mužjaka i ženki štakora. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, K = kontrolno bojanje, oznaka veličine = 50  $\mu$ m, DG = dentatni girus, GS = granularni sloj malog mozga.

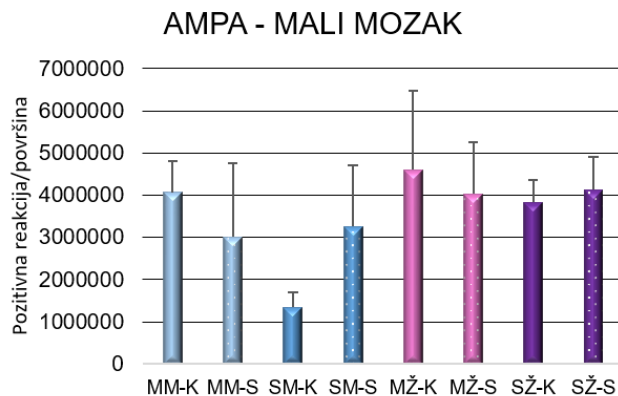


**Slika 5.5.2.6.** Izražaj AMPA receptora u hipokampusu i malom mozgu starijih mužjaka i ženki štakora. SM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, SM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, SŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, K = kontrolno bojanje, oznaka veličine = 50  $\mu$ m, DG = dentatni girus, GS = granularni sloj malog mozga.



**Slika 5.5.2.7.** Kvantitativna analiza izražaja AMPA receptora u hipokampusu mladih i starijih mužjaka i ženki štakora. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu. Statistički značajne razlike utvrđene su Mann Whitneyevim testom ( $p \leq 0.05$  \*;  $p \leq 0.01$  \*\*).

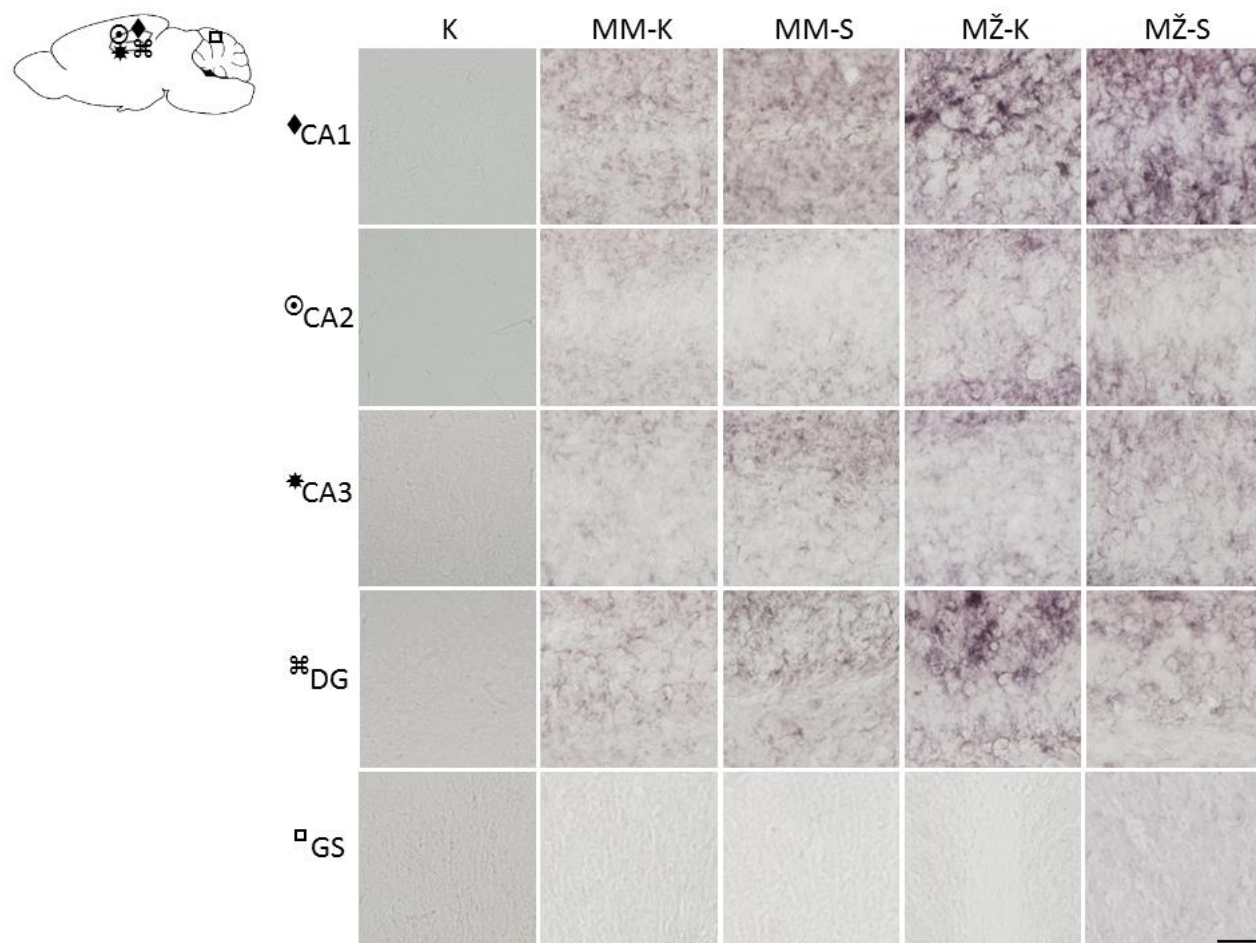
U granularnom sloju malog mozga kronični stres nije uzrokovao promjenu izražaja AMPA receptora u obje dobne skupine i oba spola (slika 5.5.2.8).



**Slika 5.5.2.8.** Kvantitativna analiza izražaja AMPA receptora u granularnom sloju malog mozga mužjaka i ženki štakora. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu.

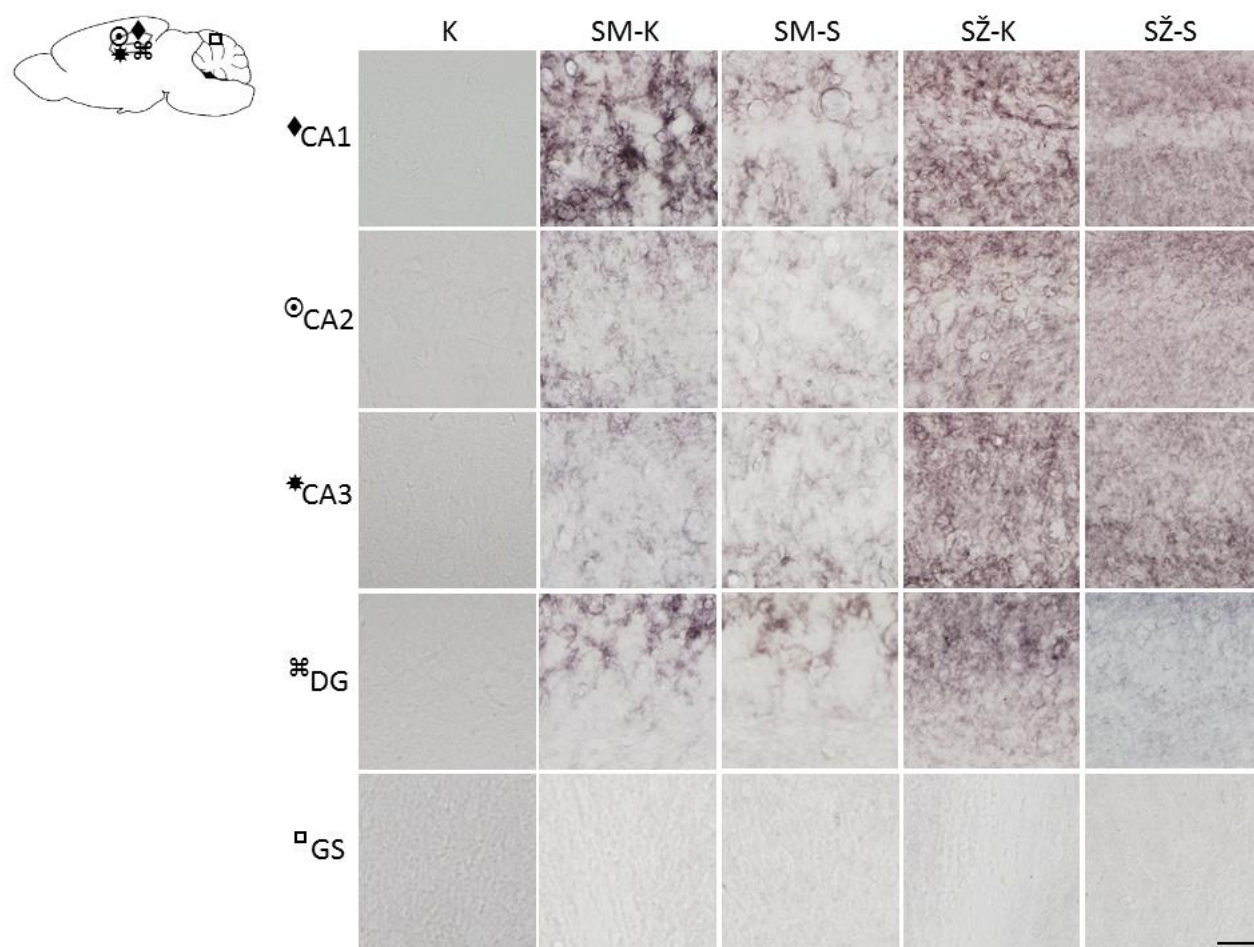
### 5.5.3. Izražaj neuroplastina u hipokampusu i malom mozgu

Kronični stres utjecao je na izražaj neuroplastina u hipokampusu na dobno i spolno specifičan način. U mladih mužjaka (slika 5.5.3.1) povećao se izražaj Np u CA2 ( $p = 0.045$ ), CA3 ( $p = 0.005$ ) i DG ( $p = 0.008$ ) regijama, dok se u starijih mužjaka (slika 5.5.3.2) izražaj Np smanjio u CA1 ( $p = 0.008$ ) i CA2 ( $p = 0.022$ ) regijama u uvjetima stresa. Izražaj neuroplastina u ženki obje dobne skupine manje je promijenjen, te do smanjenog izražaja dolazi samo u starijih ženki u CA3 regiji kao posljedica stresa ( $p = 0.020$ ) (slika 5.5.3.3). Statistički značajne razlike utvrđene su Mann Whitneyevim testom.



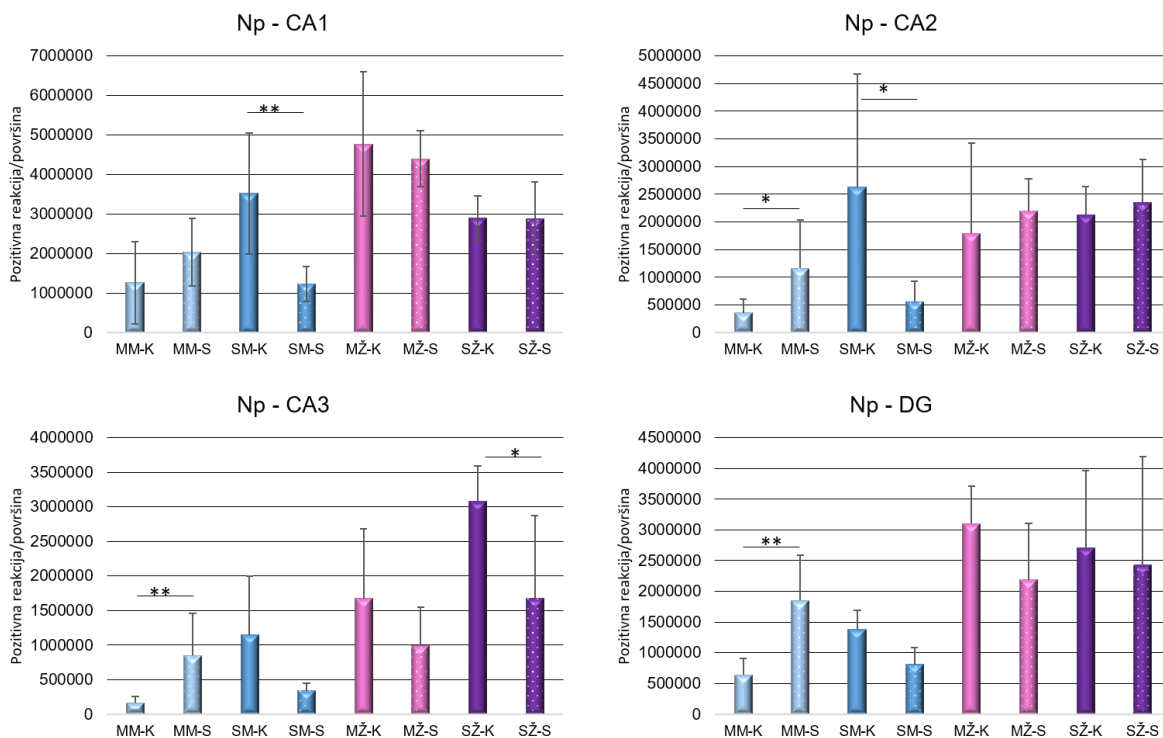
**Slika 5.5.3.1.** Izražaj neuroplastina u hipokampusu i malom mozgu mladih mužjaka i ženki štakora. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, K = kontrolno bojanje, oznaka veličine = 50  $\mu$ m, DG = dentatni girus, GS = granularni sloj malog mozga.



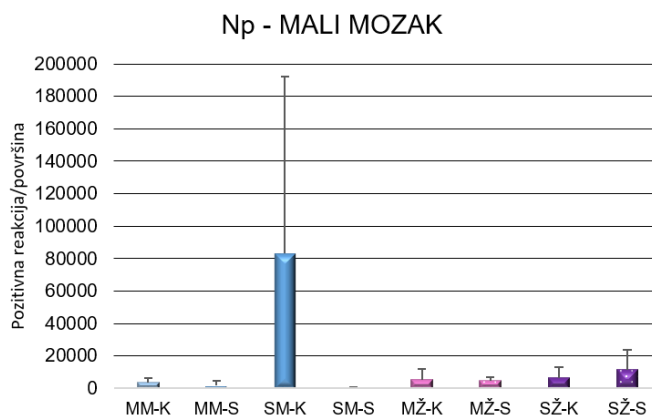


**Slika 5.5.3.2.** Izražaj neuroplastina u hipokampusu i malom mozgu starijih mužjaka i ženki štakora. SM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, SM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, SŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, K = kontrolno bojanje, oznaka veličine = 50 μm, DG = dentatni girus, GS = granularni sloj malog mozga.

Najveći izražaj Np u granularnom sloju malog mozga utvrđen je u skupini starijih mužjaka koji nisu bili izloženi kroničnom stresu. Također je uočeno kako kronični stres nije utjecao na izražaj Np u obje dobne skupine i oba spola u malom mozgu (slika 5.5.3.4).



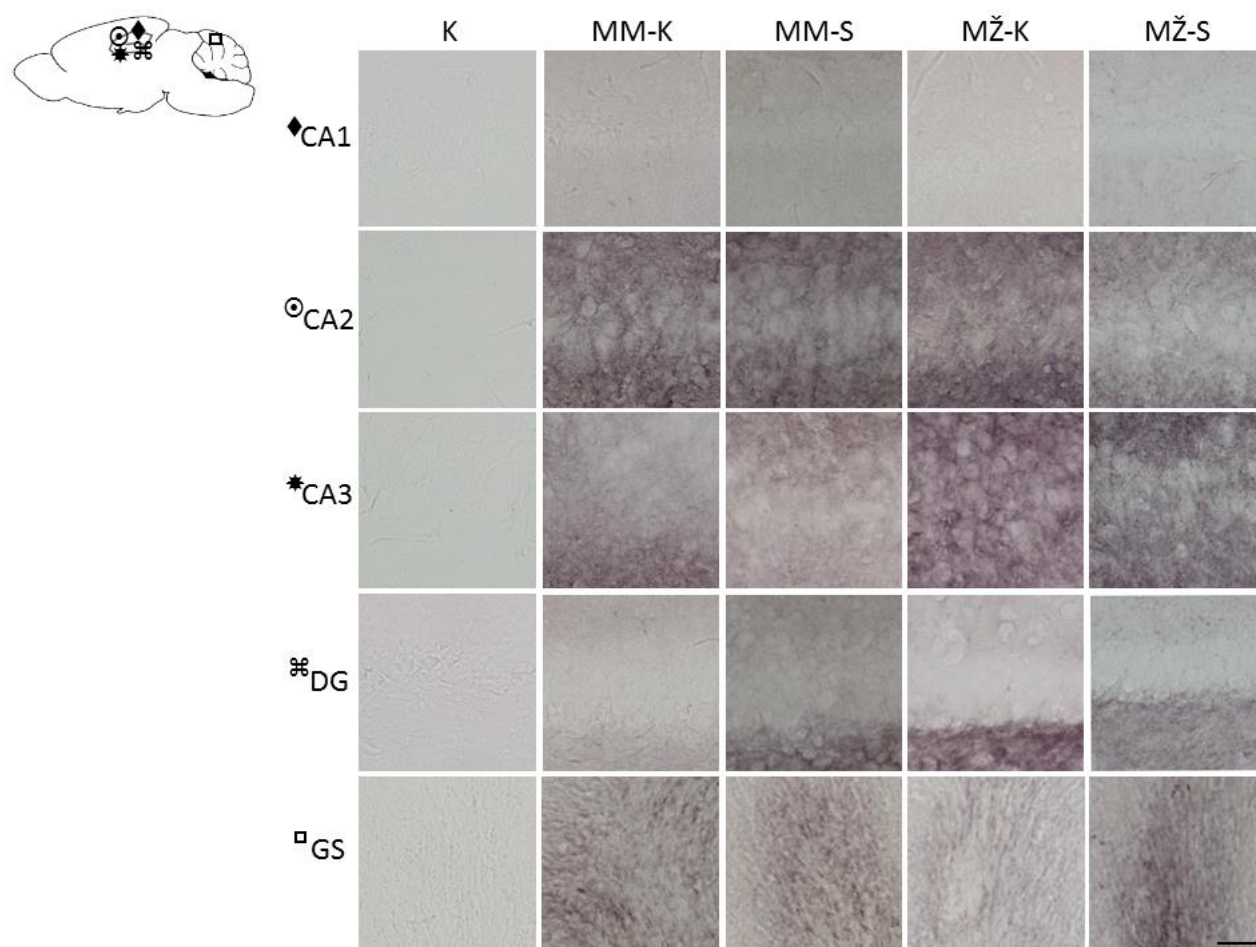
**Slika 5.5.3.3.** Kvantitativna analiza izražaja neuroplastina u hipokampusu mladih i starih mužjaka i ženki štakora. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu. Statistički značajne razlike utvrđene su Mann Whitneyevim testom ( $p \leq 0.05$  \*;  $p \leq 0.01$  \*\*), Np = neuroplastin.



**Slika 5.5.3.4.** Kvantitativna analiza izražaja neuroplastina u granularnom sloju malog mozga mužjaka i ženki štakora. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu, Np = neuroplastin.

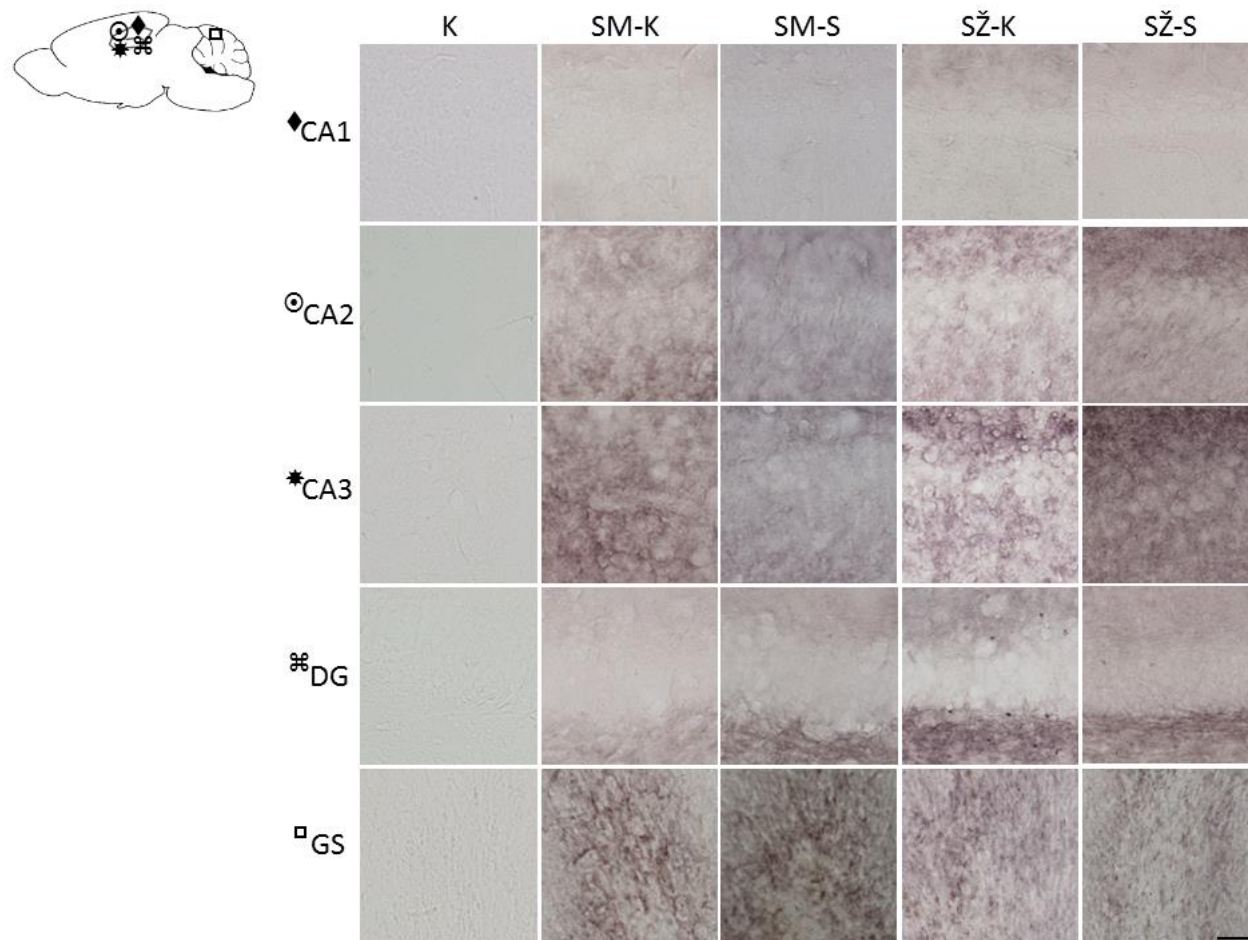
#### 5.5.4. Izražaj gangliozida GM1 u hipokampusu i malom mozgu

Kronični stres je u hipokampusu izazvao povećanje izražaja gangliozida GM1 u CA1 ( $p = 0.022$ ) regiji mladih ženki i u DG regiji mladih mužjaka ( $p = 0.005$ ) u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama (slika 5.5.4.1). U starijih ženki izražaj GM1 se povećao u DG regiji dok se u ostalim dijelovima hipokampusa smanjio u odgovoru na kronični stres no bez utvrđivanja statističke značajnosti.



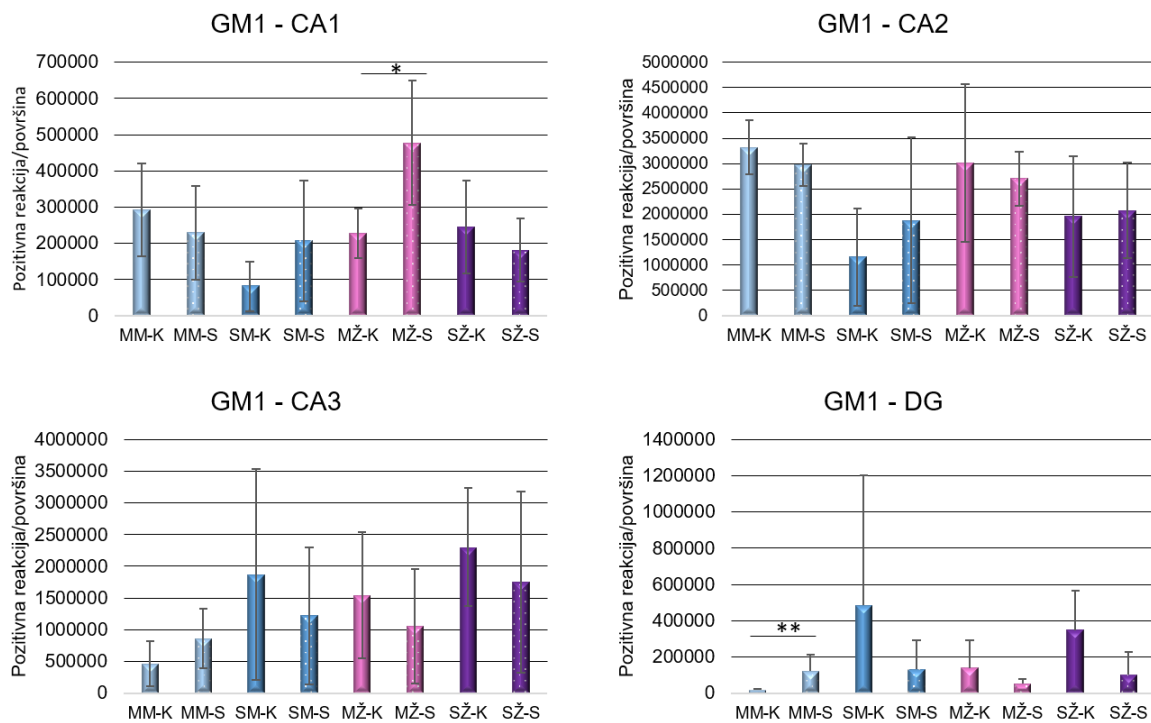
**Slika 5.5.4.1.** Izražaj GM1 u hipokampusu i malom mozgu mladih mužjaka i ženki štakora. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, K = kontrolno bojanje, oznaka veličine = 50 μm, DG = dentatni girus, GS = granularni sloj malog mozga.

U starijih mužjaka povećanje izražaja GM1 pod utjecajem kroničnog stresa uočeno je u CA1 i CA2 regijama dok se u CA3 i DG regijama izražaj GM1 smanjio pod utjecajem stresa, također bez postizanja statistički značajnih rezultata (5.5.4.2). Statistički značajni rezultati utvrđeni su Mann Whitneyevim testom (slika 5.5.4.3).

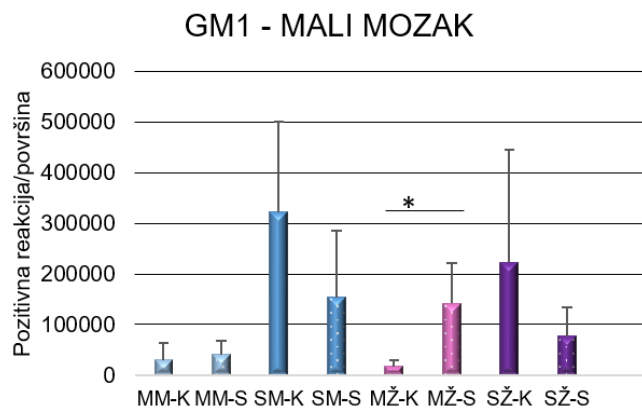


**Slika 5.5.4.2.** Izražaj GM1 u hipokampusu i malom mozgu starijih mužjaka i ženki štakora. SM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, SM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, SŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, K = kontrolno bojanje, oznaka veličine = 50  $\mu$ m, DG = dentatni girus, GS = granularni sloj malog mozga.

U malom mozgu izražaj gangliozida GM1 povećao se nakon izlaganja stresu u skupini mladih ženki ( $p = 0.014$ ), a u starijih se životinja neovisno o spolu izražaj GM1 smanjio u uvjetima stresa. Mladi mužjaci nisu pokazali promjene izražaja GM1 s obzirom na izlaganje kroničnom stresu.



**Slika 5.5.4.3.** Kvantitativna analiza izražaja GM1 u hipokampusu mladih i starih mužjaka i ženki štakora. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu. Statistički značajne razlike utvrđene su Mann Whitneyevim testom ( $p \leq 0.05$  \*;  $p \leq 0.01$  \*\*).



**Slika 5.5.4.4.** Kvantitativna analiza izražaja gangliozida GM1 u granularnom sloju malog mozga mužjaka i ženki štakora. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu. Statistički značajne razlike utvrđene su Mann Whitneyevim testom ( $p \leq 0.05$  \*;  $p \leq 0.01$  \*\*).

Tablicom 5.5.4.1. sažeto su prikazani značajni rezultati dobiveni svim imunohistokemijskim analizama.

**Tablica 5.5.4.1.** Sažeti rezultati imunohistokemijskih analiza svih proteina u hipokampusu i malom mozgu svih skupina životinja izloženih kroničnom stresu.

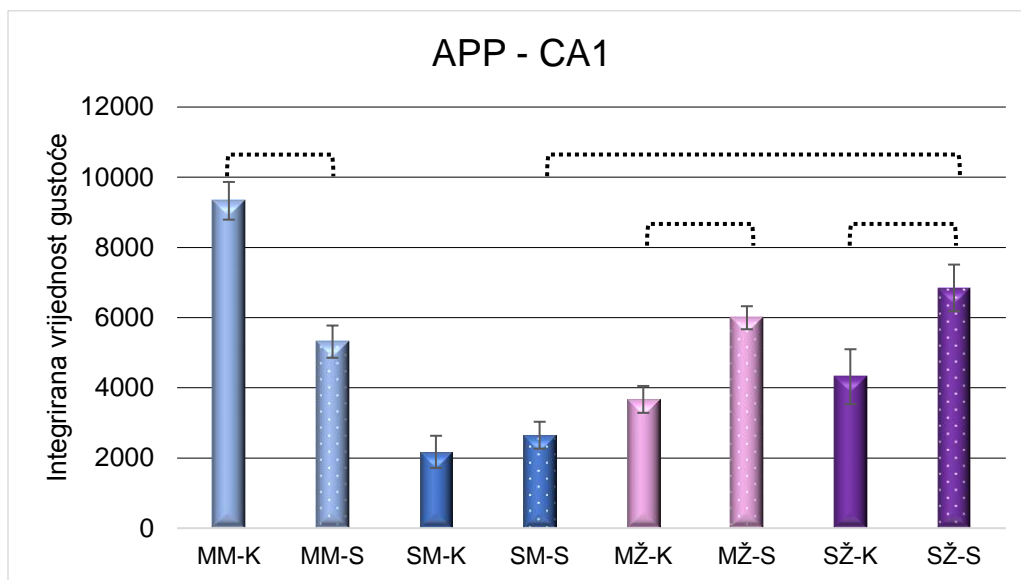
PODRUČJE	CA1				CA2				CA3				DG				MS			
SKUPINA/ ANALIZA	MM-S	MŽ-S	SM-S	SŽ-S	MM-S	MŽ-S	SM-S	SŽ-S	MM-S	MŽ-S	SM-S	SŽ-S	MM-S	MŽ-S	SM-S	SŽ-S	MM-S	MŽ-S	SM-S	SŽ-S
IR- $\alpha$	-	-	↓	-	-	-	↓	-	-	-	↓	-	-	-	↓	-	-	-	-	-
ObR	-	-	↓	-	-	-	-	-	-	-	↓	-	-	↓	-	-	↑	-	-	-
Tau	-	-	-	-	↑↑	-	↑↑	-	↑↑	↓↓	↑↑	↓↓	↑↑	↓↓	-	-	-	↑	-	↓
AMPA-R	-	-	↓↓	↓↓	-	-	↓↓	↓↓	-	-	-	-	-	-	↓↓	↓↓	↓	-	↓	-
Np65	-	-	↓↓	-	-	↑↑	↓↓	-	↑↑	-	-	↓↓	↑↑	-	-	-	-	-	↓	-
GM1	-	↑↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑↑	-	-	-	-	↑↑	↓	↓

Kratice: MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu, IR- $\alpha$  =  $\alpha$ -podjedinica inzulinskog receptora, ObR = leptinski receptor, Tau = Tau protein, AMPA-R = AMPA receptor, Np65 = neuroplastin, DG = dentatni girus, ↑↑ - statistički značajno povećanje parametra s obzirom na odgovarajuću kontrolnu skupinu, ↓↓ - statistički značajno smanjenje parametra s obzirom na odgovarajuću kontrolnu skupinu, ↑ - trend povećanja parametra s obzirom na odgovarajuću kontrolnu skupinu bez utvrđene statističke značajnosti, ↓ - trend smanjenja parametra s obzirom na odgovarajuću kontrolnu skupinu bez utvrđene statističke značajnosti. Statističke su značajnosti utvrđene Mann Whitneyevim testom; p<0.05.

### 5.5.5. Kolokalizacija APP/GD1a u CA1 području

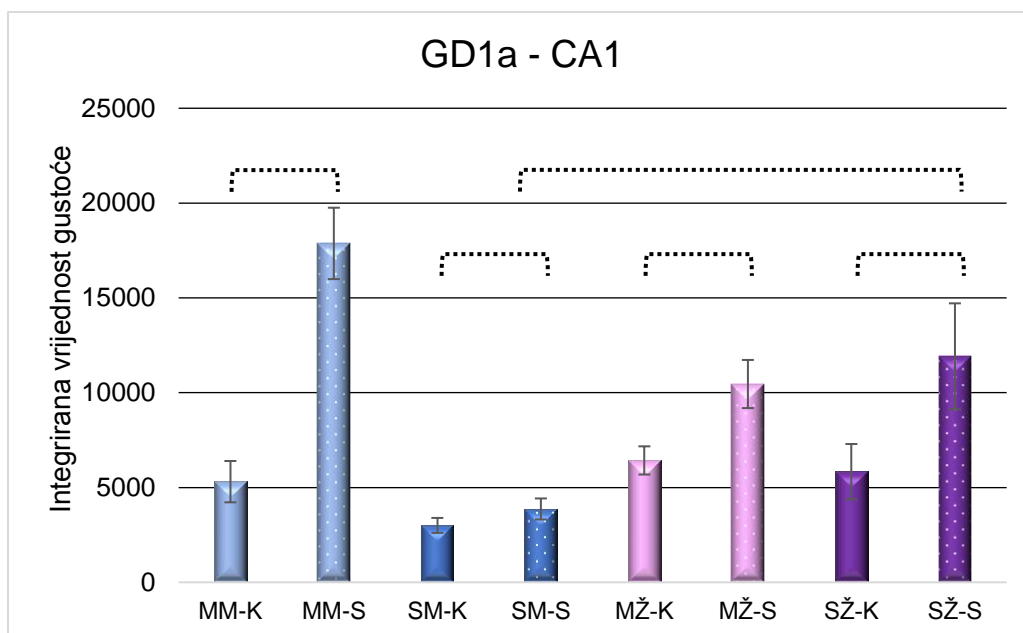
Analizom APP-a u CA1 području utvrđen je najveći izražaj proteina u kontrolnoj skupini mladih mužjaka sa smanjenjem pod utjecajem kroničnog stresa. U svim ostalim skupinama izražaj APP-a se povećao pod utjecajem stresa, posebice u skupini starijih ženki (Slika 5.5.5.1. i 5.5.5.4). Sve su spomenute promjene statistički značajne (p = 0.012). Također je uočeno smanjenje APP-a u starijih mužjaka u usporedbi s mladim mužjacima pod utjecajem stresa. U starijih je mužjaka uočena i manja vrijednost izražaja APP-a u usporedbi sa starijim ženkama (p = 0.012).



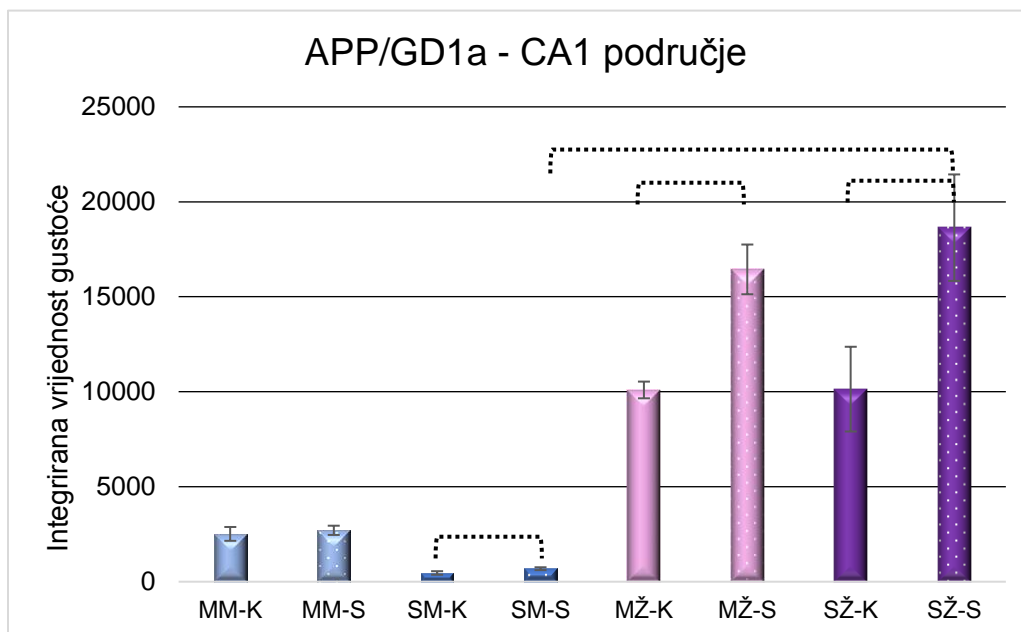


**Slika 5.5.5.1.** Izražaj APP-a u CA1 području svih skupina životinja. Statistički značajne razlike utvrđene su Mann Whitneyevim testom, a p-vrijednost u svim usporedbama iznosi 0.012. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu, APP = preteča amiloida.

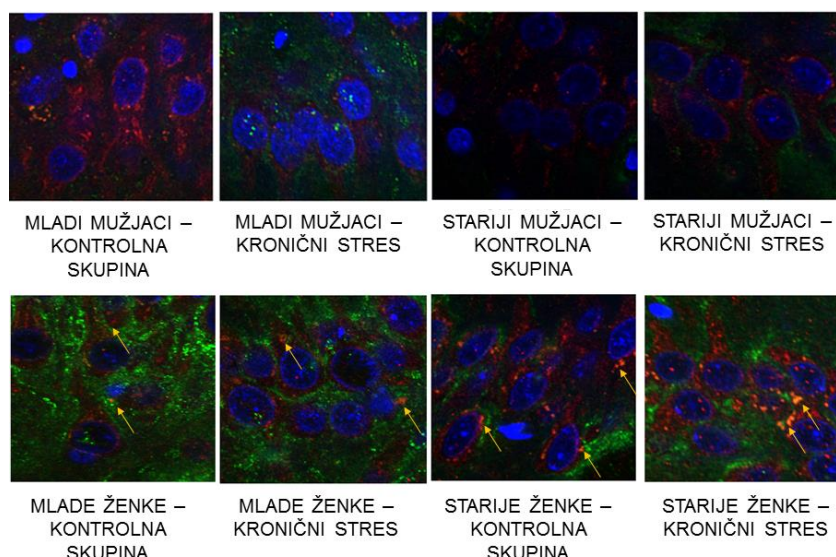
Za razliku od APP-a, izražaj GD1a povećao se u svih skupina životinja pod utjecajem kroničnog stresa, no najdramatičnije povećanje uočeno je u mladih mužjaka (slika 5.5.5.2). Kolokalizacija APP-a i GD1a vrlo je niska u mužjaka, posebice tijekom starenja. U ženskim skupinama životinja uočena je veća kolokalizacija APP/GD1a koja se još više ističe u odgovoru na kronični stres (slika 5.5.5.3).



**Slika 5.5.5.2.** Izražaj gangliozida GD1a u CA1 području svih skupina životinja. Statistički značajne razlike utvrđene su Mann Whitneyevim testom, a p-vrijednost u svim usporedbama iznosi 0.012. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu.



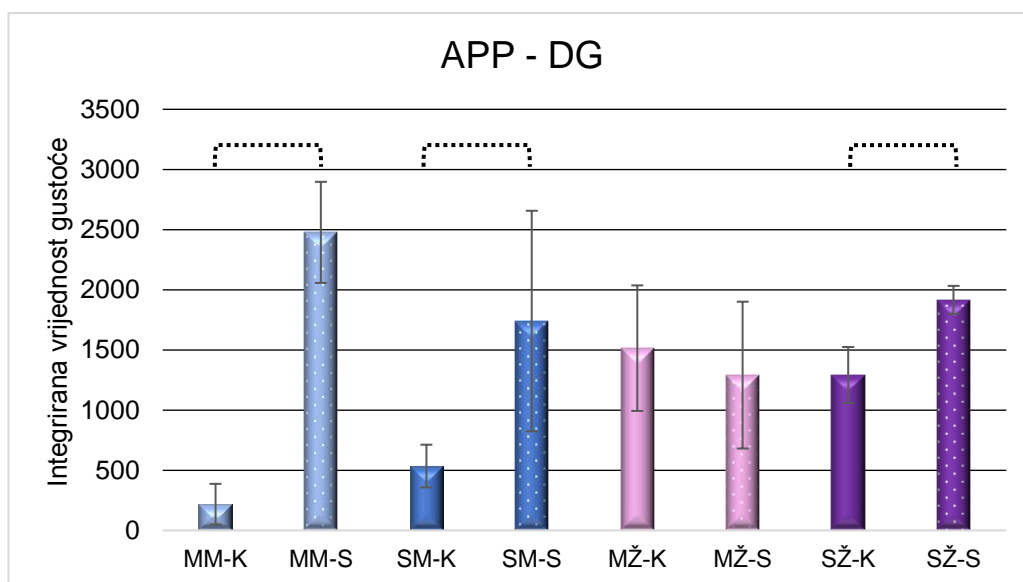
**5.5.5.3.** Kolokalizacija APP/GD1a u CA1 području svih skupina životinja. Statistički značajne razlike utvrđene su Mann Whitney testom, a p-vrijednost u svim usporedbama iznosi 0.012. MM-K= kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu, APP = preteča amiloida.



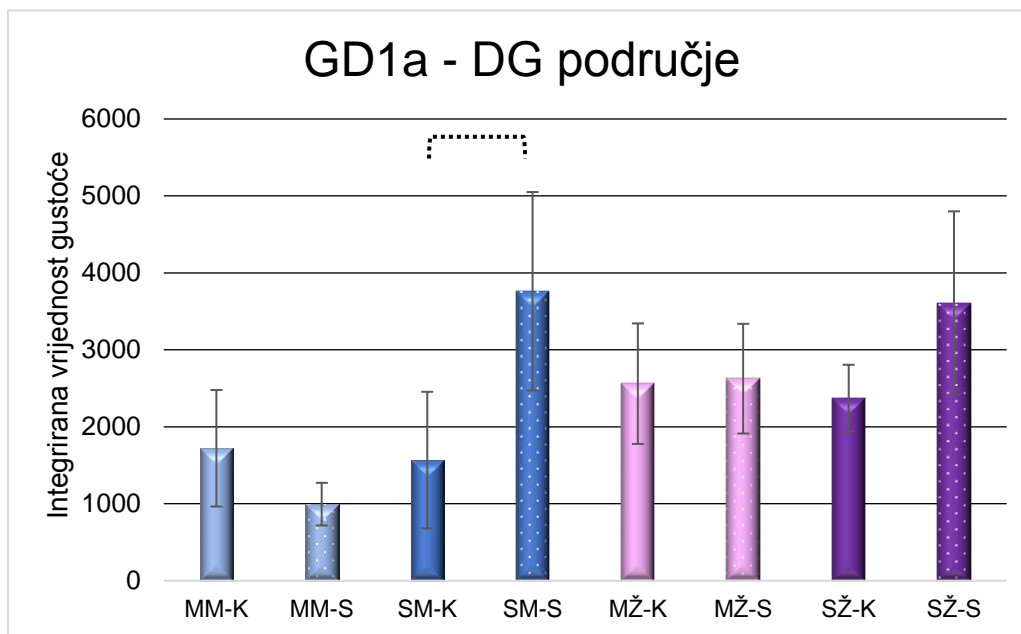
**Slika 5.5.5.4.** Prikaz dobivenih imunohistokemijskih rezultata dvostrukim bojanjem APP/GD1a u CA1 području u svim skupinama životinja. Uočena je kolokalizacija (žute strelice) gotovo isključivo u ženskim skupinama. Crveno obojenje = APP, zeleno obojenje = gangliozid GD1a, APP = preteča amiloida.

### 5.5.6. Kolokalizacija APP/GD1a u dentatnom girusu hipokampusa

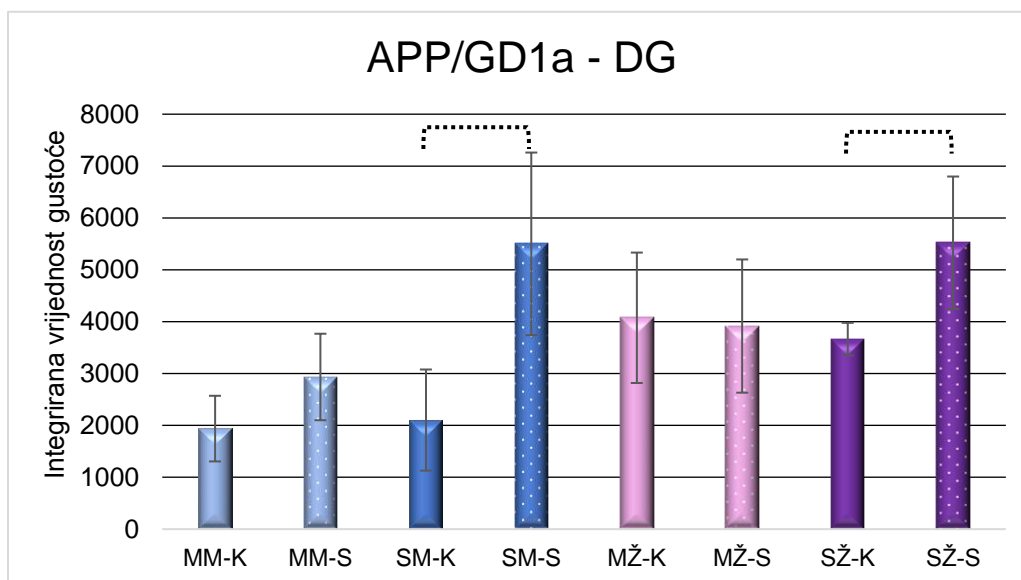
U svim je skupinama izražaj APP-a povećan u dentatnom girusu pod utjecajem kroničnog stresa, osim u mladim ženki gdje je nakon kroničnog stresa uočen blagi pad izražaja. Najdramatičnije povećanje izražaja APP-a u odgovoru na kronični stres uočeno je u mladim mužjaka ( $p = 0.012$ ) zatim starijih ženki ( $p = 0.012$ ) te starijih mužjaka ( $p = 0.012$ ) u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim skupinama (slika 5.5.6.1). Najveća promjena izražaja gangliozida GD1a u dentatnom girusu uočena je u skupini starijih mužjaka nakon izlaganja stresu u usporedbi s odgovarajućom kontrolnom skupinom ( $p = 0.021$ ) te u skupini starijih ženki (slika 5.5.6.2). Najveće promjene uočene su usporedbom mladih mužjaka te starijih mužjaka u uvjetima kroničnog stresa gdje stariji mužjaci pokazuju veći izražaj GD1a ( $p = 0.012$ ). Kolokalizacija APP-a i GD1a najveća je u starijih mužjaka ( $p = 0.021$ ) i ženki ( $p = 0.036$ ) pod utjecajem kroničnog stresa (slike 5.5.6.3 i 5.5.6.4).



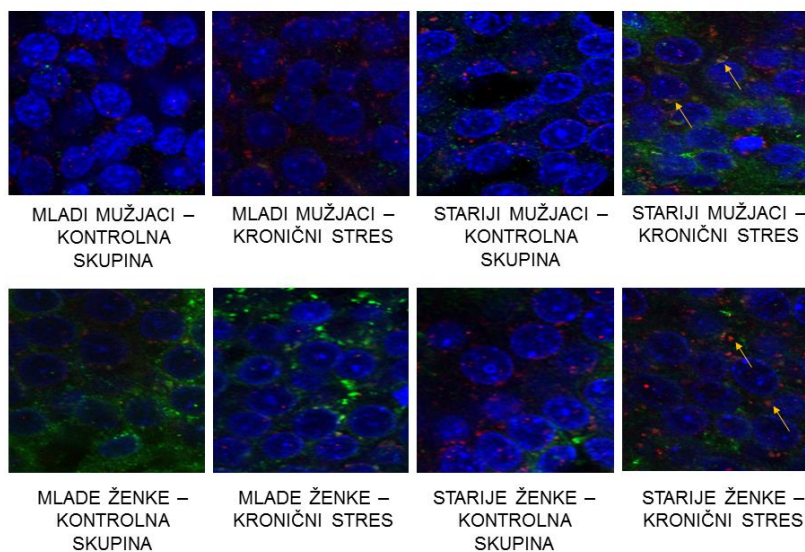
**Slika 5.5.6.1.** Izražaj APP-a u dentatnom girusu svih skupina životinja. Statistički značajne razlike utvrđene su Mann Whitneyevim testom, a p-vrijednost u svim usporedbama iznosi 0.012. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu, APP = preteča amiloida, DG = dentatni girus.



**Slika 5.5.6.2.** Izražaj gangliozida GD1a u dentatnom girusu svih skupina životinja. Statistički značajne razlike utvrđene su Mann Whitneyevim testom. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu, DG = dentatni girus.



**Slika 5.5.6.3.** Kolokalizacija APP/GD1a u dentatnom girusu svih skupina životinja. Statistički značajne razlike utvrđene su Mann Whitney testom;  $p < 0.05$ . MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu, APP = preteča amiloida.



**Slika 5.5.6.4.** Prikaz dobivenih imunohistokemijskih rezultata dvostrukim bojanjem APP/GD1a u dentatnom girusu svih skupina životinja. Uočena je kolokalizacija (žute strelice) gotovo isključivo u starijim skupinama životinja pod utjecajem kroničnog stresa. Crveno obojenje = APP, zeleno obojenje = GD1a, APP = preteča amiloida.

Tablicom 5.5.6.1 sažeto su prikazani značajni rezultati imunofluorescencijske analize APP/GD1a u hipokampusu.

**Tablica 5.5.6.1.** Sažeta tablica analize izražaja APP/GD1a u CA1 i DG području hipokampusa.

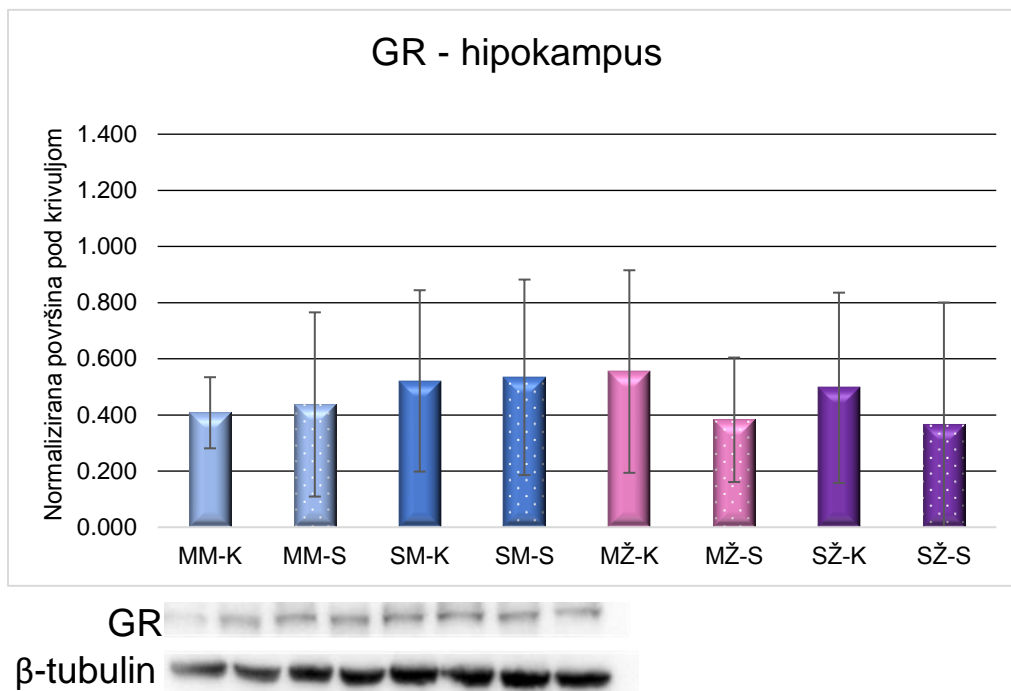
CA1					DG				
SKUPINA/ ANALIZA	MM-S	MŽ-S	SM-S	SŽ-S	SKUPINA/ ANALIZA	MM-S	MŽ-S	SM-S	SŽ-S
APP	↓↓	-	↑↑	↑↑	APP	↑↑	-	↑↑	↑↑
GD1a	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	GD1a	-	-	↑↑	-
Kolokalizacija	-	↑↑	↑↑	↑↑	Kolokalizacija	-	-	↑↑	↑↑

Kratice: MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu, APP = preteča amiloida, DG = dentatni girus, ↑↑ - statistički značajno povećanje parametra s obzirom na odgovarajuću kontrolnu skupinu, ↓↓ - statistički značajno smanjenje parametra s obzirom na odgovarajuću kontrolnu skupinu. Statističke su značajnosti utvrđene Mann Whitneyevim testom;  $p < 0.05$ .

## 5.6. Analiza izražaja odabranih proteina *Western blottingom*

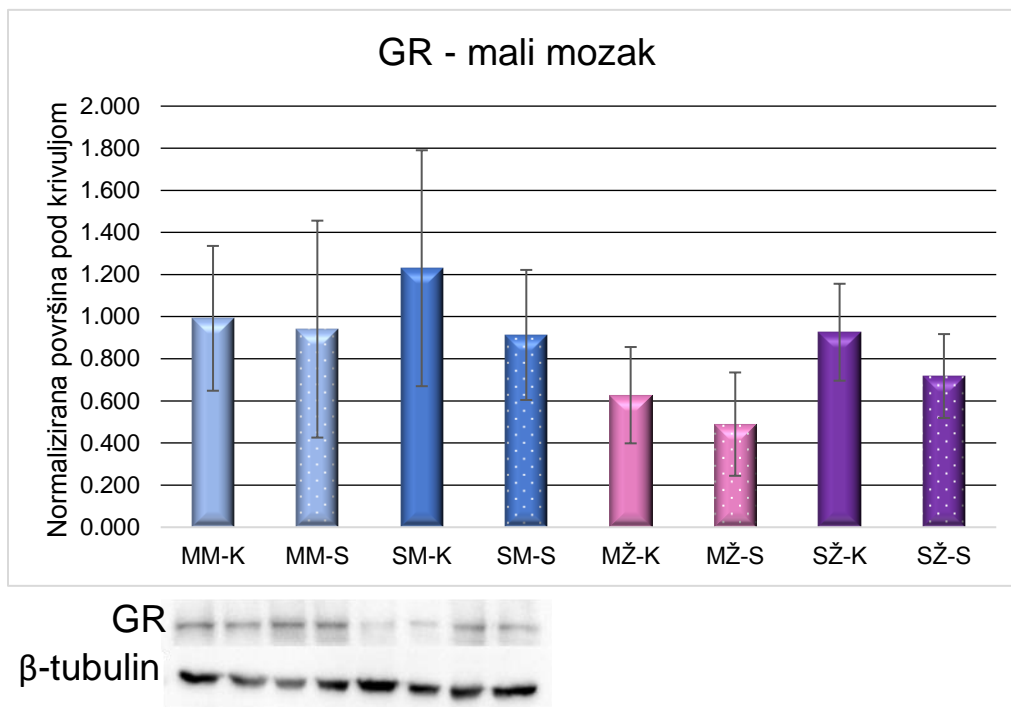
### 5.6.1. Izražaj glukokortikoidnog receptora u hipokampusu i malom mozgu

Izražaj GR analiziran je u citosolnim proteinima hipokampusa i maloga mozga. Analizirane su proteinske vrpce po tri uzorka za svaku skupinu životinja u oba tkiva, od svakog je uzorka na gel nanešeno 15µg proteina. Detektiran je signal vrpce pri oko 95 kDa. U mužjaka je uočen blagi porast izražaja GR u hipokampusu (slika 5.6.1.1) te smanjenje u obje vrste tkiva u svim ostalim skupinama u odgovoru na kronični stres (slike 5.6.1.1. i 5.6.1.2). Statističkim analizama nije postignuta značajnost dobivenih rezultata.



**Slika 5.6.1.1.** Izražaj GR u citosolnim proteinima hipokampusu svih skupina životinja. Rezultati su prikazani grafički te reprezentativnom slikom ispod – prikazan je primjer detekcije proteinskih vrpca GR te unutarnje kontrole  $\beta$ -tubulina. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu, GR = glukokortikoidni receptor.



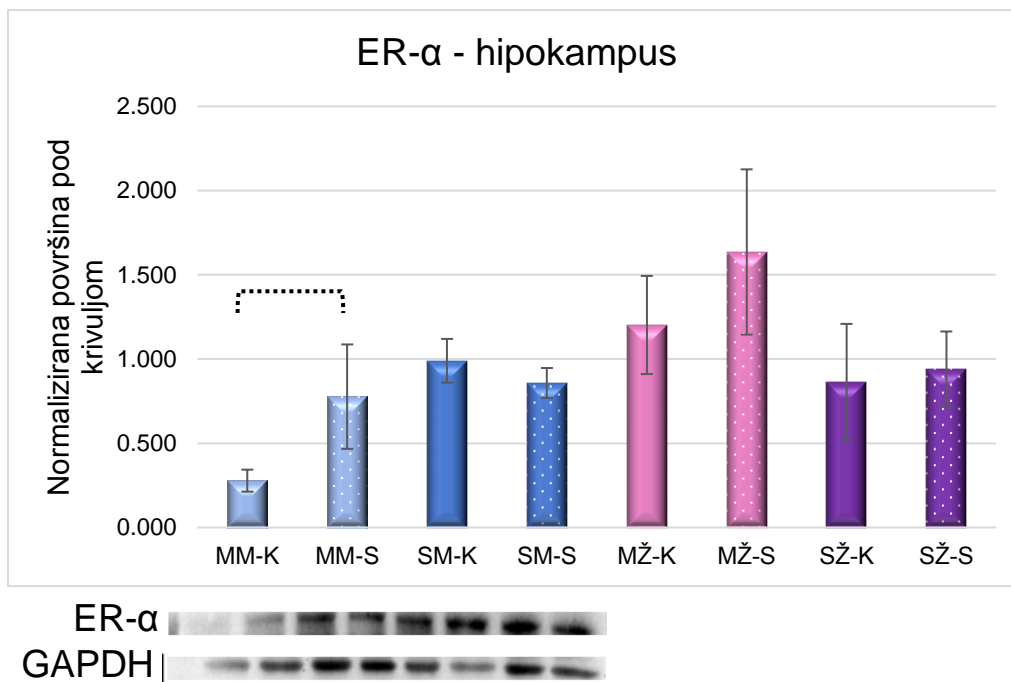


**Slika 5.6.1.2.** Izražaj GR u citosolnim proteinima malog mozga svih skupina životinja. Rezultati su prikazani grafički te reprezentativnom slikom ispod – prikazan je primjer detekcije proteinskih vrpca GR te unutarnje kontrole  $\beta$ -tubulina. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu, GR = glukokortikoidni receptor.

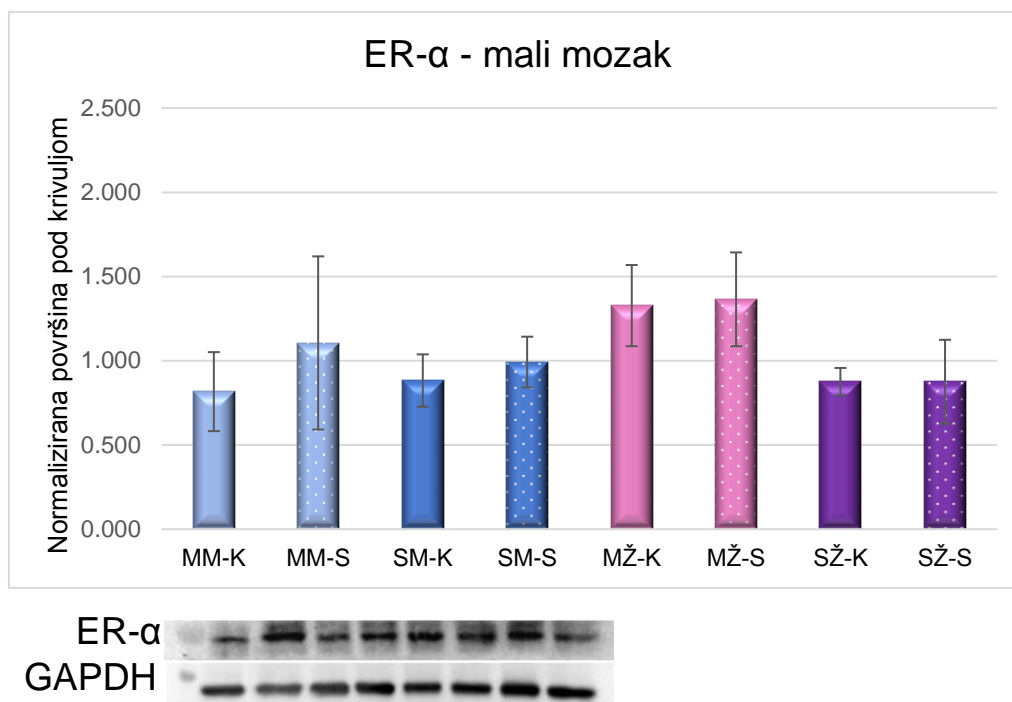
### 5.6.2. Izražaj estrogenskog receptora u hipokampusu i malom mozgu

Izražaj ER- $\alpha$  analiziran je u citosolnim proteinima hipokampusu i maloga mozga. Analizirane su proteinske vrpce po tri uzorka za svaku skupinu životinja u oba tkiva. Detektiran je signal vrpca pri oko 66 kDa, a za svaki je uzorak na gel nanoseno 15 $\mu$ g proteina. Osim u slučaju starijih mužjaka u hipokampusu, u svim je ostalim skupinama u oba tkiva izražaj ER- $\alpha$  smanjen pod utjecajem kroničnog stresa. Statistički značajni rezultati dobiveni su korištenjem Mann Whitney testa. U kontrolnoj skupini mladih mužjaka uočen je niski izražaj ER- $\alpha$  u hipokampusu (slika 5.6.2.1) u usporedbi sa skupinom izloženom stresu ( $p = 0.049$ ). Izražaj ER- $\alpha$  bio je još veći u kontrolnoj skupini starijih ženki

u hipokampusu, a dodatno je povećan pod utjecajem kroničnog stresa. Za razliku od hipokampusa, u malom mozgu nisu uočene značajne promjene izražaja ER- $\alpha$  (slika 5.6.2.2).



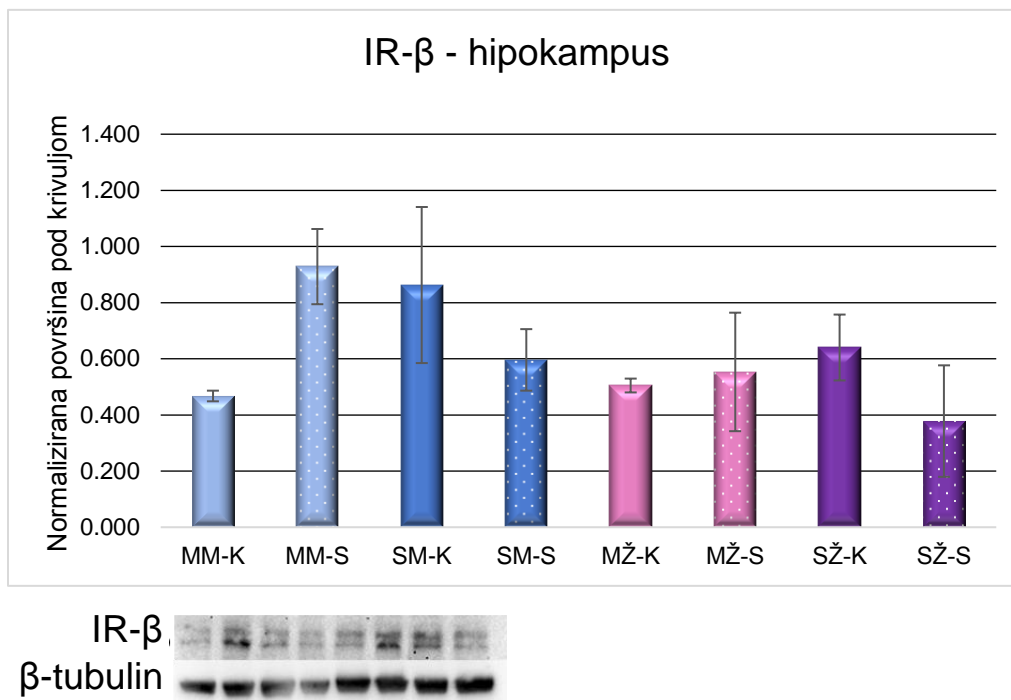
**Slika 5.6.2.1.** Izražaj ER- $\alpha$  u citosolnim proteinima hipokampusa svih skupina životinja. Rezultati su prikazani grafički te reprezentativnom slikom ispod – prikazan je primjer detekcije proteinskih vrpca ER- $\alpha$  te unutarnje kontrole GAPDH. Statistički značajan rezultat dobiven Mann Whitneyevim testom označen je vitičastom isprekidanom crtom;  $p < 0.05$ . MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu, ER- $\alpha$  =  $\alpha$ -podjedinica estrogenskog receptora, GAPDH = gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza.



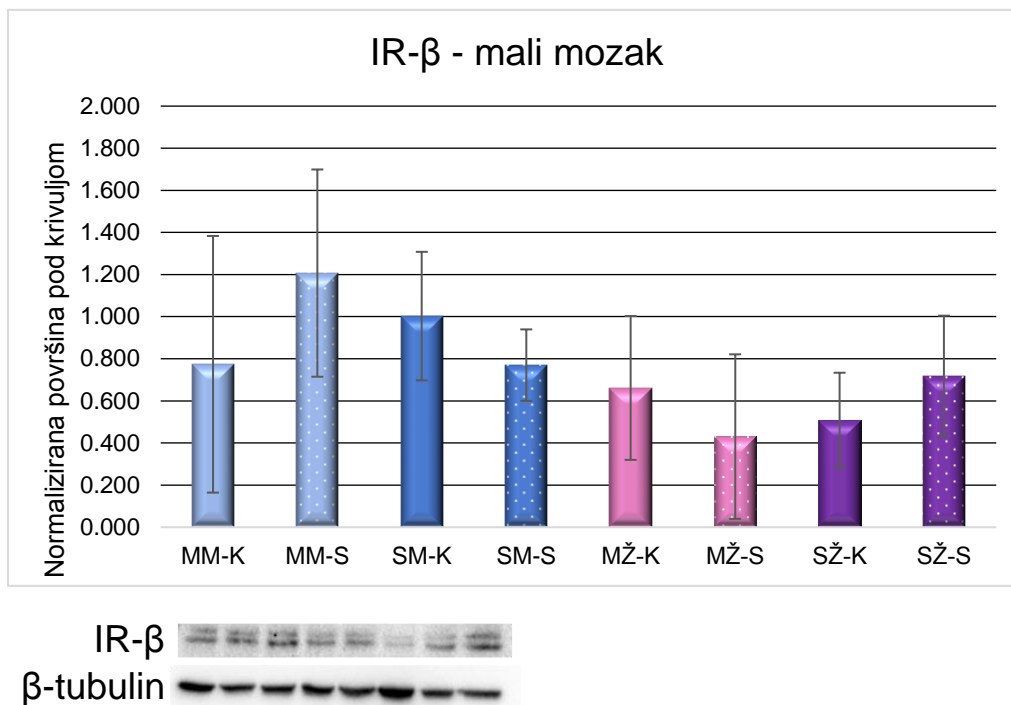
**Slika 5.6.2.2.** Izražaj ER- $\alpha$  u citosolnim proteinima malog mozga svih skupina životinja. Rezultati su prikazani grafički te reprezentativnom slikom ispod – prikazan je primjer detekcije proteinskih vrpca ER- $\alpha$  te unutarnje kontrole GAPDH. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu, ER- $\alpha$  =  $\alpha$ -podjedinica estrogenskog receptora, GAPDH = glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenaza.

### 5.6.3. Izražaj $\beta$ -podjedinice inzulinskog receptora u malom mozgu i hipokampusu

Izražaj IR- $\beta$  analiziran je u citosolnim proteinima hipokampusu i maloga mozga. Analizirane su proteinske vrpce na po tri uzorka za svaku skupinu životinja u oba tkiva. Detektiran je signal vrpca pri oko 155 kDa, a od svakog je uzorka na gel nanoseno 15 $\mu$ g proteina. Izražaj receptora se smanio u odgovoru na stres u starijih mužjaka i ženki dok se u mladih mužjaka i ženki povećao (slika 5.6.3.1). U malom je mozgu uočen drukčiji trend promjene receptora – povećanje je uočeno u mladih mužjaka i starijih ženki, a smanjenje u mladih ženki te starijih mužjaka u odgovoru na kronični stres (5.6.3.2).



**Slika 5.6.3.1.** Izražaj IR- $\beta$  u citosolnim proteinima hipokampusu svih skupina životinja. Rezultati su prikazani grafički te reprezentativnom slikom ispod – prikazan je primjer detekcije proteinskih vrpca IR- $\beta$  te unutarnje kontrole  $\beta$ -tubulina. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu, IR- $\beta$  =  $\beta$ -podjedinica inzulinskog receptora.

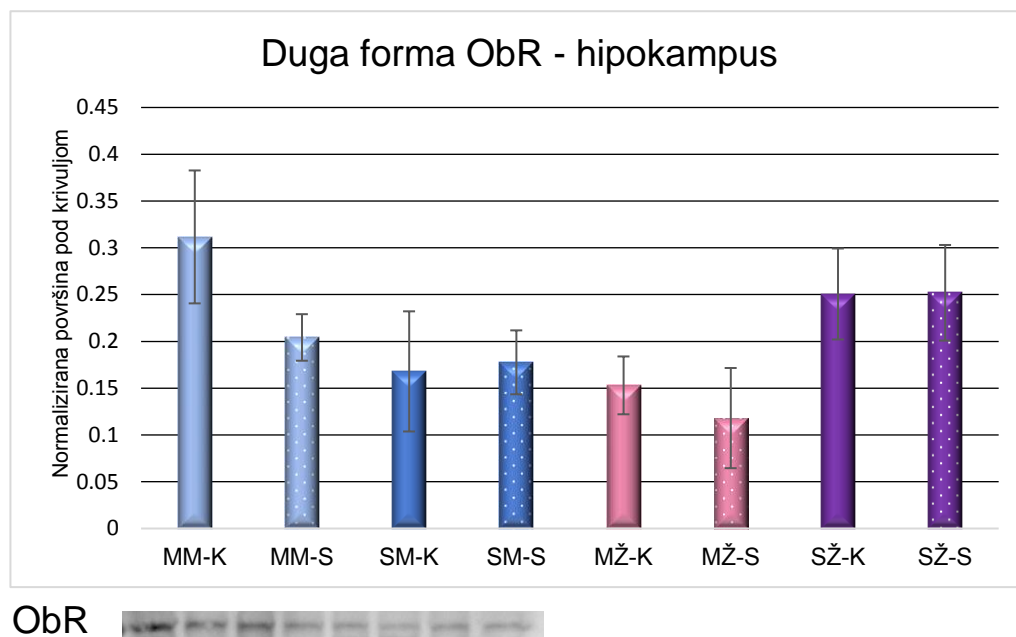


**Slika 5.6.3.2.** Izražaj IR- $\beta$  u citosolnim proteinima malog mozga svih skupina životinja. Rezultati su prikazani grafički te reprezentativnom slikom ispod – prikazan je primjer detekcije proteinskih vrpca IR- $\beta$  te unutarnje kontrole  $\beta$ -tubulina. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu, IR- $\beta$  =  $\beta$ -podjedinica inzulinskog receptora.

#### 5.6.4. Izražaj leptinskog receptora u malom mozgu i hipokampusu

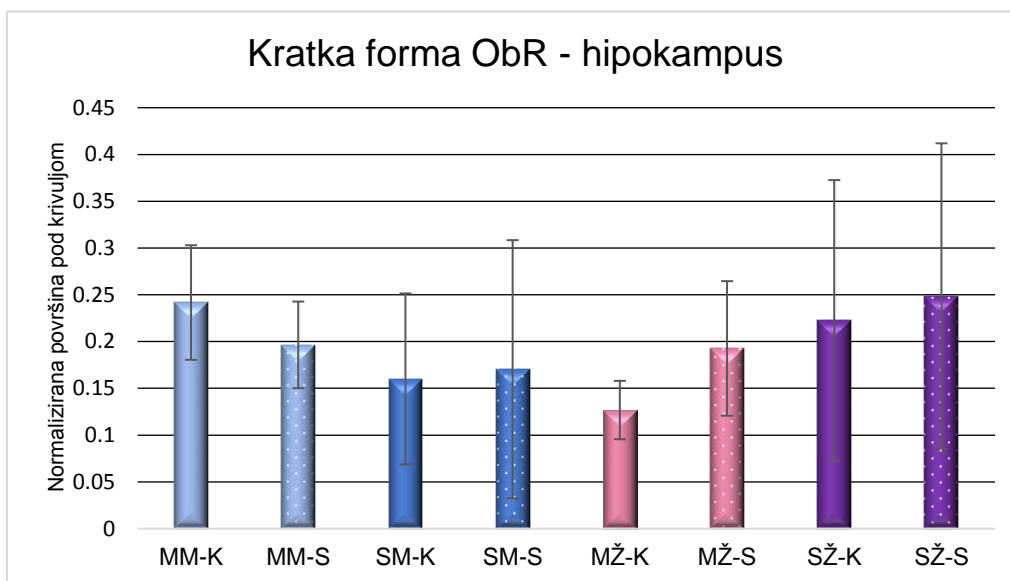
Analiziran je izražaj leptinskog receptora visokospecifičnim primarnim protutijelom koje detektira dugu (125 kDa) i kratku formu ObR-a (100 kDa). Svaki je uzorak nanesen na gel u količini od 15  $\mu$ g, pokus je ponovljen korištenjem tri biološka replikata iz svake skupine životinja. Najveći izražaj duge forme ObR-a u hipokampusu primjećen je u kontrolnoj skupini mladih mužjaka, a pod utjecajem stresa izražaj se smanjio. U kontrolnoj skupini mladih ženki uočen je niži izražaj duge forme ObR-a nego u mladim mužjaka, a u obje je skupine izražaj proteina smanjen nakon izlaganja stresu. Starije životinje pokazuju male promjene izražaja duge forme ObR-a pod utjecajem stresa, s ukupno većim izražajem

ObR-a u ženki nego u mužjaka (slika 5.6.4.1). Izražaj kratke forme ObR-a u hipokampusu slično se mijenjao kao i duga forma ObR-a, osim u skupini mladih ženki gdje je uočen suprotan trend povećanja izražaja kratke forme ObR-a pod utjecajem stresa (slika 5.6.4.2). Statističkim analizama nije postignuta značajnost opisanih rezultata.



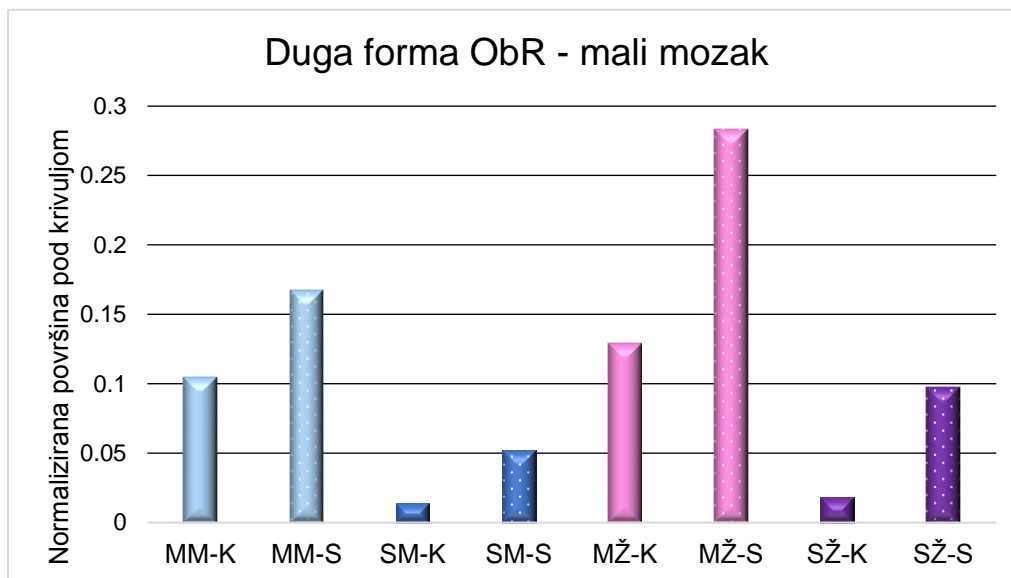
**Slika 5.6.4.1.** Izražaj duge forme ObR-a u ukupnim membranskim proteinima hipokampusu svih skupina životinja. Rezultati su prikazani grafički te reprezentativnom slikom ispod. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu, ObR = leptinski receptor.

Duga i kratka forma ObR-a u malom mozgu analizirane su na isti način kao i u hipokampusu, no pokusi su ponovljeni jednom te iz tog razloga nije bilo moguće statistički analizirati rezultate. Izražaj duge forme ObR-a pokazuje vrlo zanimljivi trend povećanja u svim skupinama životinja, no izražaj proteina je u starijih životinja dramatično niži nego u mladih (slika 5.6.4.3). Izražaj kratke forme ObR-a u malom mozgu smanjen je u starijih životinja, a povećan u mlađih u uvjetima stresa (slika 5.6.4.4).



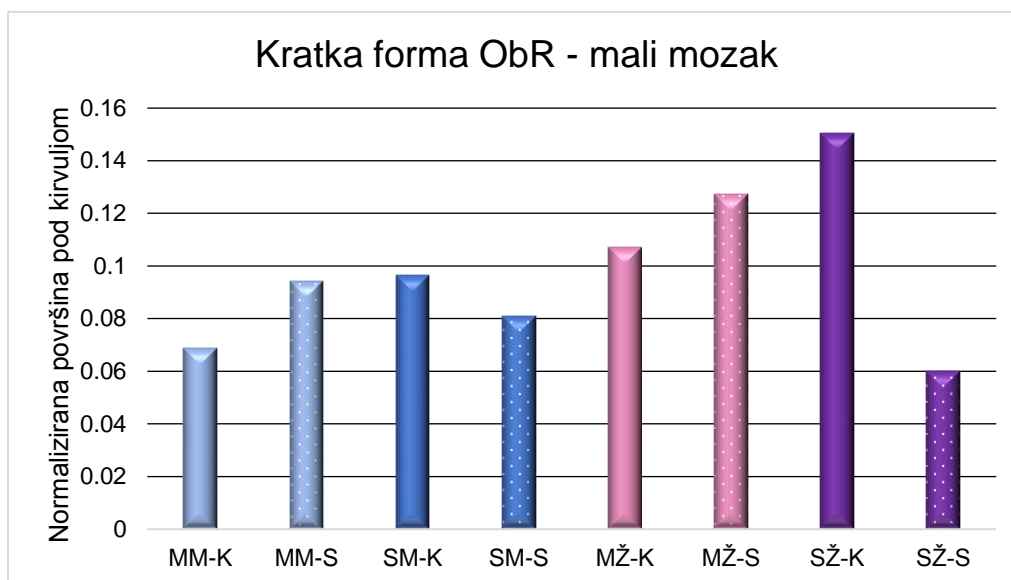
ObR

**Slika 5.6.4.2.** Izražaj kratke forme ObR-a u ukupnim membranskim proteinima hipokampusu svih skupina životinja. Rezultati su prikazani grafički te reprezentativnom slikom ispod. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu, ObR = leptinski receptor.



**Slika 5.6.4.3.** Izražaj duge forme ObR-a u ukupnim membranskim proteinima malog mozga svih skupina životinja. Rezultati su prikazani grafički te reprezentativnom slikom ispod. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu, ObR = leptinski receptor.



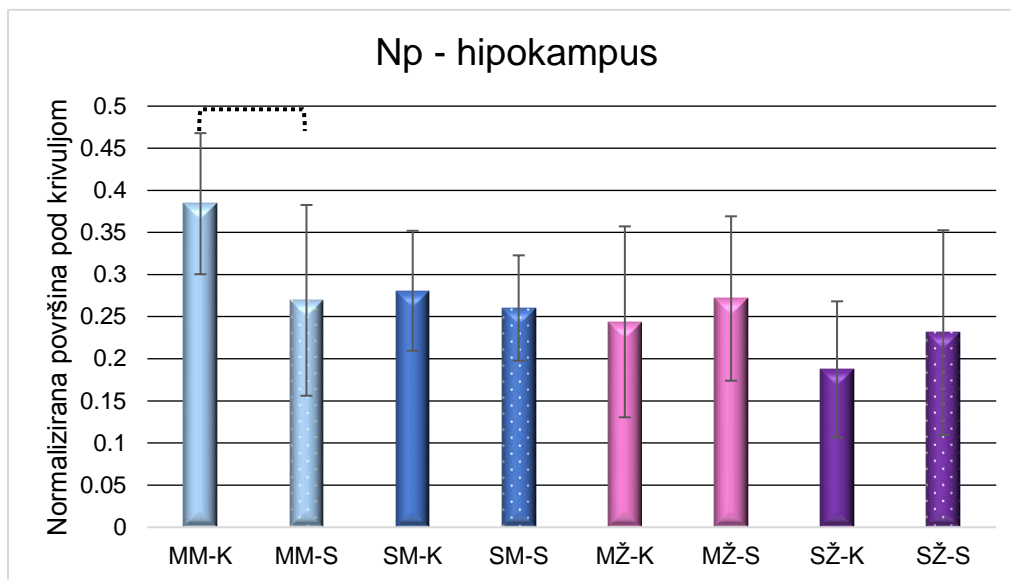


ObR 

**Slika 5.6.4.4.** Izražaj kratke forme ObR-a u ukupnim membranskim proteinima malog mozga svih skupina životinja. Rezultati su prikazani grafički te reprezentativnom slikom ispod. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŹ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŹ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŹ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŹ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu, ObR = leptinski receptor.

### 5.6.5. Izražaj neuroplastina u malom mozgu i hipokampusu

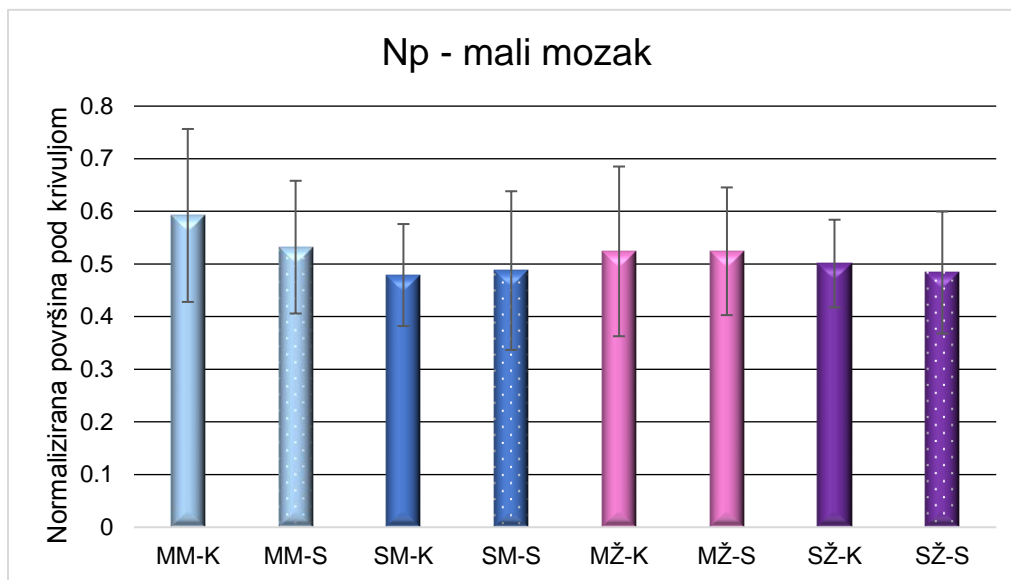
Izražaj neuroplastina detektiran je u ukupnim membranskim proteinima. Uočene su proteinske vrpce očekivane veličine od 65 kDa, a svaki je uzorak nanesen na gel u količini od 15 µg. Izražaj Np u hipokampusu (slika 5.6.5.1) bio je najviši u kontrolnoj skupini mladih mužjaka, a pod utjecajem stresa uočen je njegov pad ( $p = 0.049$ ). Statistička značajnost postignuta je Mann Whitneyevim testom. U starijih mužjaka izražaj neuroplastina također je opadao, dok je u obje dobne skupine ženki rastao pod utjecajem stresa no bez statistički značajnih promjena.



Np

**Slika 5.6.5.1.** Izražaj neuroplastina u ukupnim membranskim proteinima hipokampusu svih skupina životinja. Rezultati su prikazani grafički te reprezentativnom slikom ispod. Statistički značajan rezultat dobiven Mann Whitneyevim testom označen je vitičastom isprekidanom crtom;  $p < 0.05$ . MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu, Np = neuroplastin.

Izražaj Np u malom mozgu (slika 5.6.5.2) smanjen je u odgovoru na stres u skupini mladih mužjaka. U ostalim se skupinama izražaj Np uglavnom nije promijenio pod utjecajem kroničnog stresa.

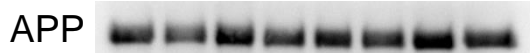
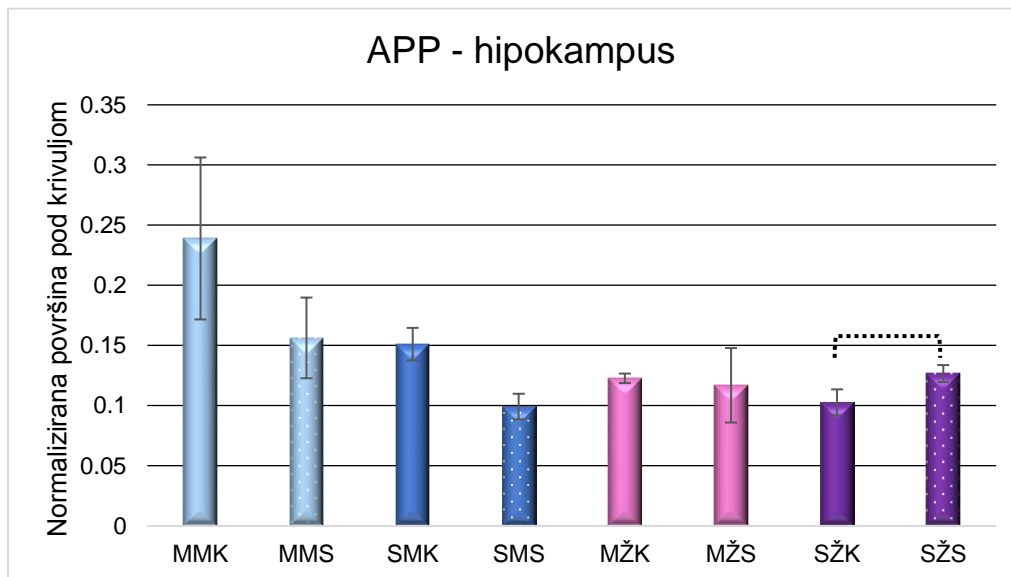


Np 

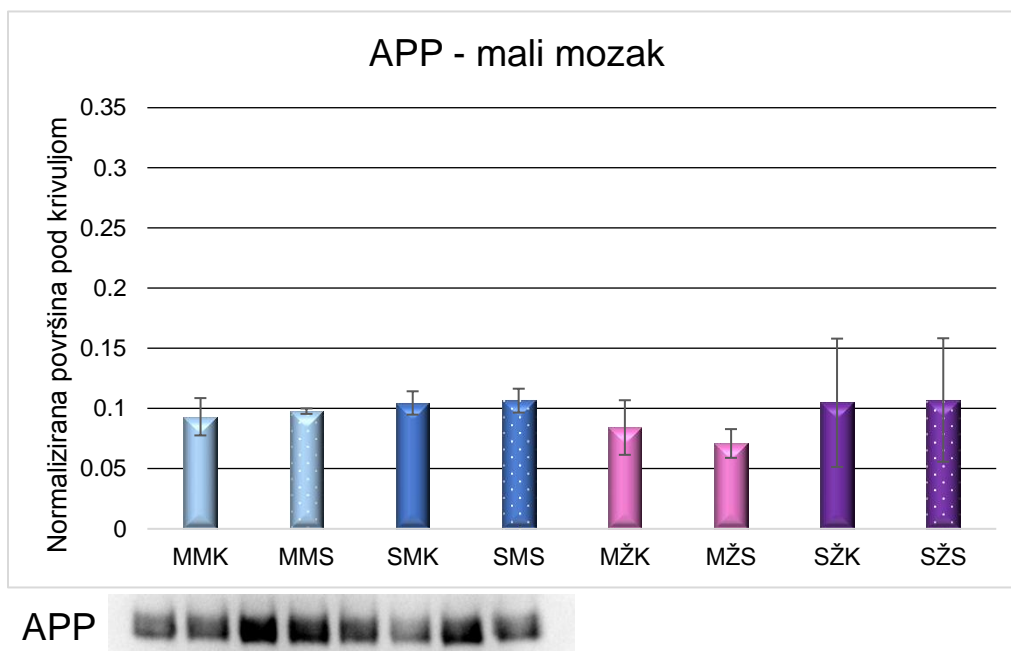
**Slika 5.6.5.2.** Izražaj neuroplastina u ukupnim membranskim proteinima malog mozga svih skupina životinja. Rezultati su prikazani grafički te reprezentativnom slikom ispod. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu, Np = neuroplatin.

### 5.6.6. Izražaj preteče amiloida u malom mozgu i hipokampusu

APP je detektiran u ukupnim membranskim proteinima hipokampusu i malog mozga na očekivanoj veličini od oko 100 kDa. Od svakog je uzorka na gel nanoseno 15 µg proteina. Izražaj APP-a u hipokampusu (slika 5.6.6.1) pokazuje sniženje u svim skupinama opterećenima stresom, osim starijih ženki gdje se izražaj povećava ( $p = 0.049$ ). Za statističke analize korišten je Mann Whitneyev test. S obzirom na utjecaj APP-a u AD, zanimljivo je smanjenje njegova izražaja u svim skupinama osim skupine starijih ženki. Izražaj APP-a u malom mozgu nije se dramatično promijenio u uvjetima stresa, a uočen je blagi pad njegova izražaja u mladih ženki (slika 5.6.6.2).



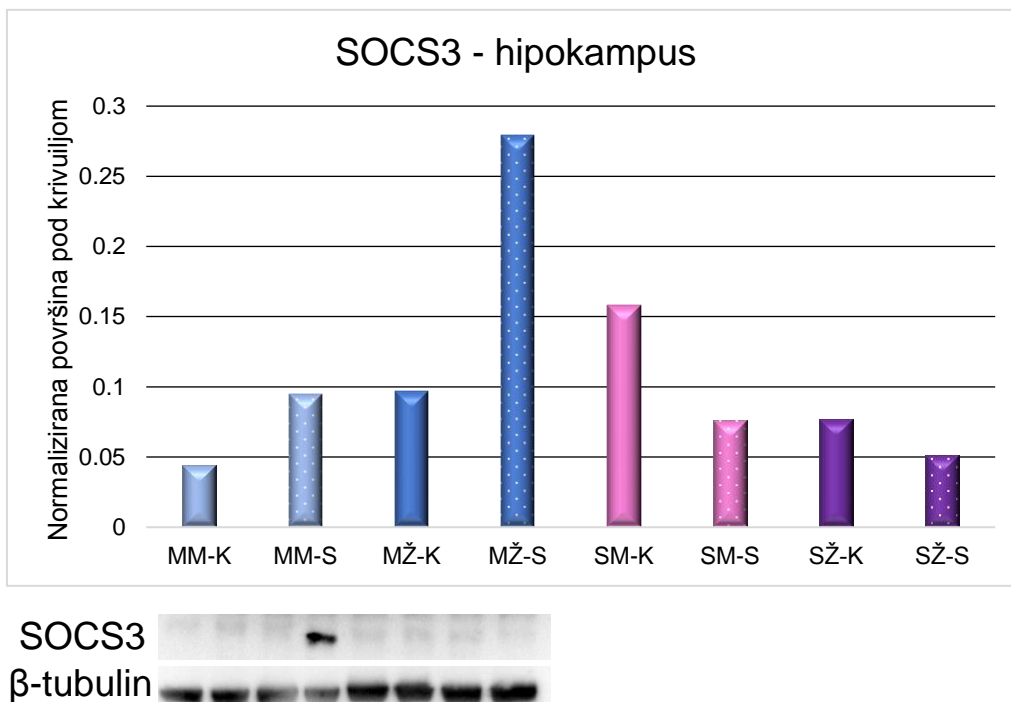
**Slika 5.6.6.1.** Izražaj APP-a u ukupnim membranskim proteinima hipokampusu svih skupina životinja. Rezultati su prikazani grafički te reprezentativnom slikom ispod. Statistički značajan rezultat dobiven Mann Whitneyevim testom označen je vitičastom isprekidanom crtom;  $p < 0.05$ . MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu, APP = preteča amiloida.



**Slika 5.6.6.2.** Izražaj APP-a u ukupnim membranskim proteinima malog mozga svih skupina životinja. Rezultati su prikazani grafički te reprezentativnom slikom ispod. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu, APP = preteča amiloida.

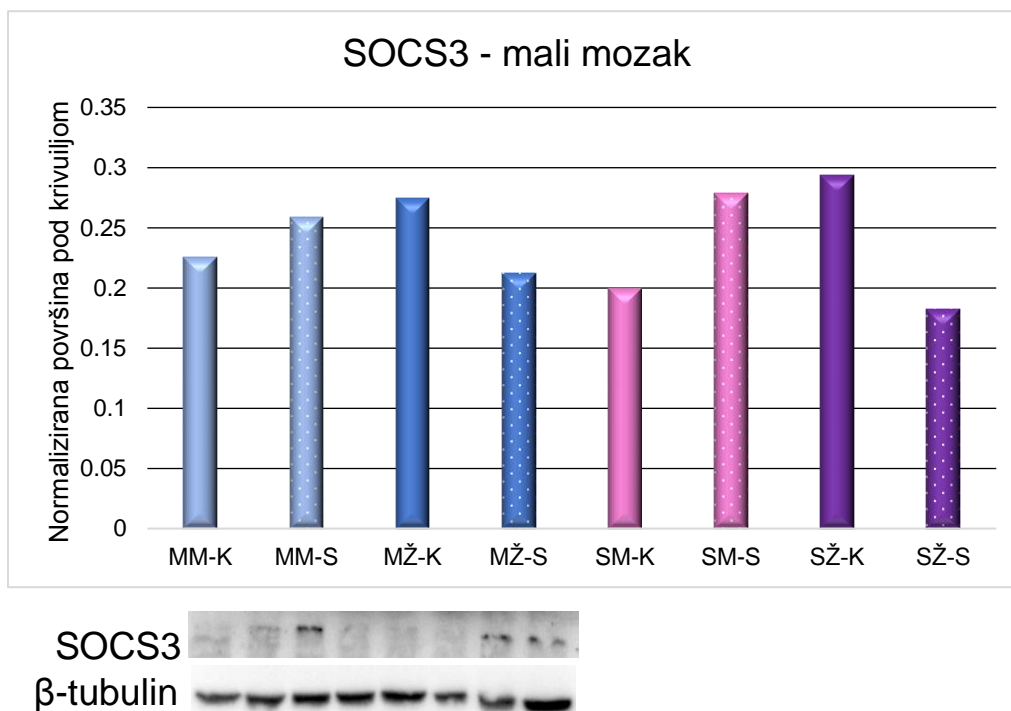
### 5.6.7. Nizvodni signalni putovi inzulina i leptina

*Western blottingom* su analizirani nizvodni signalni putovi inzulina i leptina. Detektirane su proteinske vrpce supresora citokinske signalizacije 3 (SOCS3) veličine 25 kDa u citosolnim proteinima hipokampusa i malog mozga. Od svakog je uzorka na gel nanoseno 15 µg proteina. Bazalne vrijednosti izražaja SOCS3 bile su niže u mladih mužjaka i starijih ženki te nešto više u starijih mužjaka i mladih ženki. Pod utjecajem stresa, dramatično povećanje izražaja SOCS3 u hipokampusu (slika 5.6.7.1) uočeno je u starijih mužjaka, a izražaj je također bio povećan i u mladih mužjaka. U ženki je uočen trend smanjenog izražaja, posebice u mladih ženki.



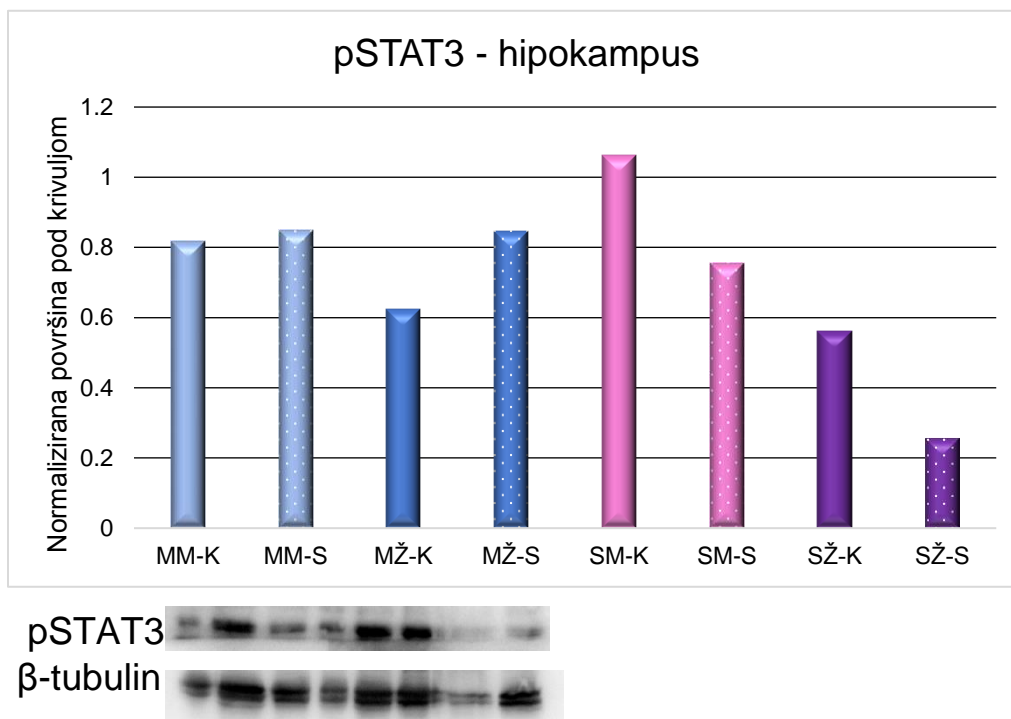
**Slika 5.6.7.1.** Izražaj SOCS3 u citosolnim proteinima hipokampusu svih skupina životinja. Rezultati su prikazani grafički te reprezentativnom slikom ispod – prikazan je primjer detekcije proteinskih vrpca SOCS3 te unutarnje kontrole β-tubulina. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu, SOCS3 = supresor citokinske signalizacije 3.

U malom je mozgu uočena dobno specifična promjena izražaja SOCS3 u ovisnosti o stresu (slika 5.6.7.2). U mladih mužjaka i ženki uočeno je povećanje izražaja, dok je u starijih mužjaka i ženki uočeno smanjenje izražaja SOCS3 pod utjecajem stresa.



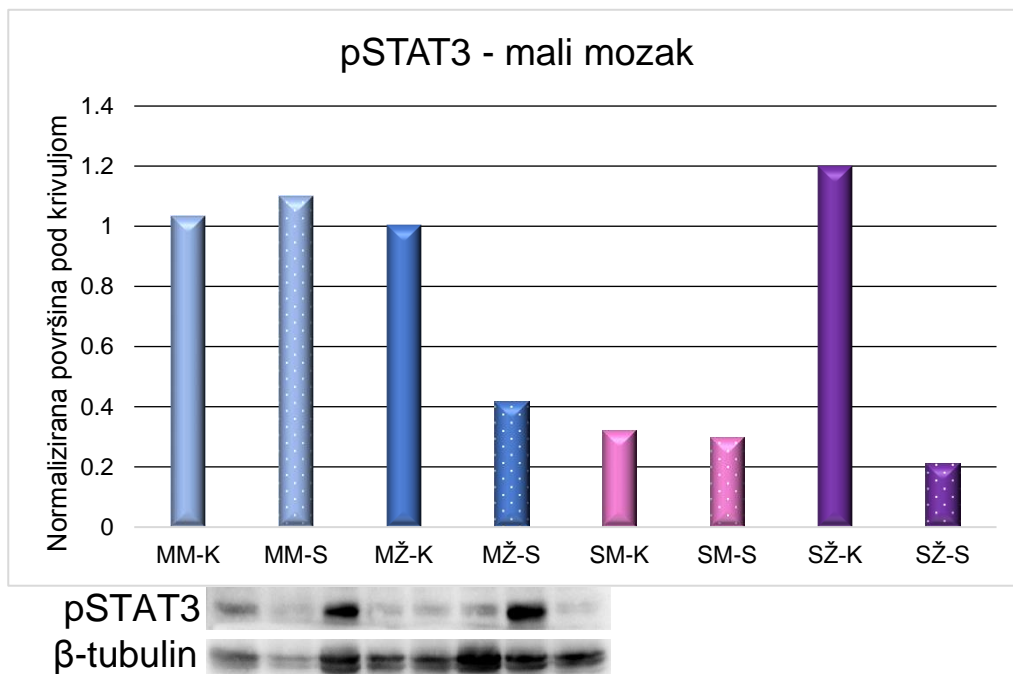
**Slika 5.6.7.2.** Izražaj SOCS3 u citosolnim proteinima malog mozga svih skupina životinja. Rezultati su prikazani grafički te reprezentativnom slikom ispod – prikazan je primjer detekcije proteinskih vrpca SOCS3 te unutarnje kontrole β-tubulina. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu, SOCS3 = supresor citokinske signalizacije 3.

ObR pokreće signalizaciju fosforiliranim signalnim pojačivačem i aktivatorom transkripcije 3 (STAT3) koji u hipokampusu ima zaštitnu ulogu te utječe na preživljenje neurona. Protein pSTAT3 utvrđen je praćenjem fosforiliranog epitopa na položaju Tyr705, a uočene su proteinske vrpce veličine 85 kDa. Izražaj pSTAT3 u hipokampusu (slika 5.6.7.3) rastao je u starijih mužjaka, a opadao u obje dobne skupine ženki pod utjecajem kroničnog stresa. U mladih mužjaka nisu uočene takve promjene izražaja pSTAT-a. Izražaj pSTAT3 u malom mozgu (slika 5.6.7.4) pokazuje spolno i dobno specifičan trend. U mladih je mužjaka uočen trend visokog uzražaja pSTAT3 koji se nije mijenjao pod utjecajem stresa. U starih je mužjaka također detektiran visok izražaj pSTAT3 koji se smanjio pod utjecajem stresa. Vrlo sličan, ali još dramatičniji trend uočen je i u starijih ženki. U mladih je ženki izražaj pSTAT3 bio nizak bez promjena u uvjetima stresa.



**Slika 5.6.7.3.** Izražaj pSTAT3 u citosolnim proteinima hipokampusu svih skupina životinja. Rezultati su prikazani grafički te reprezentativnom slikom ispod – prikazan je primjer detekcije proteinskih vrpca pSTAT3 te unutarnje kontrole β-tubulina. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu, pSTAT3 = fosforilirani signalni pojačivač i aktivator transkripcije 3.





**Slika 5.6.7.4.** Izražaj pSTAT3 u citosolnim proteinima malog mozga svih skupina životinja. Rezultati su prikazani grafički te reprezentativnom slikom ispod – prikazan je primjer detekcije proteinskih vrpca pSTAT3 te unutarne kontrole  $\beta$ -tubulina. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu, pSTAT3 = fosforilirani signalni pojačivač i aktivator transkripcije 3.

Sažeti rezultati svih analiza *Western blotting* metodom prikazani su u tablici 5.6.7.1.

**Tablica 5.6.7.1.** Sažeti rezultati analize izražaja proteina u hipokampusu i malom mozgu svih skupina životinja izloženih kroničnom stresu.

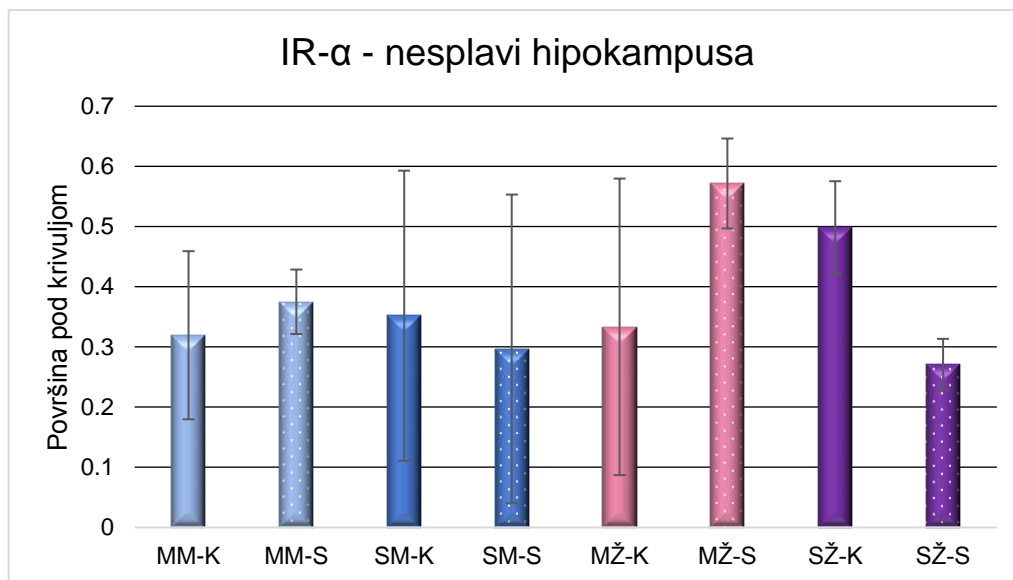
PODRUČJE	HIPOKAMPUS				MALI MOZAK			
	MM-S	MŽ-S	SM-S	SŽ-S	MM-S	MŽ-S	SM-S	SŽ-S
GR	↑	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↓
ER-α	↑↑	↑	↓	↑	↑	↑	↑	↑
IR-β	↑	↑	↓	↓	↑	↓	↓	↑
ObR-duga forma	↓	↓	↑	NP	↑	↑	↑	↑
ObR-kratka forma	↓	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↓
Np65	↓↓	↑	↓	↑	↓	NP	NP	NP
APP	↓	↓	↓	↑↑	↑	↓	NP	NP
SOCS3	↑	↓	↑	↓	↑	↑	↓	↓
pSTAT	↑	↓	↑	↓	↑	NP	↓	↓

Kratice: MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu, GR = glukokortikoidni receptor, ER-α = alfa podjedinica estrogenskog receptora, IR-β = beta podjedinica inzulinskog receptora, ObR = leptinski receptor, NP65 = neuroplastin, APP = preteča amiloida, SOCS3 = supresor citokinske signalizacije 3, pSTAT= fosforilirani signalni pojačivač i aktivator transkripcije 3, NP - nema promjena, DG = dentatni girus, ↑↑ - statistički značajno povećanje parametra s obzirom na odgovarajuću kontrolnu skupinu, ↓↓ - statistički značajno smanjenje parametra s obzirom na odgovarajuću kontrolnu skupinu, ↑ - trend povećanja parametra s obzirom na odgovarajuću kontrolnu skupinu bez utvrđene statističke značajnosti, ↓ - trend smanjenja parametra s obzirom na odgovarajuću kontrolnu skupinu bez utvrđene statističke značajnosti. Statističke su značajnosti utvrđene Mann Whitneyevim testom; p<0.05.

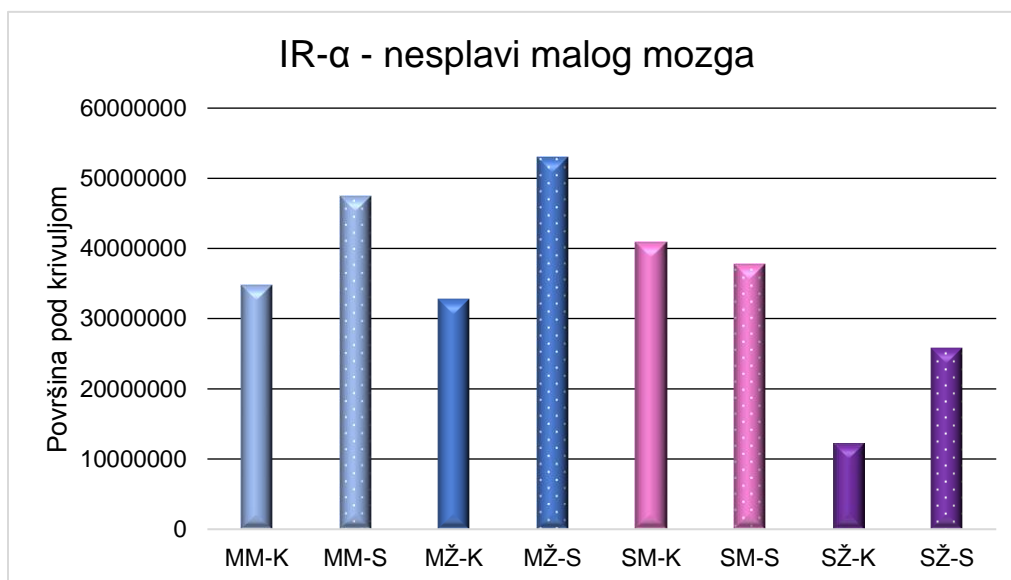
## 5.7. Promjena membranske lokacije odabranih proteina

### 5.7.1. Inzulinski receptor u lipidnim nesplavima hipokampusa i malog mozga

Smještaj IR- $\alpha$  utvrđen je u uzorcima lipidnih splavi i nesplavi u hipokampusu i malom mozgu. Za potrebe određivanja smještaja proteina unutar ili izvan lipidnih splavi nije korištena određena količina proteina već je od svakog uzorka nanešen isti volumen uzorka (15 $\mu$ l). Utvrđene su proteinske vrpce od oko 160 kDa što odgovara očekivanoj veličini proteina. Iz svake su pojedinačne izolacije lipidnih splavi dobivena dva uzorka lipidnih splavi i dva uzorka nesplavi. Uzorci lipidnih splavi su uvijek združeni u jedan kao i uzorci nesplavi. Analizom smještaja IR- $\alpha$  u hipokampusu, nije uočen izražaj proteina u lipidnim splavima. Protein je detektiran isključivo u nesplavima hipokampusa (slika 5.7.1.1). Pokus je ponovljen na dva seta bioloških replikata svih skupina životinja te iz tog razloga nisu utvrđene statističke značajnosti. U malom je mozgu također utvrđen signal IR- $\alpha$  gotovo isključivo u nesplavima (5.7.1.2) dok je u splavima uočen vrlo slab signal kojega nije bilo moguće prikazati grafički.



**Slika 5.7.1.1.** Izražaj IR- $\alpha$  u nesplavima hipokampusa svih skupina životinja. Rezultati su prikazani grafički te reprezentativnom slikom ispod. Pokus je ponovljen korištenjem dva seta bioloških replikata svih skupina životinja. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu, IR- $\alpha$  =  $\alpha$ -podjedinica inzulinskog receptora.

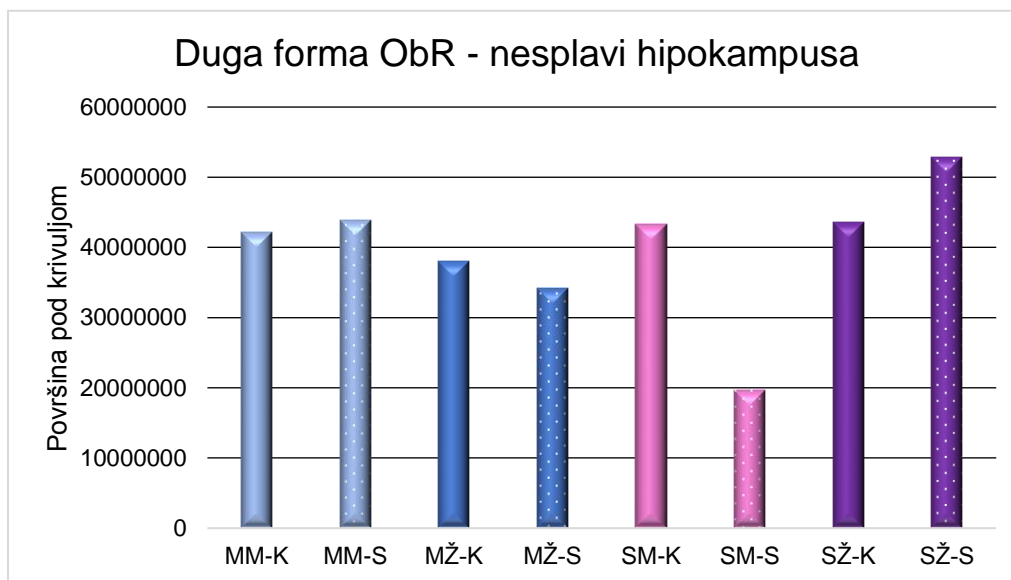


IR-α

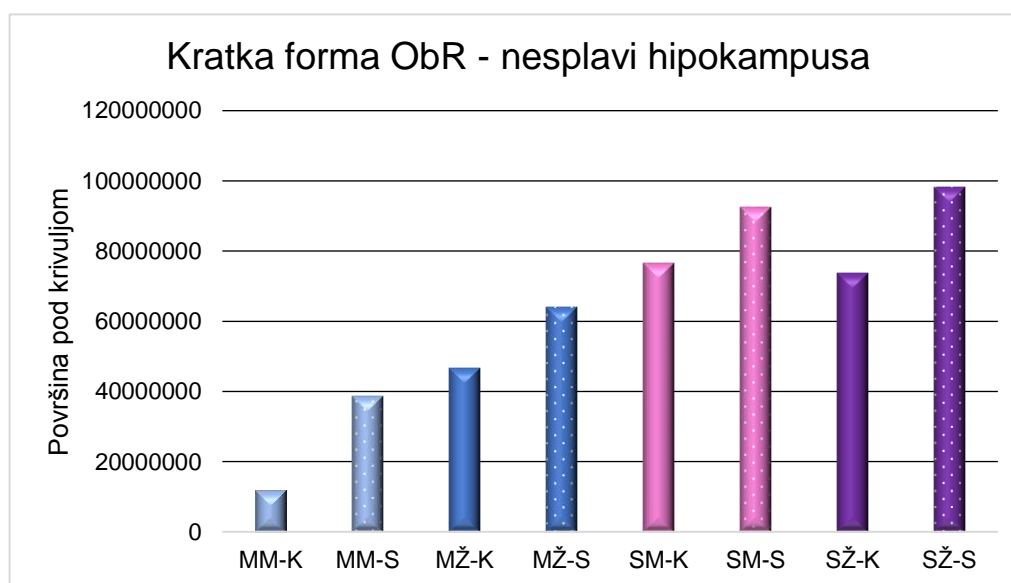
**Slika 5.7.1.2.** Izražaj IR- $\alpha$  u nesplavima malog mozga svih skupina životinja. Rezultati su prikazani grafički te reprezentativnom slikom ispod. Pokus je ponovljen korištenjem jednog seta uzoraka nesplavi svih skupina životinja. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu, IR- $\alpha$  =  $\alpha$ -podjedinica inzulinskog receptora.

### 5.7.2. Leptinski receptor u lipidnim nesplavima hipokampusa i malog mozga

Smještaj duge (125 kDa) i kratke (100 kDa) forme ObR-a utvrđen je u uzorcima lipidnih splavi i nesplavi u hipokampusu i malom mozgu. Za potrebe određivanja smještaja proteina unutar ili izvan lipidnih splavi nije korištena određena količina proteina već je od svakog uzorka nanešen isti volumen uzorka (15 $\mu$ l). U lipidnim splavima hipokampusa nije utvrđena niti jedna od dviju analiziranih formi ObR-a. U nesplavima hipokampusa detektirane su obje forme ObR-a (slika 5.7.2.1). U malom je mozgu uočen isti obrazac smještaja obje promatrane forme ObR-a u nesplavima dok u lipidnim splavima nije uočen signal (5.7.2.2).

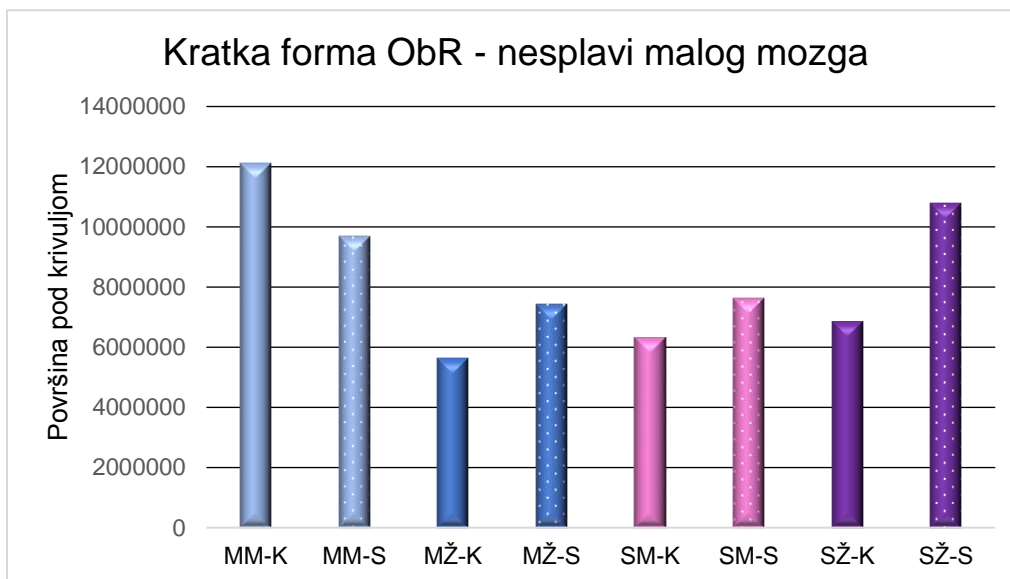
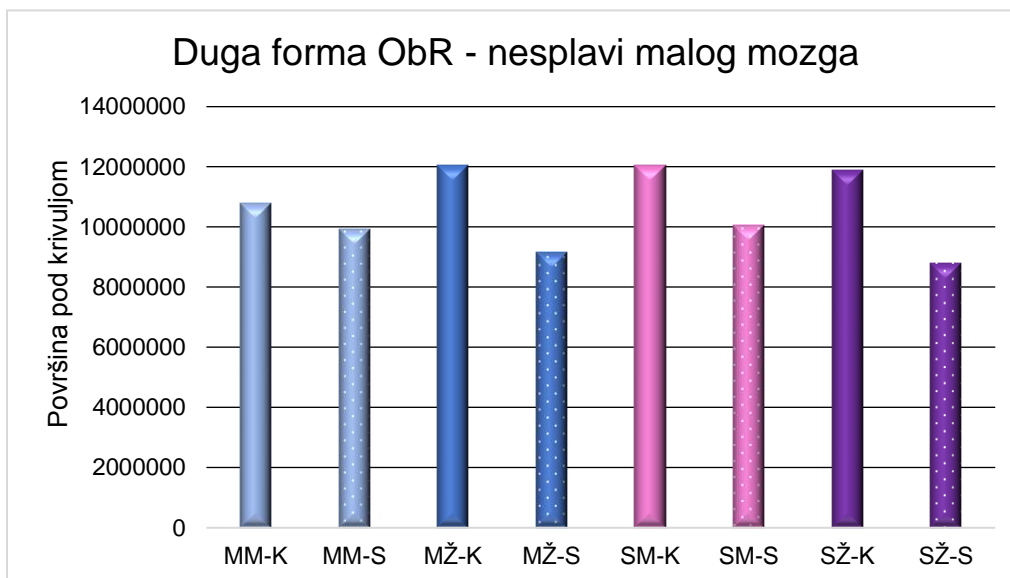


ObR-duga forma

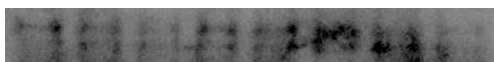


ObR-kratka forma

**Slika 5.7.2.1.** Smještaj duge (gornji grafički prikaz) i kratke (donji grafički prikaz) forme ObR-a nesplavima hipokampusa svih skupina životinja. Rezultati su prikazani grafički te reprezentativnom slikom ispod. Pokus je ponovljen korištenjem jednog seta uzoraka nesplavi svih skupina životinja. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu, ObR = leptinski receptor.



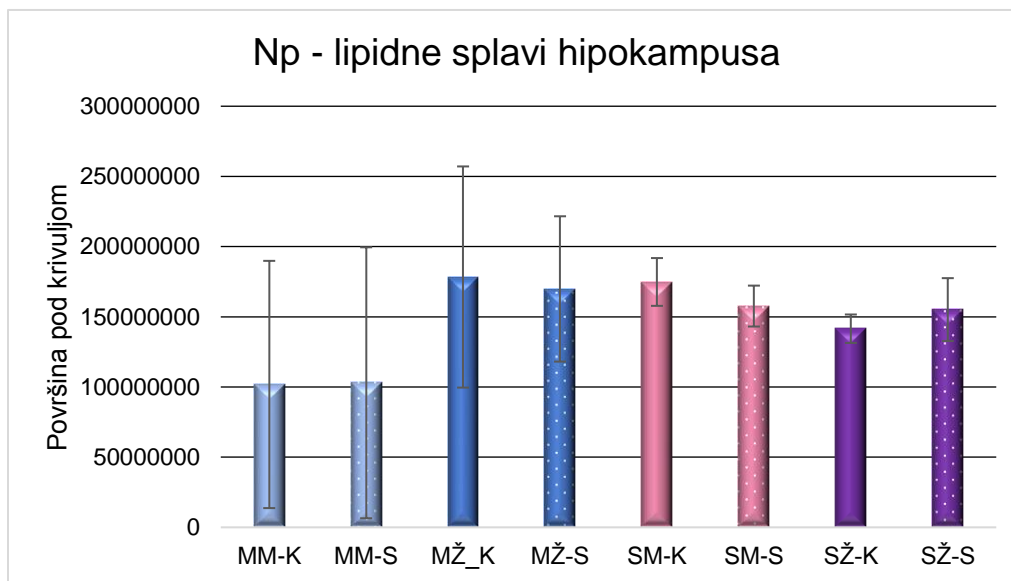
ObR-duga forma  
ObR-kratka forma



**Slika 5.7.2.2.** Smještaj duge (gornji grafički prikaz) i kratke (donji grafički prikaz) forme ObR-a u nesplavima malog mozga svih skupina životinja. Rezultati su prikazani grafički te reprezentativnom slikom ispod grafičkih prikaza. Pokus je ponovljen korištenjem jednog seta uzoraka nesplavi svih skupina životinja. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu, ObR = leptinski receptor.

### 5.7.3. Neuroplastin u lipidnim splavima i izvan njih u hipokampusu i malom mozgu

Neuroplastin je u hipokampusu detektiran u lipidnim splavima svih skupina životinja no u manjoj mjeri u mladim mužjaka (slika 5.7.3.1). U nesplavima hipokampusa trend je suprotan – najveći je izražaj Np uočeni u skupini mladih mužjaka, a nešto manji u ostalim skupinama životinja (5.7.3.2).

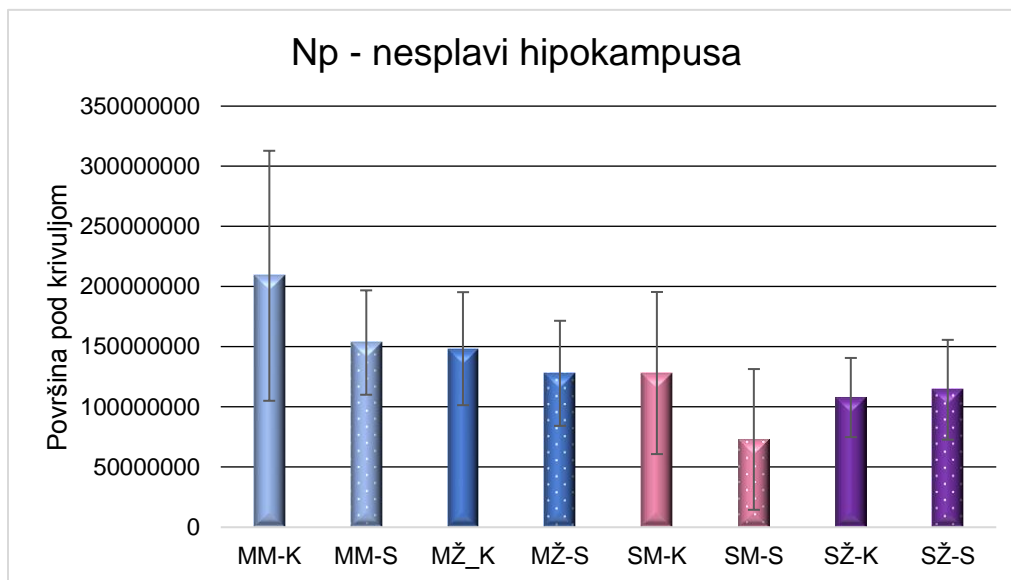


Np

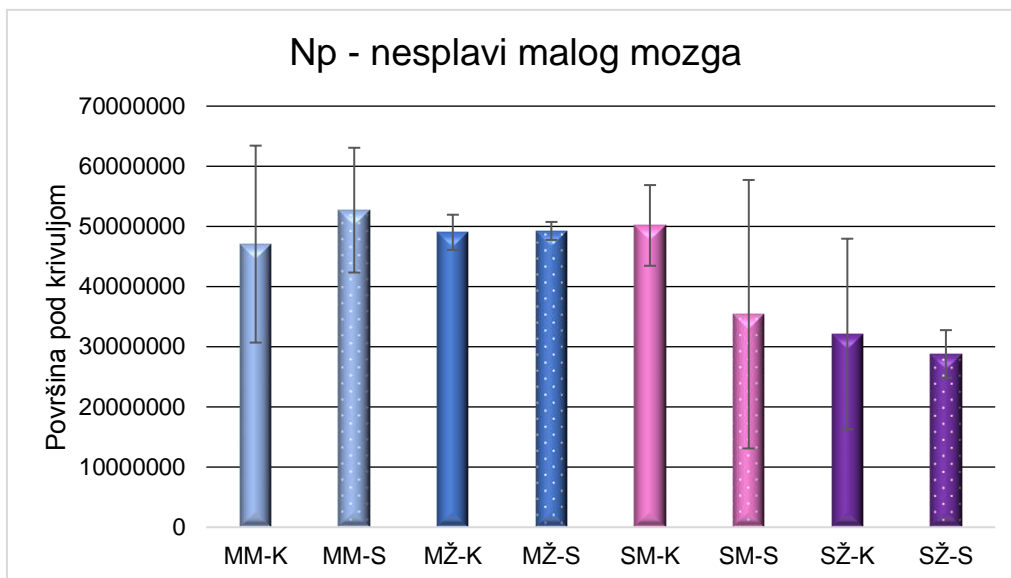
**Slika 5.7.3.1.** Smještaj Np u lipidnim splavima hipokampusa svih skupina životinja. Pokus je ponovljen korištenjem dva biološka replikata nesplavi svih skupina životinja. Rezultati su prikazani grafički te reprezentativnom slikom ispod grafičkih prikaza. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu, Np = neuroplastin.

I u malom je mozgu uočeni izražaj Np u lipidnim splavima i nesplavima. U lipidnim je splavima izražaj Np analiziran jednim ponavljanjem pokusa u svim skupinama životinja. Uočeni je signal u lipidnim splavima no rezultat nije ostvario dobru kvalitetu za izradu grafičkog prikaza. U nesplavima malog mozga uočeni je jasan signal koji pokazuje veći izražaj Np u mužjaka nego ženki (slika 5.7.3.3).





**Slika 5.7.3.2.** Smještaj Np u nesplavima hipokampusa svih skupina životinja. Pokus je ponovljen korištenjem dva biološka replikata nesplavi svih skupina životinja. Rezultati su prikazani grafički te reprezentativnom slikom ispod grafičkih prikaza. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu, Np = neuroplatin.

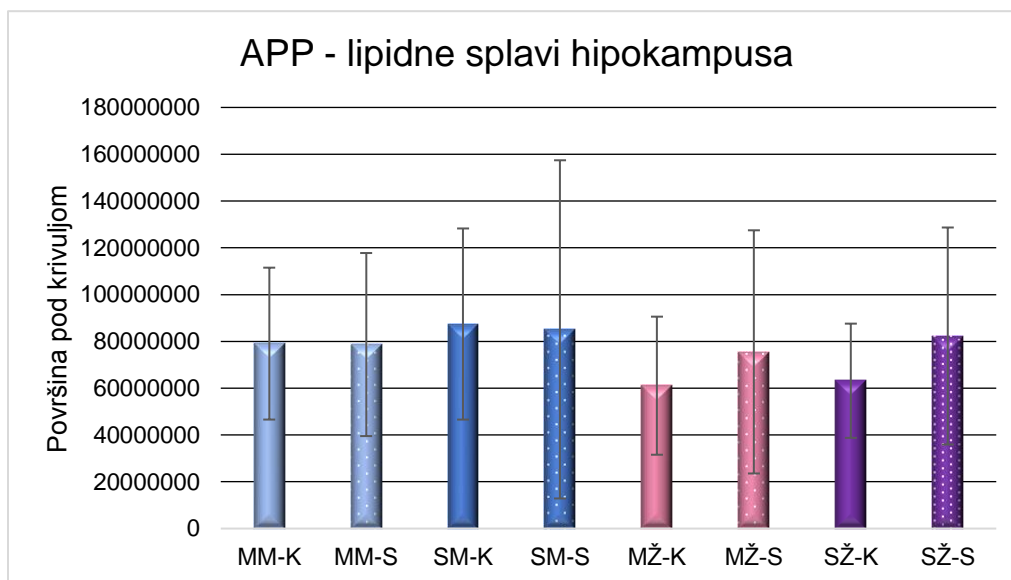


Np nLS 

**Slika 5.7.3.3.** Smještaj Np u nesplavima malog mozga svih skupina životinja (grafički prikaz i slika označena s Np nLS). Pokus je ponovljen korištenjem dva biološka replikata nesplavi svih skupina životinja. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu, Np = neuroplastin.

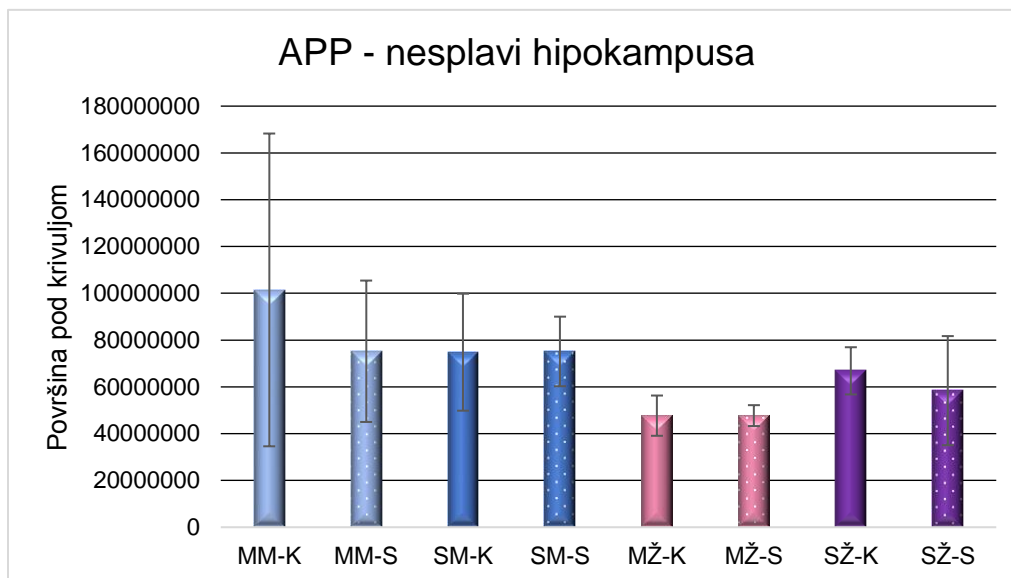
#### 5.7.4. Preteča amiloida u lipidnim splavima i izvan njih u hipokampusu i malom mozgu

Smještaj APP-a utvrđen je u lipidnim splavima i izvan njih u hipokampusu i malom mozgu svih skupina životinja. U lipidnim je splavima hipokampusa uočen veći izražaj APP-a u muških skupina životinja (slika 5.7.4.1).



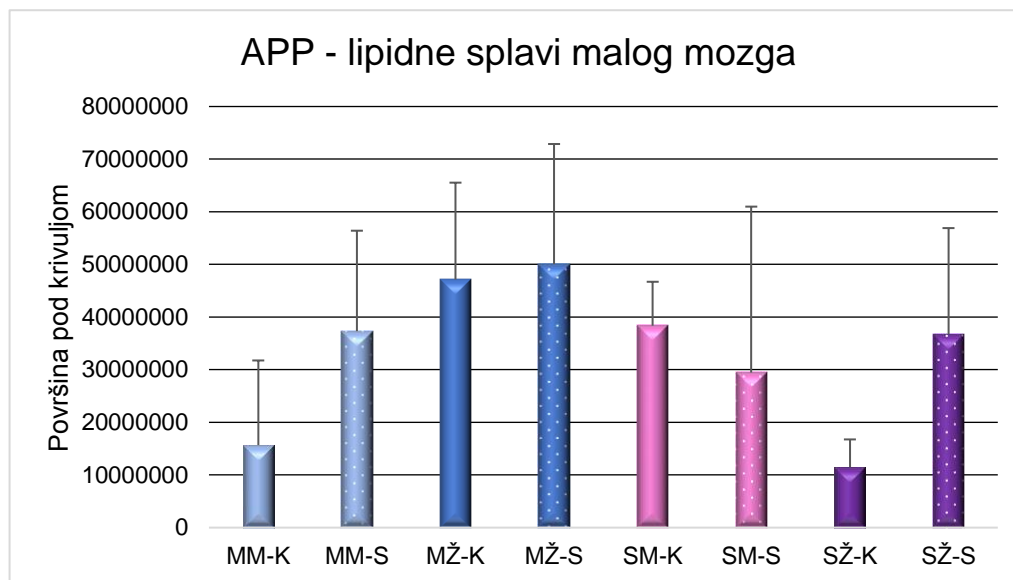
**Slika 5.7.4.1.** Smještaj APP-a u lipidnim splavima hipokampusa svih skupina životinja. Pokus je ponovljen korištenjem dva biološka replikata lipidnih splavi svih skupina životinja. Rezultati su prikazani grafički te reprezentativnom slikom ispod grafičkih prikaza. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu, APP = preteča amiloida.


I u nesplavima hipokampusa izražaj APP-a također je bio viši u muškim skupinama životinja u usporedbi sa ženkama (slika 5.7.4.2). U malom je mozgu uočen izražaj APP-a unutar lipidnih splavi te nesplavi. U lipidnim splavima malog mozga izražaj APP-a bio je najviši u skupini starijih mužjaka (slika 5.7.4.3). U nesplavima malog mozga uočen je snažan izražaj APP-a u svim skupinama osim mladih ženki gdje je izražaj proteina nešto niži (slika 5.7.4.4).



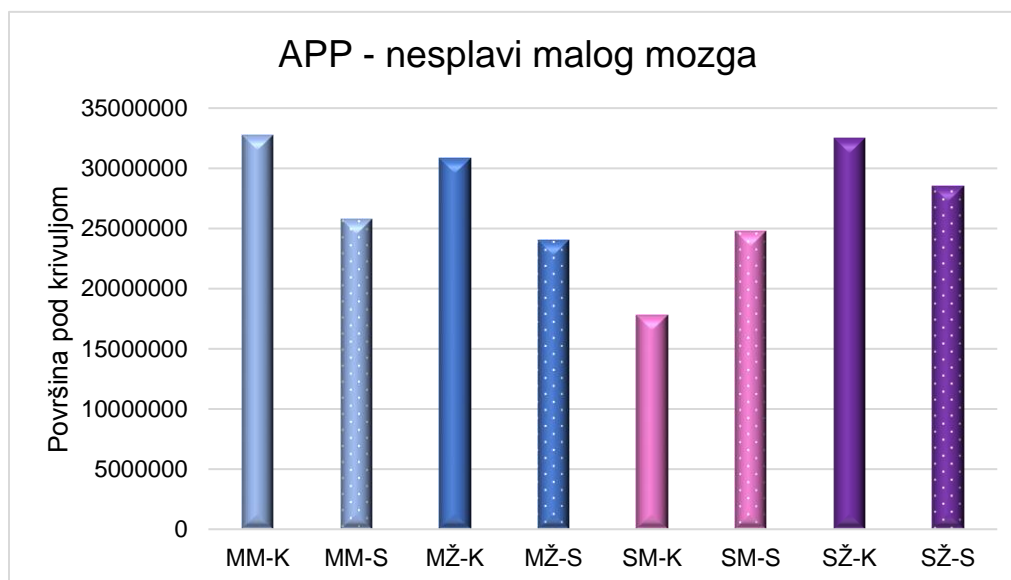
APP

**Slika 5.7.4.2.** Smještaj APP-a u nesplavima hipokampusa svih skupina životinja. Pokus je ponovljen korištenjem dva biološka replikata nesplavi svih skupina životinja. Rezultati su prikazani grafički te reprezentativnom slikom ispod grafičkih prikaza. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu, APP = preteča amiloida



APP 

**Slika 5.7.4.3.** Smještaj APP-a u lipidnim splavima malog mozga svih skupina životinja. Pokus je ponovljen korištenjem dva biološka replikata lipidnih splavi svih skupina životinja. Rezultati su prikazani grafički te reprezentativnom slikom ispod grafičkih prikaza. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu, APP = preteča amiloida.



APP

**Slika 5.7.4.4.** Smještaj APP-a u nesplavima malog mozga svih skupina životinja. Pokus je ponovljen korištenjem dva biološka replikata nesplavi svih skupina životinja. Rezultati su prikazani grafički te reprezentativnom slikom ispod grafičkih prikaza. MM-K = kontrolna skupina mladih mužjaka, MM-S = skupina mladih mužjaka izloženih stresu, MŽ-K = kontrolna skupina mladih ženki, MŽ-S = skupina mladih ženki izloženih stresu, SM-K = kontrolna skupina starijih mužjaka, SM-S = skupina starijih mužjaka izloženih stresu, SŽ-K = kontrolna skupina starijih ženki, SŽ-S = skupina starijih ženki izloženih stresu, APP = preteča amiloida.

Sažeti prikaz smještaja odabranih proteina u lipidnim splavima ili izvan njih određenoga *Western blotting* metodom objedinjen je u tablici 5.7.4.1.

**Tablica 5.7.4.1.** Sažeti prikaz smještaja odabranih proteina unutar ili izvan lipidnih splavi hipokampusa i malog mozga svih skupina životinja. Simbolom X označena je prisutnost proteina u frakcijama uređenog (lipidne splavi) ili neuređenog dijela stanične membrane (nesplavi).

PODRUČJE	HIPOKAMPUS		MALI MOZAK	
	LIPIDNE SPLAVI	NESPLAVI	LIPIDNE SPLAVI	NESPLAVI
IR		X		X
ObR – obje forme		X		X
Np	X	X	X	X
APP	X	X	X	X

Kratice: IR = inzulinski receptor, ObR = leptinski receptor, Np = neuroplastin, APP = preteča amiloida.

## 6. RASPRAVA

U opisanoj je disertaciji istraživana spolno specifični utjecaj kroničnog stresa i starenja na razvoj neurodegeneracije. Moderan način života izložen je izazovima usklađivanja razvoja karijere, brige za obitelj, pravilne prehrane, tjelesne aktivnosti te izvršavanja drugih društvenih obaveza, a karakterizira ga posvemašnji nedostatak vremena i ometanje (osobito radi razvoja mobilne telefonije), što bi mogao biti izvor kroničnog stresa s mogućim posljedicama na ljudsko zdravlje (189). Tijekom kroničnog stresa narušava se tjelesna homeostaza i otpuštaju se glukokortikoidi, mineralokortikoidi te nastaje poremećaj metabolizma glukoze i hormonske ravnoteže (1, 22). Poremećaj metabolizma glukoze i dijabetes već su povezani s AD (125, 127). Stres je također povezan i s neurodegenerativnim bolestima – u ratnih je veterana utvrđena degeneracija nalik onoj u AD (83, 86), no detaljni molekularni mehanizmi kojima se takva degeneracija odvija i dalje su nepoznati.

Problem istraživanja kroničnog stresa leži u brojnim, neusklađenim animalnim modelima kroničnog stresa (190-192). Naš je tim u Laboratoriju za neurobiologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku tijekom 7 godina razvio jedinstveni protokol kroničnog stresa. Razvijeni model koristi fizičke i psihološke stresore. Protokol je potvrđen objavom 4 znanstvena članka (152, 178-180), a ovom je doktorskom disertacijom još jednom ukazano na promjene steroidnih hormona koje odgovaraju stresnom odgovoru.

Ranijim su istraživanjima utvrđene promjene uzrokovane kroničnim stresom u perifernom živčanom sustavu – nadbubrežnoj žlijezdi. Uočen je utjecaj estrogena i testosterona na regulaciju HPA osi u štakorskom modelu menopauze i kroničnog stresa. U istom je istraživanju uočeno i povećanje ObR-a u nadbubrežnoj žlijezdi (178) te je u sljedećem istraživanju na mladim životinjama analizirana promjena ObR-a i IR-a u mozgu štakorskog modela menopauze i kroničnog stresa. Promjene su upućivale na inzulinsku rezistenciju u područjima rane neurodegeneracije te povećani izražaj ObR-a u područjima mozga odgovornima za regulaciju hranjenja (152). Ta su istraživanja upućivala na nastavak studije te proučavanje utjecaja stresa i starenja na neurodegeneraciju putem signalizacije odgovorne za metabolizam stanice – inzulinskim i leptinskim signalnim putovima. S obzirom na jasnu ulogu spolnih hormona u regulaciji stresnog odgovora, studija je provedena na oba spola štakora.



Sprague Dawley štakori izlagani su trima desetodnevnim ciklusima stresa, a kontrolne su skupine izlagane lažnom stresu i uobičajenoj manipulaciji. Na taj su način stresni učinak same okoline i osnovne neštetne radnje nad štakorima bili isti u kontrolnim i istraživanim skupinama, a u istraživanim je skupinama bilježen stresni odgovor iznad praga izazvanog takvim neštetnim radnjama. Kako je cilj studije bio utvrditi samo trajne promjene izazvane kroničnim stresom, sve su životinje eutanazirane dva tjedna nakon završetka zadnjeg ciklusa stresa.

Analizirani su receptori signalnih putova inzulina i leptina kao glavnih predstavnika regulacije staničnog metabolizma. Osim toga, u literaturi je zapažena uloga neuroplastina u kognitivnim procesima te regulaciji HPA osi (161, 193) pa je i taj protein analiziran na isti način kao i ObR te IR kako bi se razjasnila njegova uloga u neurodegeneraciji posredovanoj kroničnim stresom. S obzirom na ulogu u neuroprotekciji, analiziran je i estrogenski receptor (107), a APP je analiziran radi jasne poveznice s AD. Studija je pratila i aktivaciju nizvodnih signalnih putova inzulina i leptina.

Za sve spomenute proteine važan je sastav lipidnih splavi membrane u kojima dolazi do signalne interakcije receptora i liganda. Sastav lipidnog okoliša membranskih proteina povezan je s disfunkcijom signalnih putova (155). ObR i IR se u perifernim tkivima nalaze u lipidnim splavima (164, 166), no njihov je smještaj u staničnoj membrani središnjeg živčanog sustava nepoznat. Np se u mozgu nalazi u lipidnim splavima bogatima GM1 gangliozidom (161). APP je djelomično smješten u lipidnim splavima, a djelomično izvan njih (194, 195). Smatra se da je dio procesiranja APP-a u lipidnim splavima odgovoran za amiloidni put u AD. Za smještaj većine opisanih proteina postoje i oprečni rezultati, vjerojatno radi različitih metoda izolacije lipidnih splavi. Mnoge metode koriste pretjerano agresivan deterdžent Triton-X100 koji umjetno redistribuira proteine lipidnih splavi (167). U opisanoj je studiji korišten znatno blaži deterdžent Brij 020 uz prilagodbu metode.

## 6.1 Steroidni hormoni

Analizom koncentracije kortikosterona uočava se snažna aktivacija HPA osi u mladih mužjaka i starijih ženki. Adolescencija je osjetljivo razdoblje za mužjake, a kompenzacijski mehanizmi iznimno su aktivni u mladim ženki te djelomično mogu objasniti otpornost na

kronični stres. Poznato je da mušjaci lošije podnose stres od ženki, no samo do razdoblja menopauze kada se u ženki javljaju razne posljedice izlaganja stresu (196). Upravo je takav trend uočen analizom kortikosterona svih skupina životinja. U mladih je štakora, adolescentne dobi, u ranijim studijama primijećen produženo otpuštanje kortikosterona iz nadbubrežne žlijezde (197). Porast glukokortikoida u starijih životinja, posebice ženki može se povezati s neurodegenerativnim procesima. U razdoblju rane menopauze remete se neuroprotektivni mehanizmi zbog smanjenja koncentracija spolnih hormona (104), a glukokortikoidi također utječu na povećanje izražaja APP-a (198) što može potaknuti aktivaciju amiloidnog puta i uzrokovati nakupljanje senilnih plakova tijekom početnog djelovanja glukokortikoida u stresnom odgovoru kada su njihove koncentracije visoke.

U mladih životinja izloženih stresu javljaju se snažni mehanizmi neuroprotekcije dok u starijih životinja pod utjecajem stresa takva kompenzacija više nije moguća. U starijih se ženki uočava dramatično povećanje progesterona što bi moglo značiti kako se neuroprotekcija tijekom starenja odvija i putem progesterona. Već je pokazan neuroprotektivni učinak progesterona, no također je uočeno i kako koncentracija progesterona u krvi starenjem opada (199, 200). Testosteron se također povezuje s neuroprotekcijom (201). Ranije je već utvrđeno kako kronični stres smanjuje koncentraciju testosterona te kako takvo smanjenje povećava oksidativni stres u mozgu što može potaknuti neurodegeneraciju (202). U ovoj je studiji smanjenje koncentracije testosterona očekivano nisko u ženki i ne mijenja se pod utjecajem kroničnog stresa. Uočeno je povećanje koncentracije testosterona u mladih mužjaka pod utjecajem kroničnog stresa. Pokazane vrijednosti steroidnih hormona ključne su u potvrdi modela kroničnog stresa, ali ne predstavljaju glavni rezultat disertacije. S obzirom da su rezultati analize dobiveni na serumima prikupljenima prije i nakon izlaganja stresu (tijekom žrtvovanja), bilo bi dobro iste rezultate odrediti i nakon svakog od tri stresna ciklusa. Metoda određivanja koncentracije estrogena spektrometrijom masa nije bila standardizirana za serume štakora pa koncentracije estrogena iz seruma nisu utvrđene, a taj bi podatak mogao nadopuniti informacije o neuroprotekciji pod utjecajem kroničnog stresa.

## 6.2. Kronični stres utječe na blage promjene tjelesne mase

Tjelesne mase životinja opterećenih kroničnim stresom blago su se povećale na kraju studije u svim skupinama, osim u skupini starijih mužjaka koji pokazuju blagi pad tjelesne mase. U usporedbi s kontrolnim skupinama, sve skupine životinja izložene kroničnom stresu na kraju studije imaju manju tjelesnu masu. Blage promjene tjelesne mase usmjeravaju prema zaključku kako u animalnim modelima kronični stres ne utječe dramatično na hranjenje te promjenu mase i kako životinje do rane menopauze i andropauze ne mijenjaju tjelesnu masu u odgovoru na stres. Dosadašnja istraživanja uglavnom govore o velikom gubitku ili povećanju tjelesne mase pod utjecajem kroničnog stresa (203, 204), no u ovoj studiji takav se učinak ne uočava što upućuje na zaključak kako su životinje do srednje dobi iznimno otporne na stres. Neka istraživanja pokazuju da muškarci srednje dobi pod utjecajem kroničnog stresa pokazuju veću anksioznost te smanjuju unos hrane i gube na masi, dok se u žena događa suprotno (205, 206). No, postoje mnogobrojna istraživanja s oprečnim rezultatima pa je teško doći do općeg zaključka o utjecaju kroničnog stresa na tjelesnu masu (207, 208). Moguće je da bi produljenje ciklusa stresa snažnije utjecalo na promjenu tjelesne mase te bi bilo zanimljivo pratiti taj parametar kroz duže vremensko razdoblje. Također, nije isključeno treba li koristiti jači intenzitet stresa kako bi se uočio snažniji učinak na promjenu tjelesne mase.

## 6.3. Promjena metabolizma glukoze nakon izlaganja kroničnom stresu

U mladih je životinja uočena normalna tolerancija na glukozu, no u usporedbi s preostala dva mjerenja, tolerancija se prema kraju studije čak i poboljšala. Krivulja odgovora glukoze također u načelu ukazuje na bolju toleranciju starijih životinja na opterećenje glukozom, ali pokazuje i nepravilan rast tijekom 15. minute mjerenja kada su postignute vrlo visoke koncentracije glukoze. S obzirom da se TTG i TTI smatraju orijentacijskim znacima promjene metabolizma glukoze (181, 182), može se zaključiti kako je u mladih i starijih životinja još uvijek aktivan kompenzacijski mehanizam koji im omogućuje dobru regulaciju opterećenja glukozom te prilagodbu na kronični stres, a još su uvijek aktivni do dobi rane menopauze i andropauze. Nedostatak oba testa je nemogućnost njihova izvođenja u kontrolnim skupinama jer oba testa izazivaju snažan stres. Umjesto izvođenja oba testa

u kontrolnim skupinama, testovi su izvedeni u skupinama izloženima stresu na početku i na kraju u slučaju TTI te na početku, nakon završetka drugog i trećeg ciklusa stresa u slučaju TTG. Dosadašnja istraživanja promjene metabolizma glukoze korištenjem TTG uglavnom su usmjerena na mlade mušjake štakora, a uočene su visoke vrijednosti glukoze tijekom TTG nakon izlaganja stresu (209). U drugoj je studiji pokazano kako kronični stres u odraslih mušjaka štakora poboljšava toleranciju na glukozu nakon izazivanja predijabetičkog stanja hranom bogatom šećerima (210). Za ženke te starije životinje ne postoje istraživanja koja uključuju utjecaj kroničnog stresa na metabolizam glukoze. Za TTI također nisu pronađeni slični podaci. Iz ove je studije indikativno kako stres nije nužno loš za održavanje metaboličke ravnoteže. Također, sam način izvođenja TTI i TTG testa, u kojemu se životinje prije testiranja ostavljaju tijekom noći bez hrane, primjer je intermitentnog gladovanja koje djeluje povoljno na metabolizam glukoze. Kako bi se razdvojili utjecaji ostalih stresora i intermitentnog gladovanja u narednim bi studijama trebalo mjerenja glukoze učiniti neinvazivnim putem, tj. pomoću senzora koji se implantiraju pod kožu.

#### **6.4. Promjena pamćenja u starijih životinja**

Promjena pamćenja testom pasivnog izbjegavanja uočena je samo u starijih životinja. Mlade životinje nisu pokazale promjenu pamćenja, a razlike promjene pamćenja pod utjecajem stresa između mladih i starijih životinja vrlo su očigledne. U starijih se životinja u kontrolnim skupinama pojavljuje poremećaj pamćenja koji se može pripisati normalnom kongitivnom propadanju koje se odvija tijekom starenja, a u skupini koja je bila izložena kroničnom stresu taj je učinak povećan, posebice u starijih ženki. Testom je pokazano da stres, a ne samo starenje potencira kognitivno propadanje na dobno i spolno specifičan način te dovodi stres u poveznicu s neurodegeneracijom. Takav je rezultat očekivan, naime većinu pacijenata s AD čine upravo žene – jedan je od razloga za to i smanjenje neuroprotekcije tijekom menopauze (104), a moguće je kako kronični stres djeluje kao okidač neurodegeneracije. U translacijskim istraživanjima AD uglavnom se koriste životinje muškog spola (211) na kojima je manje uočljiv učinak kroničnog stresa na pamćenje. Test pasivnog izbjegavanja vrlo je učinkovit i često se koristi u istraživanjima

pamćenja na modelima glodavaca te je usvojen kao standardni test (212). Ograničenje testa čini snažna aktivacija amigdale, hipokampusa i entorinalne kore (213) te nemogućnost ponavljanja testa više od jednoga puta tijekom studije pa se radi toga ne može pratiti promjena pamćenja od početka do kraja studije. U dvije je studije na odraslim mužjacima štakora nepoznate dobi uočeno smanjeno pamćenje nakon izlaganja kroničnom stresu (214, 215). U tim je studijama stres izazvan prisilnim plivanjem ili kombinacijom prisilnog plivanja i imobilizacije štakora. U istraživanju na oba spola praćen je prenatalni stres u gravidnih štakorica, a uočeno je kako njihovi potomci postnatalno (u dobi od 4 tjedna) pokazuju poremećaj pamćenja samo u mužjaka (216). Istraživanja pamćenja korištenjem testa pasivnog izbjegavanja na animalnim modelima koji uključuju odrasle ženke ili oba spola odraslih životinja nisu pronađena pretragom dostupne literature.

## **6.5 Imunohistokemijska analiza izražaja odabranih proteina i gangliozida u hipokampusu i malom mozgu**

### **6.5.1. Izražaj inzulinskog i leptinskog receptora u hipokampusu i malom mozgu**

IR je detektiran u CA1 i DG područjima hipokampusa svih skupina životinja neovisno o dobi i izloženosti kroničnom stresu. U starijih je mužjaka uočeno dramatično smanjenje izražaja IR. Takav je obrazac raspodjele IR uočen u čitavom hipokampusu (slika 5.5.1.2 i 5.5.1.3), a moglo bi se protumačiti kako su upravo stariji mužjaci najosjetljiviji na promjenu glukoze u krvi. U granularnom sloju malog mozga, također je uočen najveći izražaj IR u kontrolnoj skupini starijih mužjaka. Zbog nedovoljnog broja bioloških replikata te kvalitete protutijela, dobivene razlike u području malog mozga nisu statistički analizirane.

ObR je detektiran podjednako u sve tri CA regije hipokampusa dok je manji izražaj ObR-a bio uočeno u dentatnom girusu. Dobiveni rezultati pokazuju da neovisno o spolu i dobi niti u jednoj regiji hipokampusa nema značajne promjene izražaja ObR-a kao posljedice kroničnog stresa.

Dobivene je rezultate radi loše kvalitete detekcije signala teško komentirati. U kasnijim su pokusima analize proteina *Western blottingom* korištena kvalitetnija protutijela, čiji su signali bili znatno jasniji i lakši za detekciju i kvantifikaciju.

### **6.5.2. Izražaj Tau proteina, AMPA receptora i neuroplastina u hipokampusu i malom mozgu**

U svim je analiziranim regijama hipokampusa uočen različiti izražaj Tau proteina. U CA1 regiji nisu uočene promjene ovisne o dobi, spolu i utjecaju kroničnog stresa. U CA2 regiji izražaj Tau se povećao u uvjetima kroničnog stresa u skupini mladih mužjaka i ženki. Starije životinje ne pokazuju takve promjene. U CA3 regiji uočene su razlike spolno specifične te je u mužjaka obje dobi uočen povećani izražaj, a u obje dobne skupine ženki stres je uzrokovao smanjenje izražaja Tau proteina. Poveznica AD i Tau vrlo je jasna, no nije potpuno razjašnjeno što čini glavni okidač njegove pretjerane fosforilacije. U jednom je istraživanju pokazano kako glukokortikoidi uzrokuju nakupljanje fibrilarnih snopića putem hormona koji otpušta kortikotropin (CRH). CRH u mozgu djeluje na neurone putem receptora vezanog s G-proteinima. Visoke koncentracije CRH povezuju se s depresijom uzrokovanom stresom (217), ali novije studije također pokazuju i njegov neuroprotektivni učinak (218). U dva transgenična soja mišjeg modela AD uočeno je povećanje nakupljanja fibrilarnih snopića te kognitivno propadanje karakteristično za AD nakon izlaganja stresu, no ti su učinci poništeni terapijom s CRH prije izlaganja stresu (219). Moguće je kako kronični stres aktivira neuroprotekciju ili neurodegeneraciju s obzirom na dob ili spol no takve je učinke potrebno detaljno analizirati.

Analizom AMPA receptora utvrđen je utjecaj kroničnog stresa na njegov izražaj u hipokampusu koji je ovisan o dobi. U mladih ženki i mužjaka nije uočena razlika u izražaju AMPA receptora u hipokampusu, dok se u starijih ženki i mužjaka njegov izražaj smanjuje u CA1, CA2 i DG područjima. AMPA receptori iznimno su važni za procese učenja i pamćenja (218), a u štakorskom modelu AD izazivane primjenom toksičnih  $\beta$ -amiloida pokazano je da stres intenzivira nakupljanje senilnih plakova u mozgu uz smanjenje dugoročne potencijacije koja je povezana s AMPA receptorom (220). I u opisanoj studiji takva je poveznica samo hipotetski razmatrana, a u ovoj disertaciji opisani rezultat, iako

iznimno značajan, ne predstavlja glavni rezultat te je nužno detaljnije razmotriti njegovu ulogu u neurodegeneraciji potaknutoj kroničnim stresom. Također, u literaturi nisu pronađeni podaci o spolno i dobno specifičnom utjecaju kroničnog stresa na promjene AMPA receptora u mozgu.

Kronični stres mijenja izražaj neuroplastina u hipokampusu na dobno i spolno specifičan način. U mladih mužjaka izražaj Np se povećao u CA2, CA3 i DG područjima hipokampusa, dok se u starijih mužjaka izražaj Np smanjio u CA1 i CA2 područjima u uvjetima kroničnog stresa. U ženskih skupina uočeno je smanjenje izražaja Np samo u CA3 regiji hipokampusa nakon izlaganja stresu. Neuroplastin je snažno povezan uz kogniciju i HPA-os (161). *Western blotting* metodom uočen je snažan učinak stresa na izražaj Np u mladim mužjacima no na suprotan način od imunohistokemijskih analiza što bi se moglo objasniti korištenjem cjelokupnog tkiva hipokampusa za analizu *Western blotting* metodom. Također, rezultati dobiveni *Western blotting* metodom u hipokampusu ženki pokazuju obrazac uočen imunohistokemijom u CA2 regiji hipokampusa obje skupine ženki. To bi moglo značiti da glavna učinka neuroplastina u mozgu ženki proizlazi iz njegova djelovanja u CA2 regiji hipokampusa.

U granularnom sloju maloga mozga kronični stres nije utjecao na izražaj Tau i AMPA receptora u obje dobne skupine i oba spola. Najveći izražaj Np u granularnom sloju malog mozga utvrđen je u skupini starijih mužjaka koji nisu bili izloženi kroničnom stresu. Također je uočeno kako kronični stres nije utjecao na izražaj Np u obje dobne skupine i oba spola u malom mozgu.

Analizom rezultata imunohistokemijskih bojanja izvedeni su kratki zaključci:

1. Ukoliko je izražaj IR-a i Ob-R snižen, snižava se i izražaj AMPA receptora i neuroplastina, a to se uglavnom događa u skupini starih mužjaka.
2. Stres pogađa neuroplastičnost snižavanjem AMPA receptora, ali samo u skupini starijih životinja.
3. Mužjaci su skloniji povećanju Tau proteina u uvjetima stresa

4. Samo mlade životinje reagiraju na stres povećanjem izražaja neuroplastina što može činiti zaštitni mehanizam od opadanja izražaja AMPA receptora.

### **6.5.3. Izražaj gangliozida GM1 u hipokampusu i malom mozgu**

U hipokampusu je uočen povećani izražaj GM1 u CA1 regiji mladih ženki i u DG regiji mladih mužjaka pod utjecajem kroničnog stresa. U starijih je ženki kronični stres uzrokovao povećanje izražaja GM1 u DG regiji dok se u ostalim dijelovima hipokampusa izražaj GM1 smanjio. U starijih mužjaka povećanje izražaja GM1 pod utjecajem kroničnog stresa uočeno je u CA1 i CA2 regijama dok se u CA3 i DG regijama izražaj smanjio. S obzirom na poznatu ulogu GM1 u AD (175), smanjenje uočeno u starijih životinja nudi moguću poveznicu između kroničnog stresa tijekom starenja, promjene sastava gangliozida u mozgu i neurodegeneracije.

U malom je mozgu detektiran povećani izražaj GM1 nakon izlaganja stresu u skupini mladih ženki, a u starijih je životinja neovisno o spolu, izražaj GM1 smanjen u uvjetima stresa. Mladi mužjaci ne pokazuju promjene izražaja GM1, s obzirom na izlaganje kroničnom stresu.

### **6.5.4. Kolokalizacija APP/GD1a u hipokampusu**

U istraživanim regijama hipokampusa, APP i gangliozid GD1a pokazuju drukčiji izražaj. U CA1 području hipokampusa, izražaj APP-a se dramatično promijenio pod utjecajem stresa – smanjio se u mladih mužjaka i povećao u starijih ženki (tablica 6.5.4.1). Izražaj APP-a u dentatnom girusu (tablica 6.5.4.1) hipokampusa mladih mužjaka pokazuje suprotan trend od CA1 područja - jedino mlade ženke ne pokazuju promjenu izražaja APP-a. Izražaj gangliozida GD1a također doživljava najveće promjene u mladih mužjaka – snažno je povećan nakon izlaganja stresu. Izražaj gangliozida GD1a u dentatnom girusu povećao se u starijih mužjaka i ženki pod utjecajem stresa dok se u mladih mužjaka smanjio, a u mladih ženki nisu uočene promjene. Kolokalizacija APP-a te GD1a gangliozida u CA1 području hipokampusa uočena je samo u ženskim skupinama životinja, posebice u starijih



ženki izloženih kroničnom stresu, a u dentatnom girusu gotovo isključivo u starijih mužjaka i ženki izloženih stresu.

Do sada se uglavnom gangliozid GM1 povezivao s APP-om i neurodegeneracijom u AD (174, 175). U ovom doktorskom radu uočena je jasna poveznica gangliozida GD1a i APP-a, posebice u ženki u CA1 području hipokampusa te u starijih životinja izloženih stresu u dentatnom girusu. Takav je nalaz moguće objasniti spolno i dobno specifičnim promjenama sastava lipidnih splavi u kojima je APP djelomično smješten. Gangliozid GD1a do sada se nije dovodio u vezu s APP-om no moguće je kako njegov povećan izražaj prati povećanje APP-a te pokreće amiloidni put u hipokampusu pod utjecajem kroničnog stresa. U studiji provedenoj na *Tg* miševima koji izražavaju ljudski APP sa *Swedish* i *London* mutacijama križani su s miševima kojima nedostaje GM2-sintaza. Takvi miševi izražavaju gangliozide GM3, GD3, ali ne i GM1, GD1a te GD1b i GT1b. Rezultati detaljnih analiza su pokazali povećanje nakupljanja senilnih plakova u mozgu (221). To istraživanje, osim GM1, uključuje i moguću ulogu GD1a gangliozida u amiloidnom putu. Omjer gangliozida u mozgu mijenja se tijekom starenja. Tijekom fetalnog razdoblja najzastupljeniji su jednostavni gangliozidi – GM3 i GD3 koji se nakon rođenja smanjuju, a povećava se koncentracije GD1a i GT1b. U razdoblju adolescencije najviše je GM1 i GD1b gangliozida. Starenjem se u prednjoj kori mozga posebno smanjuju GD1a i GM1 za razliku od GT1b i GD1b čije je smanjenje puno blaže. GD1a umjereno se smanjuje u hipokampusu dok je u ostalim područjima razmjerno stabilan i tijekom starenja. U AD se smanjuju GM1, GD1a, GD1b i GT1b u prednjoj i sljepoočnoj kori te općenito dolazi do povećanja jednostavnih gangliozida (kao što su GM2 i GM3) u prednjoj i parijetalnoj kori (173, 222). Spolne razlike u izražaju pojedinih gangliozida nisu dobro istražene, a svakako bi bilo zanimljivo u budućim istraživanjima detaljnije analizirati utjecaj kroničnog stresa na gangliozide koji se povezuju s AD te njihovu kolokalizaciju s APP-om i drugim proteinima uključenim u poznati mehanizam bolesti.

## **6.6. Analiza izražaja odabranih proteina u hipokampusu i malom mozgu *Western blottingom***

### **6.6.1. Glukokortikoidni receptor**

Izražaj GR se povećao u hipokampusu pod utjecajem kroničnog stresa samo u skupinama mužjaka i to vrlo blago, dok se u ženki smanjio. U malom mozgu vidljivo je smanjenje GR u svim skupinama opterećenima kroničnim stresom. Ukoliko je izražaj receptora nizak, smatra se kako su koncentracije hormona u krvotoku visoke te su receptori zauzeti vezanim glukokortikoidima, a to je uočeno u mladih mužjaka i starijih ženki. Glukokortikoidi su osnovni pokretači aktivnosti HPA osi (1). U dobivenim je rezultatima studije uočena aktivacija stresnog odgovora, posebice u skupina ženki u hipokampusu, te u svim skupinama životinja u malom mozgu. Analiza je rađena *Western blotting* metodom, a u budućim bi istraživanjima bilo zanimljivo uočiti specifične promjene GR pod utjecajem stresa u specifičnim područjima mozga, posebice prednjoj kori mozga, hipokampusu i malom mozgu. Postoje oprečna istraživanja o utjecaju glukokortikoida i njihovih receptora na učenje i pamćenje te preživljenje neurona. Ranijim je istraživanjima utvrđeno kako stres potiče nastanak dugotrajnog pamćenja aktivacijom GR u hipokampusu koje je povezano s aktivacijom BDNF/cAMP (CREB) signalnog puta važnog za dugotrajno pamćenje (223, 224). No, takva su istraživanja rađena isključivo na mladim mužjacima štakora pa se rezultat ne može povezati s ovom disertacijom. U još jednoj studiji uočen je negativan učinak glukokortikoida na neurogenezu inhibicijom stanične proliferacije i preživljanja (225, 226). U budućim bi istraživanjima svakako bilo potrebno analizirati GR imunohistokemijski u područjima od interesa za AD kako bi se analizirala detaljna raspodjela aktivacije GR nakon kroničnog stresa u obje dobne i spolne skupine.

### **6.6.2. Estrogenski receptor**

Najdramatičnije povećanje izražaja ER- $\alpha$  uočeno je u hipokampusu mladih skupina životinja izloženih stresu. S obzirom da se izražaj receptora povećao može se pretpostaviti kako su koncentracije hormona u krvotoku niske te receptori nisu zauzeti vezanim estrogenom. U malom je mozgu uočeno blago povećanje ER- $\alpha$  u svim skupinama

životinja. Smanjene koncentracije estrogena smanjuju i neuroprotekciju, posebice u hipokampusu (104). Neuroprotekcija estrogenom do sada je jasno utvrđena, a smatra se da je spolno specifična i u žena je aktivna do menopauze kada koncentracija estrogena opada. Estrogenska zaštita od neurodegeneracije izazvane stresnim odgovorom u mozgu do sada nije proučena, no estrogen i ER povezani su sa zaštitom od depresije nakon izlaganja stresu u mišjem modelu kroničnog stresa i depresije. RNA sekvenciranjem utvrđen je povećani izražaj ER- $\alpha$  u području *nucleus acumbens*, ali samo u mužjaka, dok u ženki nije primjećen isti obrazac promjena (dob životinja spomenutog istraživanja nije poznata) (227). U opisanoj je disertaciji analiziran izražaj cjelokupnih tkiva hipokampusa i malog mozga, no bilo bi zanimljivo imunohistokemijski analizirati svako područje detaljnije, odnosno odrediti kvalitativne promjene ER uzrokovane kroničnim stresom. Također je analiziran panel steroidnih hormona, no metodom spektrometrije masa standardiziranom za koncentracije hormona u ljudskim serumima, nije se mogla utvrditi koncentracija estrogena u štakorskim serumima. Stoga je teško zaključiti o neuroprotekciji pod utjecajem stresa bez korištenja dodatnih metoda.

### 6.6.3 $\beta$ -podjedinica inzulinskog receptora

Uzorak promjene pamćenja dobiven testom pasivnog izbjegavanja pratile su i promjene izražaja IR- $\beta$  u uzorcima ukupne stanične membrane hipokampusa svih skupina životinja. Upravo je u skupinama smanjenog izražaja IR- $\beta$  u hipokampusu – starijim mužjacima i ženkama uočen i poremećaj pamćenja. Inzulin i inzulinski signalni put važni su u procesima pamćenja. Ukoliko je signalizacija inzulinom poremećena ili se javlja receptorska rezistencija, tada se očekuje i kognitivno propadanje, odnosno poremećaj pamćenja (228, 229). Mali mozak drukčije je opterećen promjenama IR- $\beta$  – povećanje je uočeno u mladim mužjaka i starijih ženki, dok se u starijih mužjaka i mladim ženki izražaj IR- $\beta$  smanjio. Poznato je da degenerativne promjene malog mozga nastaju tek u kasnijim stadijima neurodegeneracije (230) pa se može zaključiti kako kronični stres ubrzava degeneraciju malog mozga u starijih mužjaka. U miševa s isključenim genom za inzulinski receptor u određenim područjima mozga, pojavljuje se snažna aktivacija HPA-osi (231). Nakon izazivanja kroničnog stresa u starijim je miševima (24 mjeseca, nepoznatog spola)

uočeno kognitivno propadanje povezano sa smanjenjem koncentracija fosforiliranog IR, fosforiliranog Akt, fosforilirane GSK i fosforiliranih izvanstaničnih kinaza reguliranih signalizacijom (engl. *extracellular signal-regulated kinases* – ERK). Također je uočeno povećanje koncentracije BACE1 u miševa koji su bili izloženi stresu, a povećan je i fosforilirani Tau (232). Iako je u posljednjih 20-ak godina povećan broj istraživanja koja povezuju inzulinsku signalizaciju s neurodegeneracijom pa čak i u manjoj mjeri s kroničnim stresom, uglavnom nisu prijavljeni dobno ili spolno specifični mehanizmi kojima se taj učinak može objasniti. Osim toga, velik je broj istraživanja koja ne navode spol na kojima je istraživanje provedeno. S obzirom na spolnu specifičnost u AD, iznimno je važno obuhvatiti oba spola u istraživanjima što se može istaknuti kao vrijednost ove studije gdje je utvrđen učinak stresa na neurodegeneraciju u starijih ženki.

#### **6.6.4. Leptinski receptor u staničnoj membrani**

Iz ukupnih membranskih proteina hipokampusa i malog mozga analizirane su dvije forme ObR-a – duga i kratka forma. U mladoj skupini mužjaka uočena je snažna aktivacija leptinske signalizacije pod utjecajem kroničnog stresa – izražaj duge forme ObR-a se smanjio. U malom je mozgu pod utjecajem stresa promjena izražaja duge forme ObR-a dramatična – posebice u skupinama mužjaka opterećenih kroničnim stresom gdje je uočeno veliko povećanje izražaja receptora. U ženki su bazalne vrijednosti ObR-a bile niske, no također je uočeno povećanje pod utjecajem stresa pa se može zaključiti kako stres i u ženki povećava osjetljivost na leptin no manje dramatično nego u mužjaka. Koncentracije leptina u krvi te osjetljivost na leptin opadaju starenjem (233), a u ovom je istraživanju uočeno blago povećanje izražaja ObR-a u skupini starijih mužjaka pod utjecajem kroničnog stresa. Leptin pozitivno utječe na neurogenezu i stabilnost sinapsi. U mladih životinja nije uočeno kognitivno propadanje, a moguće je da je jedan od kompenzacijskih mehanizama upravo i signalizacija leptinom. Duga forma pokreće signalizaciju JAK2 te STAT3 signalnim putovima. Smatra se da kratke izoforme ObR-a dostavljaju leptin preko krvno-moždane barijere u mozak te sudjeluju u njegovoj internalizaciji (140). Kronični stres pogoršava toleranciju na glukozu u mladih mužjaka štakora s isključenim genom za leptin i vodi prema dijabetesu pa se inzulinska i leptinska

signalizacija dijelom i preklapaju. U istom je istraživanju primijećeno da stres ne utječe na promjenu tjelesne mase unatoč izazivanju netolerancije na glukozu (234). Isto kao i u slučaju inzulina i u leptinskoj signalizaciji može nastati receptorska rezistencija i nefunkcionalnost leptinskog signalnog puta koji je usko povezan s mehanizmima neurodegeneracije. Ključni sudionici nizvodnih signalnih puteva leptina su AMPK, PPAR te BACE1, a jedan je od ciljeva leptinske signalizacije i kinaza koja fosforilira Tau protein – mTOR. U dosadašnjim se istraživanjima utvrdilo kako leptin povećava izražaj ApoE koji regulira metabolizam, agregaciju i taloženje  $\beta$ -amiloida te smanjuje aktivnost BACE1 (146, 235). Kao i u većini istraživanja na animalnim modelima, niti istraživanja leptina i njegova signalnog puta ne obuhvaćaju oba spola i različite dobne skupine, a malobrojna su istraživanja koja dovode u svezu kronični stres i leptinsku signalizaciju. Osim *Western blotting* analize i imunohistokemijske analize ObR-a, opisane u disertaciji također bi bilo važno utvrditi koncentracije leptina u serumu jer bi se na taj način nadopunili podaci do sada izvedenih analiza.

### 6.6.5. Neuroplastin u staničnoj membrani

Bazalne vrijednosti izražaja Np iz ukupnih membranskih proteina hipokampusa bile su najviše u kontrolnoj skupini mladih mužjaka, dok u životinja izloženih stresu izražaj Np-a opada. U starijih se mužjaka također uočava pad izražaja Np no taj je pad znatno blaži od onoga u mladih mužjaka nakon izlaganja stresu. U mladih i starijih skupina ženki izloženih stresu izražaj Np se povećao u hipokampusu u odnosu na njihove odgovarajuće kontrolne skupine. Može se reći da bi Np u ženki do rane menopauze mogao biti uključen u kompenzacijske mehanizme očuvanja stabilnosti sinapsi odnosno učenja i pamćenja. Np je iznimno važan za održanje omjera ekscitacijskih i inhibicijskih sinapsi, a također je povezan i s HPA osi – *Np*<sup>-/-</sup> miševi pokazuju visoke bazalne vrijednosti kortikosterona, posebice u mužjaka (236). Poznato je da je izražaj Np u mozgu veći u mlađih mužjaka kao i da su bazalne vrijednosti glukokortikoida u *Np*<sup>-/-</sup> mužjaka miševa velike (236, 237) pa je moguće da kortikosteron utječe na izražaj Np u mužjaka. Nekolicina istraživanja utvrdila je postojanje kraće forme Np (55 kDa) u malom mozgu (193), no u opisanoj je studiji uočen jasan izražaj Np duže forme (65 kDa) u malom mozgu svih skupina životinja.

Promjena pod utjecajem stresa uočena je u malom mozgu u obliku sniženog izražaja Np u skupini mladih mužjaka. U ostalim skupinama životinja nisu uočene dramatične promjene izražaja Np u malom mozgu pod utjecajem stresa. Takav bi nalaz mogao upućivati na to da Np u mužjaka sudjeluje u stresnom odgovoru i utječe na moždana tkiva rane (hipokampus) i kasne (mali mozak) neurodegeneracije. Izražaj i distribucija neuroplastina u mozgu nakon izlaganja kroničnom stresu do sada nisu utvrđeni, iako je utvrđena poveznica s HPA-osi no samo u bazalnim uvjetima, stoga je opisani nalaz iznimno vrijedan jer se radi o složenoj studiji koja obuhvaća oba spola te dvije dobne skupine.

#### **6.6.6. Preteča amiloida u staničnoj membrani**

Izražaj APP-a se dramatično snizio u hipokampusu mladih mužjaka izloženih kroničnom stresu, nešto blaže sniženje uočeno je u starijih mužjaka, a povećanje je primijećeno u starijih ženki. Povećanje APP-a može pokrenuti amiloidni put, a opisani se trend promjena može povezati s utjecajem glukokortikoida. Poznato je kako *APP* gen u svom slijedu sadrži DNA element odgovora za glukokortikoide (85) pa je lako povezati aktivaciju HPA osi s promjenama izražaja APP-a. No, čini se kako je ta promjena pod utjecajem stresa spolno i dobno specifična, a sama dob nije dovoljan okidač promjene. U malom je mozgu izražaj APP-a bio blago snižen samo u mladim ženki i povećan u mladim mužjaka pod utjecajem kroničnog stresa dok se u svih ostalih skupina nije dramatično mijenjao. Do sada se istraživanjima uglavnom pokazao slab utjecaj APP-a na nakupljanje senilnih plakova u malom mozgu (238), a u opisanoj je studiji uočen samo blagi pad izražaja u mladim ženki nakon izlaganja stresu. Prethodnim je istraživanjima na odraslim mužjacima štakora (nepoznate dobi) uočeno povećanje APP-a u hipokampusu što je suprotan nalaz od onoga opisanog u disertaciji (239). Takvo nesuglasje dobivenih rezultata može ovisiti o korištenom modelu kroničnog stresa, njegovoj duljini, te činjenici da je u znanstvenim člancima često nedovoljno opisana točna dob i spol životinja.

### **6.6.7. Nizvodni signalni putovi inzulina i leptina**

Izražaj SOCS3 u hipokampusu pokazuje spolnu razdiobu – povećanje u mušjaka koje je iznimno visoko u starijih mušjaka te smanjenje u ženki. U malom je mozgu uočeno povećanje u mladim životinja i smanjenje u starijih životinja izloženih stresu. SOCS3 sudjeluje u inzulinskom signalnom putu i njegovo se povećanje često povezuje s inzulinskom rezistencijom i dijabetesom. Smatra se kako povećani izražaj SOCS3 utječe na smanjenu regeneraciju neurona nakon ozlijede (240), a u hipokampusu pacijenata s AD također je primijećen povećan izražaj SOCS3 (241). Moguće je kako blokiranje SOCS3 signalizacije pod utjecajem kroničnog stresa djeluje kao zaštitni mehanizam malog mozga od degeneracije.

U ovoj je studiji fosforilirani STAT3 epitop u hipokampusu povećan u mušjaka, a snižen je u ženki pod utjecajem kroničnog stresa. To govori o aktivaciji kompenzacijskih, zaštitnih mehanizama u hipokampusu mušjaka, dok se u ženki kompenzacija nakon izlaganja stresu ne može provesti istim putem. U AD dolazi do smanjene signalizacije STAT3, a u staničnim kulturama primarnih neurona pokazano je kako se to odvija putem izravnog utjecaja toksičnih  $\beta$ -amiloida – ukoliko se u staničnu kulturu dodaju  $\beta$ -amiloidi jasno se uočava smanjenje izražaja STAT3 (242). ObR pokreće signalizaciju STAT3 koja u hipokampusu ima zaštitnu ulogu te utječe na preživljenje neurona (243). U disertaciji je pokazan trend izražaja oba signalna puta – SOCS3 i STAT3 no buduća bi istraživanja svakako trebala biti usmjerena na detaljnije analize njihove aktivacije ili inhibicije pod utjecajem kroničnog stresa.

## **6.7. Promjena membranskog smještaja odabranih proteina**

### **6.7.1. Inzulinski receptor u lipidnim nesplavima hipokampusa i malog mozga**

IR je do sada uglavnom analiziran na perifernim tkivima kao što su mišići i masno tkivo i u tim je tkivima utvrđen njegov smještaj unutar lipidnih splavi (164, 244). Do sada nije utvrđen smještaj IR u lipidnim splavima ili nesplavima hipokampusa i malog mozga. U opisanoj je studiji utvrđen izražaj IR samo u nesplavima hipokampusa i malog mozga. U

nesplavima hipokampusa svih skupina životinja ponavlja se obrazac promjene izražaja IR nakon izlaganja stresu kao u ukupnim membranskim proteinima (smanjenje u starijih životinja) što je dodatna potvrda preciznog određivanja smještaja IR izvan lipidnih splavi. U malom mozgu obrazac promjene izražaja IR nakon izlaganja stresu nije toliko sličan kao u slučaju usporedbe za hipokampus. Taj je pokus izveden jednom te bi ga trebalo ponoviti i utvrditi smještaj IR sa sigurnošću. Slična istraživanja smještaja IR nisu zabilježena u literaturi.

### **6.7.2. Leptinski receptor u lipidnim nesplavima hipokampusa i malog mozga**

Kao i IR, i ObR je do sada povezan s lipidnim splavima u perifernim tkivima – slezeni (166). Ne postoje istraživanja o smještaju ObR-a u drugim tkivima i organima. U svim su skupinama životinja u hipokampusu i malom mozgu kratka i duga forma ObR-a utvrđene samo u nesplavima. Pokusi su ponovljeni jednom te je nužno dodatno utvrđivanje smještaja ObR-a s obzirom na lipidne splavi.

### **6.7.3. Neuroplastin u lipidnim splavima i izvan njih u hipokampusu i malom mozgu**

Do sada se smatralo kako je Np smješten u lipidnim splavima (161). U istraživanju je Np detektiran unutar i izvan lipidnih splavi u hipokampusu i malom mozgu svih skupina životinja. U lipidnim splavima hipokampusa uočen je slabiji izražaj Np u mladih mužjaka te jači izražaj u ostalih skupina životinja. U nesplavima hipokampusa, izražaj Np veći je u mladih mužjaka, a niži u ostalih skupina životinja. U nesplavima malog mozga uočen je snažan izražaj Np u svih skupina životinja osim starijih ženki, a u mladih se ženki izražaj smanjuje izlaganjem stresu. Dobiveni rezultat Np u lipidnim splavima malog mozga nije bio dovoljne kvalitete za kvantitativnu analizu. Np se do sada povezivao s lipidnim splavima i specifičnim lipidnim okolišem bogatim GM1 gangliozidom (245). U nastavku istraživanja planirano je detaljnije istražiti smještaj Np u staničnoj membrani neurona te utvrditi promjenu kolokalizacije Np/APP nakon izlaganja životinja stresu te odrediti postoji li uloga ostalih gangliozida u smještaju Np unutar ili izvan lipidnih splavi.



#### **6.7.4. Preteča amiloida u lipidnim splavima i izvan njih u hipokampusu i malom mozgu**

Smještaj APP-a utvrđen je u lipidnim splavima i nesplavima hipokampusa i malog mozga svih skupina životinja. U lipidnim splavima i nesplavima hipokampusa izražaj APP-a veći je u muških skupina životinja. U lipidnim splavima malog mozga najveći je izražaj APP-a u mladih i starijih mužjaka nakon izlaganja stresu, sličan je obrazac uočeni u mladih ženki, dok se u starijih ženki uočava suprotan učinak. U nesplavima malog mozga obrazac promjena je potpuno suprotan onome uočenom u lipidnim splavima malog mozga. Kao što je već spomenuto, APP je usko povezan s glukokortikoidima pa je moguće kako kronični stres mijenja sastav lipidnih splavi u kojima je APP djelomično smješten. Imunohistokemijom je pokazano kako upravo GD1a gangliozid pokazuje snažnu kolokalizaciju s APP-om u starijih životinja – posebice ženki nakon izlaganja stresu. Amiloidni dio procesiranja APP-a odvija se unutar lipidnih splavi aktivnošću BACE1 za kojeg se smatra da je smješten gotovo isključivo unutar lipidnih splavi (194). Neamiloidni put odvija se izvan lipidnih splavi jer je  $\alpha$ -sekretaza smještena u nesplavima (195, 246). U istraživanjima smještaja APP-a postoje oprečna istraživanja, vjerojatno jer sam koncept pokusa utječe na aktivaciju amiloidnog odnosno neamiloidnog puta te tako i premještanja glavne APP-a unutar odnosno izvan lipidnih splavi. Osim toga, na takve rezultate sigurno utječu i mnogobrojne metode izolacije lipidnih splavi koje koriste razne deterdžente koji bi mogli uzrokovati umjetnu redistribuciju istraživanih proteina.

## 7. ZAKLJUČCI

- 1) Animalni modeli pokazuju veliku otpornost na stres, posebice u mladim životinja. Oba su spola zaštićena od nepovoljnog utjecaja kroničnog stresa sve do razdoblja menopauze odnosno andropauze, a utvrđen je snažniji učinak kroničnog stresa na starije ženke. U ovoj je studiji primijenjeni model kroničnog stresa na mladim i starijim mužjacima i ženkama također pokazao isti fenomen – otpornost na stres u mladim, a u nekim parametrima, čak i u starijih životinja. Metabolizam glukoze pokazuje poboljšanje nakon izlaganja kroničnom stresu u svih skupina životinja. Najuočljivije su promjene pamćenja koje najviše ovise o dobi i spolu.
- 2) Izražaj AMPA receptora smanjen je u starijih ženki i mužjaka u većini područja hipokampusa. AMPA receptori iznimno su važni za procese učenja i pamćenja, a njihov smanjeni izražaj u hipokampusu u uvjetima stresa povezuje kronični stres s kognitivnim propadanjem.
- 3) Utvrđen je smještaj inzulinskog receptora u hipokampusu i malom mozgu izvan lipidnih splavi što je suprotno dosadašnjoj literaturi s obzirom da se inzulinski receptor perifernih organa nalazi upravo unutar lipidnih splavi.
- 4) Leptinska je signalizacija smanjena u mladim životinja u hipokampusu, a u malom je mozgu povišena u svih skupina životinja no više u mužjaka nego u ženki. Kao i u slučaju inzulinskog receptora, leptinski je receptor detektiran gotovo isključivo izvan lipidnih splavi.
- 5) Stres u skupini mladih mužjaka izaziva sniženje izražaja neuroplastina i preteče amiloida na razini cjelokupnog hipokampusa. Povećanje preteče amiloida uočeno je u starijim ženkama izloženima stresu, ali ne i u mužjaka dok je povećanje Tau proteina u uvjetima stresa uočeno samo u mužjaka.
- 6) Lipidna komponenta splavi, gangliozid GD1a povećava se u hipokampusu nakon izlaganja stresu, te dolazi do kolokalizacije s pretečom amiloida u starijih životinja. Preteča amiloida tada dolazi u okruženje s puno GD1a što nije njegovo prirodno okruženje i vjerojatno ima implikacije na mehanizme njegove degradacije.
- 7) Kao i većina velikih studija i ova ima nekoliko ograničenja. Neki dobiveni rezultati pokazuju velika interindividualna odstupanja. To je moguće objasniti postojanjem hijerarhije u štakora koja određuje alfa dominantnu jedinku u svakom kavezu. Takve su jedinke vrlo otporne na stres za razliku od onih podređenih, a tijekom

studije nisu razdvojene te analizirane posebno. Osim toga, u studiji nisu izmjerene bazalne vrijednosti inzulina i leptina u serumu na kraju studije što bi značajno doprinijelo razumijevanju uloge signalnih putova inzulina i leptina u neurodegeneraciji pokrenutoj kroničnim stresom.

- 8) Stres utječe na mozak na spolno i dobno specifičan način te zasigurno nije pokretač neurodegeneracije u mladih životinja. U starijih životinja uočene su promjene rane neurodegeneracije – promjena pamćenja te signalizacije inzulinom dok leptin čak pokazuje zaštitu od neurodegeneracije tijekom kroničnoga stresa. Najosjetljivija skupina u kojoj se stres može povezati s ranom neurodegeneracijom čine starije ženke, a slučajnim je nalazom ukazano i na važnu ulogu AMPA-receptora i neuroplastina u odgovoru na kronični stres. U slučaju snižavanja izražaja inzulinskog i leptinskog receptora, snižava se i izražaj neuroplastina te AMPA receptora, a to je uglavnom uočeno u starijih mužjaka. Moguća je međusobna interakcija inzulinskog i leptinskog signalnog puta s putevima koji određuju izlazak AMPA receptora i neuroplastina na staničnu membranu te krajni ishod neuroplastičnosti.

## 8. SAŽETAK

Naslov: " Utjecaj kroničnoga stresa i starenja na lipidne splavi moždanih stanica u štakora"

Student: Marta Balog, mag. biol.

Godina: 2019.

Glavna je hipoteza ove disertacije prepostavila kako starenje i stress dovode do promjena sastava lipidnih splavi stanica mozga te okidaju neurodegenerativne promjene posredovane promjenom smještaja i izražaja proteina u hipokampusu i malom mozgu koji se nalaze unutar lipidnih splavi – inzulinskog i leptinskog receptora. Pri izradi disertacije uočen je utjecaj stresa na smanjeno pamćenje u slučaju starijih ženki koje također prati i smanjeni izražaj inzulinskog i AMPA receptora u hipokampusu starijih životinja. Leptinski receptor pokazuje snažnu aktivaciju u starijih životinja u uvjetima stresa i može se smatrati zaštitnim mehanizmom od neurodegeneracije tijekom izloženosti kroničnom stresu. Osim toga, zanimljiv je nalaz kako se inzulinski i leptinski receptori ne nalaze unutar lipidnih splavi hipokampusa i malog mozga kako je do sada smatrano analizom perifernih tkiva.

Promjene lipidnog sastava lipidnih splavi u uvjetima stresa uočene su u obliku povećanja GM1 gangliozida u CA1 i dentatnom girusu hipokampusa u mladim životinjama, te povećanju GD1a gangliozida u CA1 području svih skupina životinja u uvjetima stresa. Također je uočena snažna kolokalizacija preteče amiloida i GD1a u hipokampusu starijih ženki kao posljedica kroničnog stresa.

U slučaju sniženog izražaja inzulinskog i leptinskog receptora, snižavaju se i izražaji neuroplastina i AMPA receptora u starijih mužjaka što povezuje signalne puteve inzulina i leptina s putevima važnim za krajni ishod neuroplastičnosti.

Tijekom izrade ove disertacije razvijen je jedinstveni spolno i dobno specifičan animalni model kroničnog stresa koji upućuje na snažnu otpornost mladih životinja na kronični stres, a najviše su na stres osjetljive starije ženke. Također je uočena spolno i dobno specifična regulacija stresa u mozgu.

## 9. SUMMARY

Title: " Influence of chronic stress and aging on lipid rafts in rat brain cells"

PhD Student: Marta Balog, MSc in Biology

Year: 2019.

The main hypothesis of this thesis proposed that aging and stress combined lead towards changes in lipid rafts composition of brain and trigger neurodegeneration mediated by location shift of lipid raft proteins in hippocampus – insulin and leptin receptor.

In experiments performed in this thesis diminished memory in older females was observed and was followed by reduced expression of insulin and AMPA receptors in hippocampus of older animals. Leptin receptor was activated upon stress in older animals and could be a potential neuroprotection activator. Also, it was determined that both – insulin and leptin receptors are not located inside lipid rafts of hippocampus and cerebellum as considered up to now by peripheral tissue analysis.

Lipid content changes of lipid rafts upon stress were noticed as GM1 ganglioside expression increase in CA1 and dentate gyrus of hippocampus of young animals and increase of GD1a expression in CA1 region of hippocampus in all chronically stressed animal groups. Also, colocalization of amyloid precursor protein and GD1a was observed in hippocampus of older females as a result of chronic stress response.

If insulin and leptin receptors expression is decreased, AMPA receptor and neuroplastin follow this trend. It implies a connection of leptin and insulin signalling pathways with pathways involved with neuroplasticity.

During experimental part of this thesis, a unique animal model of sex and age specific chronic stress was developed that implies strong chronic stress resistance of young animals. It was observed that chronic stress had the strongest impact in older females and that stress regulation in the brain is sex and age specific.



## 10. LITERATURA

1. Chrousos GP, Gold PW. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA*. 1992;26:1244-52.
2. Harvey S, Phillips JG, Rees A, Hall TR. Stress and adrenal function. *J Exp Zool*. 1984;232:633-45.
3. Tan SY, Yip A. Hans Selye (1907-1982): Founder of the stress theory. *Singapore Med J*. 2018;59:170-1.
4. Selye H. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *J Clin Endocrinol Metab*. 1946;6:117-230.
5. Selye H. A Syndrome produced by Diverse Noxious Agents. *Nature*. 1936;138:32.
6. Vanitallie TB. Stress: A risk factor for serious illness. *Metabolism*. 2002; 40-5.
7. Wittstein IS, Thiemann DR, Lima JAC i sur. Neurohumoral Features of Myocardial Stunning Due to Sudden Emotional Stress. *New Engl J Med*. 2005;352:539-48.
8. Tamashiro KL, Sakai RR, Shively CA, Karatsoreos IN, Reagan LP. Chronic stress, metabolism, and metabolic syndrome. *Stress*. 2011;14:468-74.
9. Liu J, Mori A. Stress, Aging, and Brain Oxidative Damage. *Neurochem Res*. 1999;24:1479-97.
10. Whirledge S, Cidlowski JA. Glucocorticoids, stress, and fertility. *Minerva endocrinolog*. 2010;35:109-25.
11. DeMorrow S. Role of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Health and Disease. *Int J Mol Sci*. 2018;19:986.
12. Dallman MF, Strack AM, Akana SF i sur. Feast and Famine: Critical Role of Glucocorticoids with Insulin in Daily Energy Flow. *Front Neuroendocrinol*. 1993;14:303-47.
13. Dubuc PU. Interactions between insulin and glucocorticoids in the maintenance of genetic obesity. *Am J Physiol*. 1992;263:E550-E5.
14. Goldstein RE, Cherrington AD, Reed GW, Lacy DB, Wasserman DH, Abumrad NN. Effects of chronic hypercortisolemia on carbohydrate metabolism during insulin deficiency. *Am J Physiol*. 1994;266:E618-E27.
15. Smith OLK, Wong CY, Gelfand RA. Influence of glucocorticoids on skeletal muscle proteolysis in normal and diabetic-adrenalectomized eviscerated rats. *Metabolism*. 1990;39:641-6.
16. Funder J. Mineralocorticoids and cardiac fibrosis: the decade in review. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2001;28:1002-6.
17. Rashid S, Lewis GF. The mechanisms of differential glucocorticoid and mineralocorticoid action in the brain and peripheral tissues. *Clin Biochem*. 2005;38:401-9.
18. Castoria G, Auricchio F, ur. *Steroid Receptors: Methods and Protocols: Springer Science and Business Media, New York; 2014. str. 205-19.*
19. Reul JM, de Kloet ER. Two Receptor Systems for Corticosterone in Rat Brain: Microdistribution and Differential Occupation. *Endocrinology*. 1985;117:2505-11.
20. de Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joëls M. Brain Corticosteroid Receptor Balance in Health and Disease. *Endocr Rev*. 1998;19:269-301.
21. Reddy TE, Pauli F, Sprouse RO i sur. Genomic determination of the glucocorticoid response reveals unexpected mechanisms of gene regulation. *Genome Res*. 2009;19:2163-71.
22. Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res*. 2002;53:865-71.
23. Ortsäter H, Sjöholm A, Rafacho A. Regulation of Glucocorticoid Receptor Signaling and the Diabetogenic Effects of Glucocorticoid Excess. U: Magdeldin S, ur. *State of the Art of Therapeutic Endocrinology; 2012, str. 1-28.*
24. Newton R, Holden NS. Separating Transrepression and Transactivation: A Distressing Divorce for the Glucocorticoid Receptor? *Mol Pharmacol*. 2007;72:799-809.

25. Adcock IM, Nasuhara Y, Stevens DA, Barnes PJ. Ligand-induced differentiation of glucocorticoid receptor (GR) trans-repression and transactivation: preferential targetting of NF-kappaB and lack of I-kappaB involvement. *Br J Pharmacol.* 1999;127:1003-11.
26. Sedwick C. Wanted: A New Model for Glucocorticoid Receptor Transactivation and Transrepression. *PLoS Biol.* 2014;12:e1001814.
27. Phuc Le P, Friedman JR, Schug J i sur. Glucocorticoid receptor-dependent gene regulatory networks. *PLoS Genet.* 2005;1:e16-e.
28. Reddy TE, Gertz J, Crawford GE, Garabedian MJ, Myers RM. The hypersensitive glucocorticoid response specifically regulates period 1 and expression of circadian genes. *Mol Cell Biol.* 2012;32:3756-67.
29. Batmanov K, Wang W, Bjørås M, Delabie J, Wang J. Integrative whole-genome sequence analysis reveals roles of regulatory mutations in BCL6 and BCL2 in follicular lymphoma. *Sci Rep.* 2017;7:7040.
30. Yu C-Y, Mayba O, Lee JV i sur. Genome-Wide Analysis of Glucocorticoid Receptor Binding Regions in Adipocytes Reveal Gene Network Involved in Triglyceride Homeostasis. *PLoS One.* 2010;5:e15188.
31. Rogalska J. Neurons Survival and Behavioral Impairment After Neonatal Brain Injury. *Vitam Horm.* 2010; 391-419.
32. Sapolsky RM. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch Gen Psychiatry.* 2000;57:925-35.
33. Soontornniyomkij V, Risbrough VB, Young JW i sur. Short-term recognition memory impairment is associated with decreased expression of FK506 binding protein 51 in the aged mouse brain. *Age (Dordr).* 2010;32:309-22.
34. Hassan AH, Patchev VK, Rosenstiel PV, Holsboer F, Almeida OF. Plasticity of hippocampal corticosteroid receptors during aging in the rat. *FASEB J.* 1999;13:115-22.
35. Diamond DM, Fleshner M, Ingersoll N, Rose G. Psychological stress impairs spatial working memory: Relevance to electrophysiological studies of hippocampal function. *Behav Neurosci.* 1996;110:661-72.
36. Aleisa AM, Alzoubi KH, Gerges NZ, Alkadhi KA. Chronic psychosocial stress-induced impairment of hippocampal LTP: possible role of BDNF. *Neurobiol Dis.* 2006;22:453-62.
37. Sandi C. Stress, cognitive impairment and cell adhesion molecules. *Nat Rev Neurosci.* 2004;5:917.
38. Diamond DM, Fleshner M, Rose GM. Psychological stress repeatedly blocks hippocampal primed burst potentiation in behaving rats. *Behav Brain Res.* 1994;62:1-9.
39. Gerges NZ, Aleisa AM, Schwarz LA, Alkadhi KA. Reduced basal CAMKII levels in hippocampal CA1 region: Possible cause of stress-induced impairment of LTP in chronically stressed rats. *Hippocampus.* 2004;14:402-10.
40. Aleisa AM, Alzoubi KH, Alkadhi KA. Nicotine prevents stress-induced enhancement of long-term depression in hippocampal area CA1: Electrophysiological and molecular studies. *J Neurosci Res.* 2006;83:309-17.
41. Deborah NA, Olof W, Harm JK. Stress, Corticosteroid Hormones and Hippocampal Synaptic Function. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets.* 2006;5:521-9.
42. Lucassen P, Heine VM, Muller MB i sur. Stress, Depression and Hippocampal Apoptosis. *CNS Neurolog Disord Drug Targets.* 2006;5:531-46.
43. Gerges NZ, Alzoubi KH, Park CR, Diamond DM, Alkadhi KA. Adverse effect of the combination of hypothyroidism and chronic psychosocial stress on hippocampus-dependent memory in rats. *Behav Brain Res.* 2004;155:77-84.
44. Touyarot K, Venero C, Sandi C. Spatial learning impairment induced by chronic stress is related to individual differences in novelty reactivity: search for neurobiological correlates. *Psychoneuroendocrinology.* 2004;29:290-305.

45. Lupien SJ, Evans A, Lord C i sur. Hippocampal volume is as variable in young as in older adults: Implications for the notion of hippocampal atrophy in humans. *NeuroImage*. 2007;34:479-85.
46. Starkman MN, Giordani B, Gebarski SS, Berent S, Schork MA, Schteingart DE. Decrease in cortisol reverses human hippocampal atrophy following treatment of Cushing's disease. *Biol Psychiatry*. 1999;46:1595-602.
47. Yehuda R. Biology of posttraumatic stress disorder. *J Clin Psychiatry*. 2001;62 Suppl 17:41-6.
48. Gerges NZ, Stringer JL, Alkadhi KA. Combination of hypothyroidism and stress abolishes early LTP in the CA1 but not dentate gyrus of hippocampus of adult rats. *Brain Res*. 2001;922:250-60.
49. da Silva Sousa P, Lin K, Garzon E, Sakamoto AC, Yacubian EM. Self-perception of factors that precipitate or inhibit seizures in juvenile myoclonic epilepsy. *Seizure*. 2005;14:340-6.
50. Haut SR, Vouyiouklis M, Shinnar S. Stress and epilepsy: a patient perception survey. *Epilepsy Behav*. 2003;4:511-4.
51. Dallé E, Mabandla MV. Early Life Stress, Depression And Parkinson's Disease: A New Approach. *Mol Brain*. 2018;11:18-.
52. Djamshidian A, Lees AJ. Can stress trigger Parkinson's disease? *Journal Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2014;85:878-81.
53. Srivareerat M, Tran TT, Alzoubi KH, Alkadhi KA. Chronic psychosocial stress exacerbates impairment of cognition and long-term potentiation in beta-amyloid rat model of Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*. 2009;65:918-26.
54. Tran TT, Srivareerat M, Alhaider IA, Alkadhi KA. Chronic psychosocial stress enhances long-term depression in a subthreshold amyloid-beta rat model of Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2011;119:408-16.
55. Meyer SE, Chrousos GP, Gold PW. Major depression and the stress system: a life span perspective. *Dev Psychopathol*. 2001;13:565-80.
56. Joëls M. Corticosteroid effects in the brain: U-shape it. *Trends Pharmacol Sci*. 2006;27:244-50.
57. Wolkowitz OM, Lupien SJ, Bigler ED. The "steroid dementia syndrome": a possible model of human glucocorticoid neurotoxicity. *Neurocase*. 2007;13:189-200.
58. Gilbertson MW, Shenton ME, Ciszewski A i sur. Smaller hippocampal volume predicts pathologic vulnerability to psychological trauma. *Nat Neurosci*. 2002;5:1242-7.
59. Alzheimer A. Neuere Arbeiten über die Dementia senilis und die auf atheromatöser Gefässerkrankung basierenden Gehirnkrankheiten. *Euro Neurol*. 1898;3:101-15.
60. Drouin E, Drouin G. The first report of Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*. 2017;16:687.
61. Goedert M, Spillantini MG. A century of Alzheimer's disease. *Science*. 2006;314:777-81.
62. Braak H, Braak E. Alzheimer's disease affects limbic nuclei of the thalamus. *Acta neuropathol*. 1991;81:261-8.
63. Hardy J. A hundred years of Alzheimer's disease research. *Neuron*. 2006;52(1):3-13.
64. Alzheimer's Association. Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*. 2018;14:367-429.
65. de Paula VJR, Guimarães FM, Diniz BS, Forlenza OV. Neurobiological pathways to Alzheimer's disease: Amyloid-beta, TAU protein or both? *Dement Neuropsychol*. 2009;3:188-94.
66. Kim J, Basak JM, Holtzman DM. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron*. 2009;63:287-303.
67. Rogers JT, Venkataramani V, Washburn C i sur. A role for amyloid precursor protein translation to restore iron homeostasis and ameliorate lead (Pb) neurotoxicity. *J Neurochem*. 2016;138:479-94.

68. Zhou ZD, Chan CH, Ma QH, Xu XH, Xiao ZC, Tan EK. The roles of amyloid precursor protein (APP) in neurogenesis: Implications to pathogenesis and therapy of Alzheimer disease. *Cell Adh Migr.* 2011;5:280-92.
69. Duce JA, Tsatsanis A, Cater MA i sur. Iron-export ferroxidase activity of  $\beta$ -amyloid precursor protein is inhibited by zinc in Alzheimer's disease. *Cell.* 2010;142:857-67.
70. Hamley IW. The amyloid beta peptide: a chemist's perspective. Role in Alzheimer's and fibrillization. *Chem Rev.* 2012;112:5147-92.
71. O'Brien RJ, Wong PC. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci.* 2011;34:185-204.
72. Shin RW, Iwaki T, Kitamoto T, Tateishi J. Hydrated autoclave pretreatment enhances tau immunoreactivity in formalin-fixed normal and Alzheimer's disease brain tissues. *Lab Invest.* 1991;64:693-702.
73. Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW. Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol.* 1977;116:207-25.
74. Gendron TF, Petrucelli L. The role of tau in neurodegeneration. *Mol Neurodegener.* 2009;11:4-13.
75. Masters CL, Bateman R, Blennow K, Rowe CC, Sperling RA, Cummings JL. Alzheimer's disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2015;1:15056.
76. Holtzman DM, Herz J, Bu G. Apolipoprotein E and apolipoprotein E receptors: normal biology and roles in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2:a006312.
77. Zhang Z, Mu J, Li J, Li W, Song J. Aberrant apolipoprotein E expression and cognitive dysfunction in patients with poststroke depression. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2013;17:47-51.
78. Ashford JW. APOE genotype effects on Alzheimer's disease onset and epidemiology. *J Mol Neurosci.* 2004;23:157-65.
79. Tanzi RE. The synaptic A $\beta$  hypothesis of Alzheimer disease. *Nat Neurosci.* 2005;8:977-9.
80. Wilson RS, Evans DA, Bienias JL, Mendes de Leon CF, Schneider JA, Bennett DA. Proneness to psychological distress is associated with risk of Alzheimer's disease. *Neurology.* 2003;61:1479-85.
81. Wilson RS, Arnold SE, Schneider JA, Kelly JF, Tang Y, Bennett DA. Chronic psychological distress and risk of Alzheimer's disease in old age. *Neuroepidemiology.* 2006;27:143-53.
82. Csernansky JG, Dong H, Fagan AM i sur. Plasma cortisol and progression of dementia in subjects with Alzheimer-type dementia. *Am J Psychiatry.* 2006;163:2164-9.
83. Yaffe K, Vittinghoff E, Lindquist K i sur. Posttraumatic stress disorder and risk of dementia among US veterans. *Arch Gen Psychiatry.* 2010;67:608-13.
84. Li J, Song M, Xu X. Glucocorticoids Facilitate Astrocytic Amyloid- $\beta$  Peptide Deposition by Increasing the Expression of APP and BACE1 and Decreasing the Expression of Amyloid- $\beta$ -Degrading Proteases. *Endocrinology.* 2011;152:2704-15.
85. Aisen PS, Davis KL, Berg JD i sur. A randomized controlled trial of prednisone in Alzheimer's disease. *Neurology.* 2000;54:588-.
86. Green KN, Billings LM, Roozendaal B, McGaugh JL, LaFerla FM. Glucocorticoids Increase Amyloid- $\beta$  and Tau Pathology in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Neurosci.* 2006;26:9047-56.
87. Hung CW, Chen YC, Hsieh WL, Chiou SH, Kao CL. Ageing and neurodegenerative diseases. *Ageing Res Rev.* 2010;9 Suppl 1:S36-46.
88. Tobin MJ, Snyder JV. Cheyne-Stokes respiration revisited: controversies and implications. *Crit Care Med.* 1984;12:882-7.
89. Sahin E, Depinho RA. Linking functional decline of telomeres, mitochondria and stem cells during ageing. *Nature.* 2010;464:520-8.
90. Pollack M, Phaneuf S, Dirks A, Leeuwenburgh C. The role of apoptosis in the normal aging brain, skeletal muscle, and heart. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;959:93-107.

91. Silver AJ, Guillen CP, Kahl MJ, Morley JE. Effect of aging on body fat. *J Am Geriatr Soc.* 1993;41:211-3.
92. Williams GN, Higgins MJ, Lewek MD. Aging Skeletal Muscle: Physiologic Changes and the Effects of Training. *Phys Ther.* 2002;82:62-8.
93. Orelund L, Gottfries CG. Brain and brain monoamine oxidase in aging and in dementia of Alzheimer's type. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 1986;10:533-40.
94. Alzheimer Soceity Canada. Normal aging vs dementia 2014 [pristupljeno 2018 Nov 20]. Dostupno na: <http://alzheimer.ca/en/Home/About-dementia/What-is-dementia/Normal-aging-vs-dementia>.
95. Priyadarshini S, Aich P. Effects of psychological stress on innate immunity and metabolism in humans: a systematic analysis. *PLoS One.* 2012;7:e43232.
96. Black PH, Garbutt LD. Stress, inflammation and cardiovascular disease. *J Psychosom Res.* 2002;52:1-23.
97. Moreno-Smith M, Lutgendorf SK, Sood AK. Impact of stress on cancer metastasis. *Future Oncol.* 2010;6:1863-81.
98. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest.* 2005;115:1111-9.
99. Liu Y-Z, Wang Y-X, Jiang C-L. Inflammation: The Common Pathway of Stress-Related Diseases. *Front Hum Neurosci.* 2017;11:316.
100. Wang M. The role of glucocorticoid action in the pathophysiology of the Metabolic Syndrome. *Nutr Metab.* 2005;2:3.
101. von Kanel R, Dimsdale JE, Mills PJ i sur. Effect of Alzheimer caregiving stress and age on frailty markers interleukin-6, C-reactive protein, and D-dimer. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2006;61:963-9.
102. Grady KE. Sex Bias in Research Design. *Psychol Women Q.* 1981;5(4):628-35.
103. Beery AK, Zucker I. Sex bias in neuroscience and biomedical research. *Neurosci Biobehav Rev.* 2011;35:565-72.
104. Brann DW, Dhandapani K, Wakade C, Mahesh VB, Khan MM. Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: basic mechanisms and clinical implications. *Steroids.* 2007;72:381-405.
105. Ahima RS, Lawson AN, Osei SY, Harlan RE. Sexual dimorphism in regulation of type II corticosteroid receptor immunoreactivity in the rat hippocampus. *Endocrinology.* 1992;131:1409-16.
106. Kudielka BM, Kirschbaum C. Sex differences in HPA axis responses to stress: a review. *Biol Psychol.* 2005;69:113-32.
107. Marin R, Marrero-Alonso J, Fernandez C, Cury D, Diaz M. Estrogen receptors in lipid raft signalling complexes for neuroprotection. 1 izd: *Frontiers in bioscience (Elite edition);* 2012;4:1420-33.
108. Bridgewater LC, Zhang C, Wu Y i sur. Gender-based differences in host behavior and gut microbiota composition in response to high fat diet and stress in a mouse model. *Sci Rep.* 2017;7:10776.
109. Lenglos C, Mitra A, Guevremont G, Timofeeva E. Sex differences in the effects of chronic stress and food restriction on body weight gain and brain expression of CRF and relaxin-3 in rats. *Genes Brain Behav.* 2013;12:370-87.
110. Tierney MC, Oh P, Moineddin R i sur. A randomized double-blind trial of the effects of hormone therapy on delayed verbal recall in older women. *Psychoneuroendocrinology.* 2009;34:1065-74.
111. Altmann A, Tian L, Henderson VW, Greicius MD. Sex modifies the APOE-related risk of developing Alzheimer disease. *Ann Neurol.* 2014;75:563-73.
112. Reeves MJ, Bushnell CD, Howard G i sur. Sex differences in stroke: epidemiology, clinical presentation, medical care, and outcomes. *Lancet Neurol.* 2008;7:915-26.

113. Dal Forno G, Palermo MT, Donohue JE, Karagiozis H, Zonderman AB, Kawas CH. Depressive symptoms, sex, and risk for Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 2005;57:381-7.
114. MacGowan SH, Wilcock GK, Scott M. Effect of gender and apolipoprotein E genotype on response to anticholinesterase therapy in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry*. 1998;13:625-30.
115. Winblad B, Amouyel P, Andrieu S i sur. Defeating Alzheimer's disease and other dementias: a priority for European science and society. *Lancet Neurol*. 2016;15:455-532.
116. Bellou V, Belbasis L, Tzoulaki I, Evangelou E, Ioannidis JP. Environmental risk factors and Parkinson's disease: An umbrella review of meta-analyses. *Parkinsonism Relat Disord*. 2016;23:1-9.
117. Roth J, Qureshi S, Whitford I i sur. Insulin's discovery: new insights on its ninetieth birthday. *Diabetes Metab Res Rev*. 2012;28:293-304.
118. Scott DA, Best CH. The Preparation of Insulin. *Ind Eng Chem*. 1925;17:238-40.
119. Zeyda M, Stulnig TM. Obesity, inflammation, and insulin resistance--a mini-review. *Gerontology*. 2009;55:379-86.
120. Capeau J. Insulin resistance and steatosis in humans. *Diabetes Metab*. 2008;34:649-57.
121. Glogster EDU. Insulin Receptor 2016 [pristupljeno 2018 Nov 12]. Dostupno na: <https://edu.glogster.com/glog/insulin-receptor-9032/20uhj1vtgps?=glogpedia-source>.
122. Akintola AA, van Heemst D. Insulin, aging, and the brain: mechanisms and implications. *Front Endocrinol*. 2015;6:13.
123. Geroldi C, Frisoni GB, Paolisso G i sur. Insulin resistance in cognitive impairment: The inchianti study. *Arch Neurol*. 2005;62:1067-72.
124. Joseph D'Ercole A, Ye P. Expanding the mind: insulin-like growth factor I and brain development. *Endocrinology*. 2008;149:5958-62.
125. Schilling MA. Unraveling Alzheimer's: Making Sense of the Relationship between Diabetes and Alzheimer's Disease1. *J Alzheimers Dis*. 2016;51:961-77.
126. Steen E, Terry BM, Rivera EJ i sur. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? *J Alzheimers Dis*. 2005;7:63-80.
127. de la Monte SM. Relationships between diabetes and cognitive impairment. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2014;43:245-67.
128. Mullins RJ, Diehl TC, Chia CW, Kapogiannis D. Insulin Resistance as a Link between Amyloid-Beta and Tau Pathologies in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci*. 2017;9:118.
129. Nakano H. Signaling crosstalk between NF-kappaB and JNK. *Trends Immunol*. 2004;25:402-5.
130. Lesort M, Johnson GV. Insulin-like growth factor-1 and insulin mediate transient site-selective increases in tau phosphorylation in primary cortical neurons. *Neuroscience*. 2000;99:305-16.
131. Welsh GI, Proud CG. Glycogen synthase kinase-3 is rapidly inactivated in response to insulin and phosphorylates eukaryotic initiation factor eIF-2B. *Biochem J*. 1993;294:625-9.
132. Yan YX, Xiao HB, Wang SS i sur. Investigation of the Relationship Between Chronic Stress and Insulin Resistance in a Chinese Population. *Journal of epidemiology*. 2016;26:355-60.
133. Chandola T, Brunner E, Marmot M. Chronic stress at work and the metabolic syndrome: prospective study. *BMJ*. 2006;332:521-5.
134. Sudha Rastogi K, Campbell J. Effect of Growth Hormone on Cortisone-Induced Hyperinsulinemia and Reduction in Pancreatic Insulin in the Mouse. *Endocrinology*. 1970;87:226-32.
135. Kitabchi AE, Jones GM, Duckworth WC. Effect of Hydrocortisone and Corticotropin on Glucose-Induced Insulin and Proinsulin Secretion in Man. *J Clin Endocrinol Metab*. 1973;37:79-84.

136. Carvalho CR, Brenelli SL, Silva AC, Nunes AL, Velloso LA, Saad MJ. Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. *Endocrinology*. 1996;137:151-9.
137. Escriba F, Gavete ML, Fermin Y i sur. Effect of age and moderate food restriction on insulin sensitivity in Wistar rats: role of adiposity. *J Endocrinol*. 2007;194:131-41.
138. Baranowska-Bik A, Bik W. Insulin and brain aging. *Prz Menopauzalny*. 2017;16:44-6.
139. Matarese G, Moschos S, Mantzoros CS. Leptin in immunology. *J Immunol*. 2005;174:3137-42.
140. Zhang F, Chen Y, Heiman M, Dimarchi R. Leptin: structure, function and biology. *Vitam Horm*. 2005;71:345-72.
141. Peelman F, Zabeau L, Moharana K, Savvides SN, Tavernier J. 20 years of leptin: insights into signaling assemblies of the leptin receptor. *J Endocrinol*. 2014;223:T9-23.
142. Rosenbaum M, Goldsmith R, Bloomfield D i sur. Low-dose leptin reverses skeletal muscle, autonomic, and neuroendocrine adaptations to maintenance of reduced weight. *J Clin Invest*. 2005;115:3579-86.
143. Maffei M, Halaas J, Ravussin E i sur. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med*. 1995;1:1155-61.
144. Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D. Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell*. 2008;135:61-73.
145. Park HK, Ahima RS. Leptin signaling. *F1000prime Rep*. 2014;6:73.
146. Ashford JW. APOE genotype effects on Alzheimer's disease onset and epidemiology. *J Mol Neurosci*. 2004;23:157-65.
147. Folch J, Patraca I, Martínez N i sur. The role of leptin in the sporadic form of Alzheimer's disease. Interactions with the adipokines amylin, ghrelin and the pituitary hormone prolactin. *Life Sci*. 2015;140:19-28.
148. Greco SJ, Bryan KJ, Sarkar S i sur. Leptin reduces pathology and improves memory in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2010;19:1155-67.
149. Johnston JM, Greco SJ, Hamzelou A, Ashford JW, Tezapsidis N. Repositioning leptin as a therapy for Alzheimer's disease. *Therapy*. 2011;8:481-90.
150. Udden J, Bjorntorp P, Arner P, Barkeling B, Meurling L, Rossner S. Effects of glucocorticoids on leptin levels and eating behaviour in women. *J Intern Med*. 2003;253:225-31.
151. Chow VT, Phoon MC. Measurement of serum leptin concentrations in university undergraduates by competitive ELISA reveals correlations with body mass index and sex. *Adv Physiol Educ*. 2003;27:70-7.
152. Ivić V, Blažetić S, Labak I i sur. Ovariectomy and chronic stress lead toward leptin resistance in the satiety centers and insulin resistance in the hippocampus of Sprague-Dawley rats. *Croat Med J*. 2016;57:194-206.
153. Pike LJ. Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res*. 2003;44:655-67.
154. Brown DA, London E. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem*. 2000;275:17221-4.
155. Simons K, Sampaio JL. Membrane organization and lipid rafts. *Cold Sprin Harb Perspect Biol*. 2011;3:a004697.
156. Persaud-Sawin DA, Lightcap S, Harry GJ. Isolation of rafts from mouse brain tissue by a detergent-free method. *J Lipid Res*. 2009;50:759-67.
157. Ostrom RS, Insel PA. The evolving role of lipid rafts and caveolae in G protein-coupled receptor signaling: implications for molecular pharmacology. *Br J Pharmacol*. 2004;143:235-45.
158. Lorent JH, Levental I. Structural determinants of protein partitioning into ordered membrane domains and lipid rafts. *Chem Phys Lipids*. 2015;192:23-32.
159. Lucero HA, Robbins PW. Lipid rafts-protein association and the regulation of protein activity. *Arch Biochem Biophys*. 2004;426:208-24.



160. Marin R, Rojo JA, Fabelo N, Fernandez CE, Diaz M. Lipid raft disarrangement as a result of neuropathological progresses: a novel strategy for early diagnosis? *Neuroscience*. 2013;245:26-39.
161. Beesley PW, Herrera-Molina R, Smalla K-H, Seidenbecher C. The Neuropilin adhesion molecules: key regulators of neuronal plasticity and synaptic function. *J Neurochem*. 2014;131:268-83.
162. Bhattacharya S, Herrera-Molina R, Sabanov V i sur. Genetically Induced Retrograde Amnesia of Associative Memories After Neuropilin Ablation. *Biol Psychiatry*. 2017;81:124-35.
163. Villar VA, Cuevas S, Zheng X, Jose PA. Localization and signaling of GPCRs in lipid rafts. *Methods Cell Biol*. 2016;132:3-23.
164. Vainio S, Heino S, Mansson JE i sur. Dynamic association of human insulin receptor with lipid rafts in cells lacking caveolae. *EMBO Rep*. 2002;3:95-100.
165. Morino-Koga S, Yano S, Kondo T i sur. Insulin receptor activation through its accumulation in lipid rafts by mild electrical stress. *J Cell Physiol*. 2013;228:439-46.
166. Collin A, Noacco A, Talvas J, Caldefie-Chezet F, Vasson MP, Farges MC. Enhancement of Lytic Activity by Leptin Is Independent From Lipid Rafts in Murine Primary Splenocytes. *J Cell Physiol*. 2017;232:101-9.
167. Radeva G, Sharom FJ. Isolation and characterization of lipid rafts with different properties from RBL-2H3 (rat basophilic leukaemia) cells. *Biochem J*. 2004;380:219-30.
168. Kennedy C, Nelson MD, Bamezai AK. Analysis of detergent-free lipid rafts isolated from CD4+ T cell line: interaction with antigen presenting cells promotes coalescing of lipid rafts. *Cell Commun Signal*. 2011;9:31.
169. Boesze-Battaglia K. Isolation of membrane rafts and signaling complexes. *Methods Mol Biol*. 2006;332:169-79.
170. Heffer-Lauc M, Viljetić B, Vajn K, Schnaar RL, Lauc G. Effects of detergents on the redistribution of gangliosides and GPI-anchored proteins in brain tissue sections. *J Histochem Cytochem*. 2007;55:805-12.
171. Heffer-Lauc M, Viljetić B, Vajn K, Schnaar RL, Lauc G. Effects of detergents on the redistribution of gangliosides and GPI-anchored proteins in brain tissue sections. *J Histochem Cytochem*. 2007;55:805-12.
172. Yamamoto N, Matsubara T, Sobue K i sur. Brain insulin resistance accelerates Aβ fibrillogenesis by inducing GM1 ganglioside clustering in the presynaptic membranes. *J Neurochem*. 2012;121:619-28.
173. Kracun I, Rosner H, Drnovsek V, Heffer-Lauc M, Cosovic C, Lauc G. Human brain gangliosides in development, aging and disease. *Int J De Biol*. 1991;35:289-95.
174. Fabelo N, Martin V, Marin R i sur. Evidence for premature lipid raft aging in APP/PS1 double-transgenic mice, a model of familial Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2012;71:868-81.
175. Yanagisawa K. GM1 ganglioside and Alzheimer's disease. *Glycoconj J*. 2015;32:87-91.
176. Laethem FV, Liang X, Andris F i sur. Glucocorticoids Alter the Lipid and Protein Composition of Membrane Rafts of a Murine T Cell Hybridoma. *J Immunol*. 2003;170:2932-9.
177. Sotocinal SG, Sorge RE, Zaloum A i sur. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Mol Pain*. 2011;7:55.
178. Balog M, Miljanović M, Blažetić S i sur. Sex-specific chronic stress response at the level of adrenal gland modified sexual hormone and leptin receptors. *Croat Med J*. 2015;56:104-13.
179. Kalász J, Tóth EP, Bódi B i sur. Single acute stress-induced progesterone and ovariectomy alter cardiomyocyte contractile function in female rats. *Croat Med J*. 2014;55:239-49.
180. Balog M, Mlinarevic D, Seric V i sur. Plasma Content of Glucose, C-reactive Protein, Uric Acid and Cholesterol in Male, Female and Ovariectomized Rats upon Acute and Chronic Stress-a Path for Development of Cardiovascular Diseases. *Coll Antropol*. 2015;39:385-92.

181. Ernsberger P, Koletsky RJ. The Glucose Tolerance Test as a Laboratory Tool with Clinical Implications. 1. izd. InTech, 2012. str. 3-14.
182. Ghezzi AC, Cambri LT, Botezelli JD, Ribeiro C, Dalia RA, de Mello MAR. Metabolic syndrome markers in wistar rats of different ages. *Diabetol Metab Syndr*. 2012;4:16.
183. Paxinos G, Watson C, ur. Withdrawn: Index of Structures. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 4 izd: Academic Press; 2007.
184. de Olmos J, Hardy H, Heimer L. The afferent connections of the main and the accessory olfactory bulb formations in the rat: an experimental HRP-study. *J Comp Neurol*. 1978;181:213-44.
185. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E i sur. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012;9:676-82.
186. Arqués O, Chicote I, Tenbaum S, Puig I, G. Palmer H. Standardized Relative Quantification of Immunofluorescence Tissue Staining. *Nat Protoc*. 2012; 8: 1-5.
187. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
188. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265-75.
189. Marcello E, Gardoni F, Di Luca M. Alzheimer's disease and modern lifestyle: what is the role of stress? *J Neurochem*. 2015;134:795-8.
190. Willner P. The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. *Neurobiol Stress*. 2016;6:78-93.
191. Patchev VK, Patchev AV. Experimental models of stress. *Dialogues Clin Neurosci*. 2006;8:417-32.
192. Sutanto W, de Kloet ER. The use of various animal models in the study of stress and stress-related phenomena. *Lab Anim*. 1994;28:293-306.
193. Marzban H, Khanzada U, Shabir S i sur. Expression of the immunoglobulin superfamily neuroplastin adhesion molecules in adult and developing mouse cerebellum and their localisation to parasagittal stripes. *J Comp Neurol*. 2003;462:286-301.
194. Brandimarti R, Hill GS, Geiger JD, Meucci O. The lipid raft-dwelling protein US9 can be manipulated to target APP compartmentalization, APP processing, and neurodegenerative disease pathogenesis. *Sci Rep*. 2017;7:15103.
195. Santos G, Díaz M, Torres NV. Lipid Raft Size and Lipid Mobility in Non-raft Domains Increase during Aging and Are Exacerbated in APP/PS1 Mice Model of Alzheimer's Disease. Predictions from an Agent-Based Mathematical Model. *Frontiers in physiology*. 2016;7:90.
196. Yuen EY, Wei J, Yan Z. Estrogen in prefrontal cortex blocks stress-induced cognitive impairments in female rats. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016;160:221-6.
197. Novais A, Monteiro S, Roque S, Correia-Neves M, Sousa N. How age, sex and genotype shape the stress response. *Neurobiol Stress*. 2016;6:44-56.
198. Xavier AM, Anunciato AKO, Rosenstock TR, Glezer I. Gene Expression Control by Glucocorticoid Receptors during Innate Immune Responses. *Front Endocrinol*. 2016;7:31.
199. Singh M, Su C. Progesterone and neuroprotection. *Horm Behav*. 2013;63:284-90.
200. Singh M, Su C. Progesterone-induced neuroprotection: factors that may predict therapeutic efficacy. *Brain Res*. 2013;1514:98-106.
201. Bialek M, Zaremba P, Borowicz KK, Czuczwar SJ. Neuroprotective role of testosterone in the nervous system. *Pol J Pharmacol*. 2004;56:509-18.
202. Son SW, Lee JS, Kim HG, Kim DW, Ahn YC, Son CG. Testosterone depletion increases the susceptibility of brain tissue to oxidative damage in a restraint stress mouse model. *J Neurochem*. 2016;136:106-17.
203. Dallman MF, Pecoraro N, Akana SF i sur. Chronic stress and obesity: A new view of "comfort food". *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:11696-701.

204. Forbes NF, Stewart CA, Matthews K, Reid IC. Chronic Mild Stress and Sucrose Consumption: Validity as a Model of Depression. *Physiol Behav.* 1996;60:1481-4.
205. Stone EA, Quartermain D. Greater Behavioral Effects of Stress in Immature as Compared to Mature Male Mice. *Physiol Behav.* 1997;63:143-5.
206. Harris RBS. Chronic and acute effects of stress on energy balance: are there appropriate animal models? *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2015;308:R250-R65.
207. Jeong JY, Lee DH, Kang SS. Effects of chronic restraint stress on body weight, food intake, and hypothalamic gene expressions in mice. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2013;28:288-96.
208. Block JP, He Y, Zaslavsky AM, Ding L, Ayanian JZ. Psychosocial stress and change in weight among US adults. *Am J Epidemiol.* 2009;170:181-92.
209. Pereira VH, Marques F, Lages V i sur. Glucose intolerance after chronic stress is related with downregulated PPAR- $\gamma$  in adipose tissue. *Cardiovasc Diabetol.* 2016;15:114.
210. Packard AEB, Ghosal S, Herman JP, Woods SC, Ulrich-Lai YM. Chronic variable stress improves glucose tolerance in rats with sucrose-induced prediabetes. *Psychoneuroendocrinology.* 2014;47:178-88.
211. Turner RS. Alzheimer's disease in man and transgenic mice: females at higher risk. *Am J Pathol.* 2001;158:797-801.
212. Thompson R. Localization of a "passive avoidance memory system" in the white rat. *Physiol Psychol.* 1978;6:263-74.
213. Izquierdo I, Quillfeldt JA, Zanatta MS i sur. Sequential Role of Hippocampus and Amygdala, Entorhinal Cortex and Parietal Cortex in Formation and Retrieval of Memory for Inhibitory Avoidance in Rats. *EJN.* 1997;9:786-93.
214. Nazeri M, Shabani M, Parsania S i sur. Simultaneous impairment of passive avoidance learning and nociception in rats following chronic swim stress. *Adv Biomed Res.* 2016;5:93.
215. Klenerova V, Jurcovicova J, Kaminsky O i sur. Combined restraint and cold stress in rats: effects on memory processing in passive avoidance task and on plasma levels of ACTH and corticosterone. *Behav Brain Res.* 2003;142:143-9.
216. Cherian SB, Bairy KL, Rao MS. Chronic prenatal restraint stress induced memory impairment in passive avoidance task in post weaned male and female Wistar rats. *Indian J Exp Biol.* 2009;47:893-9.
217. Hillhouse EW, Grammatopoulos DK. The molecular mechanisms underlying the regulation of the biological activity of corticotropin-releasing hormone receptors: implications for physiology and pathophysiology. *Endocr Rev.* 2006;27:260-86.
218. Bayatti N, Behl C. The neuroprotective actions of corticotropin releasing hormone. *Ageing Res Rev.* 2005;4:258-70.
219. Carroll JC, Iba M, Bangasser DA i sur. Chronic stress exacerbates tau pathology, neurodegeneration, and cognitive performance through a corticotropin-releasing factor receptor-dependent mechanism in a transgenic mouse model of tauopathy. *J Neurosci.* 2011;31:14436-49.
220. Alkadhi KA. Chronic stress and Alzheimer's disease-like pathogenesis in a rat model: prevention by nicotine. *Curr Neuropharmacol.* 2011;9:587-97.
221. Oikawa N, Yamaguchi H, Ogino K i sur. Gangliosides determine the amyloid pathology of Alzheimer's disease. *Neuroreport.* 2009;20:1043-6.
222. Svennerholm L, Bostrom K, Fredman P, Mansson JE, Rosengren B, Rynmark BM. Human brain gangliosides: developmental changes from early fetal stage to advanced age. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 1989;1005:109-17.
223. Datson NA, van der Perk J, de Kloet ER, Vreugdenhil E. Identification of corticosteroid-responsive genes in rat hippocampus using serial analysis of gene expression. *EJN.* 2001;14:675-89.
224. Finsterwald C, Alberini CM. Stress and glucocorticoid receptor-dependent mechanisms in long-term memory: from adaptive responses to psychopathologies. *Neurobiol Learn Mem.* 2014;112:17-29.

225. Wong EY, Herbert J. Raised circulating corticosterone inhibits neuronal differentiation of progenitor cells in the adult hippocampus. *Neuroscience*. 2006;137:83-92.
226. Oomen CA, Mayer JL, de Kloet ER, Joels M, Lucassen PJ. Brief treatment with the glucocorticoid receptor antagonist mifepristone normalizes the reduction in neurogenesis after chronic stress. *EJN*. 2007;26:3395-401.
227. Lorsch ZS, Loh YHE, Purushothaman i sur. Estrogen receptor  $\alpha$  drives pro-resilient transcription in mouse models of depression. *Nat Commun*. 2018;9:1116.
228. Strachan MW. Insulin and cognitive function in humans: experimental data and therapeutic considerations. *Biochem Soc Trans*. 2005;33:1037-40.
229. Cholerton B, Baker LD, Craft S. Insulin, cognition, and dementia. *Eur J Pharmacol*. 2013;719:170-9.
230. Tabatabaei-Jafari H, Walsh E, Shaw ME, Cherbuin N, Alzheimer's Disease Neuroimaging I. The cerebellum shrinks faster than normal ageing in Alzheimer's disease but not in mild cognitive impairment. *Hum Brain Mapp*. 2017;38:3141-50.
231. Chong AC, Vogt MC, Hill AS, Bruning JC, Zeltser LM. Central insulin signaling modulates hypothalamus-pituitary-adrenal axis responsiveness. *Mol Metab*. 2015;4:83-92.
232. Solas M, Aisa B, Tordera RM, Mugueta MC, Ramírez MJ. Stress contributes to the development of central insulin resistance during aging: Implications for Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. Molecular Basis of Disease*. 2013;1832:2332-9.
233. Rostás I, Póto L, Mátrai P i sur. In middle-aged and old obese patients, training intervention reduces leptin level: A meta-analysis. *PLoS One*. 2017;12:e0182801.
234. Razzoli M, McCallum J, Gurney A, Engeland WC, Bartolomucci A. Chronic stress aggravates glucose intolerance in leptin receptor-deficient (db/db) mice. *Genes Nutr*. 2015;10(3):458.
235. Agarwal R, Talwar P, Kushwaha SS, Tripathi CB, Kukreti R. Effect of apolipoprotein E (APOE) polymorphism on leptin in Alzheimer's disease. *Ann Indian Acad Neurol*. 2015;18:320-6.
236. Herrera-Molina R, Sarto-Jackson I, Montenegro-Venegas C i sur. Structure of excitatory synapses and GABAA receptor localization at inhibitory synapses are regulated by neuroplastin-65. *J Biol Chem*. 2014;289:8973-88.
237. Langaese K, Mummery R, Gundelfinger ED, Beesley PW. Immunoglobulin superfamily members gp65 and gp55: tissue distribution of glycoforms. *FEBS Lett*. 1998;429:284-8.
238. Toledano A, Alvarez MI, Rivas L, Lacruz C, Martinez-Rodriguez R. Amyloid precursor proteins in the cerebellar cortex of Alzheimer's disease patients devoid of cerebellar beta-amyloid deposits: immunocytochemical study of five cases. *J Neural Transm (Vienna)*. 1999;106:1151-69.
239. Sayer R, Robertson D, Balfour DJK, Breen KC, Stewart CA. The effect of stress on the expression of the amyloid precursor protein in rat brain. *Neurosci Lett*. 2008;431:197-200.
240. Park KW, Lin C-Y, Li K, Lee Y-S. Effects of Reducing Suppressors of Cytokine Signaling-3 (SOCS3) Expression on Dendritic Outgrowth and Demyelination after Spinal Cord Injury. *PLoS One*. 2015;10:e0138301.
241. Cao L, Wang Z, Wan W. Suppressor of Cytokine Signaling 3: Emerging Role Linking Central Insulin Resistance and Alzheimer's Disease. *Front Neurosci*. 2018;12:417-.
242. Chiba T, Yamada M, Sasabe J i sur. Amyloid- $\beta$  causes memory impairment by disturbing the JAK2/STAT3 axis in hippocampal neurons. *Mol Psychiatry*. 2008;14:206.
243. Guo Z, Jiang H, Xu X, Duan W, Mattson MP. Leptin-mediated cell survival signaling in hippocampal neurons mediated by JAK STAT3 and mitochondrial stabilizatio. *J Biol Chem*. 2008;283:1754-63.
244. Chang L, Chiang S-H, Saltiel AR. Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Integr Mol Med*. 2004;10:65-71.
245. Katarina Ilić KMJ, Dirk Montag, Ronald L Schnaar, Svjetlana Kalanj Bogнар, Rodrigo Herrera-Molina, editor GM1-containing lipid rafts are housing neuroplastin in neuronal plasma membrane. 11th FENS Forum of Neuroscience; 2018; Berlin.

246. Hicks DA, Nalivaeva NN, Turner AJ. Lipid rafts and Alzheimer's disease: protein-lipid interactions and perturbation of signaling. *Front Physiol.* 2012;3:189.

## 11. ŽIVOTOPIS

Marta Balog, rođena je 07. svibnja 1986. godine u Osijeku. Nakon završene Jezične gimnazije u Osijeku studirala je na Odjelu za biologiju u Osijeku – znanstveni smjer biologije. Započela je sa znanstvenim radom 2010. godine studentskom razmjenom ERASMUS te je 5 mjeseci provela (veljača – srpanj 2010.) na Odjelu za molekularne bioznanosti, Sveučilišta u Grazu gdje izrađuje magistarski rad pod vodstvom prof. dr. sc. Ellen Zechner naslova "Izrada plazmidnog konstrukta u istraživanjima tipa IV A sekrecijskog sustava". Od listopada 2010. do siječnja 2011. godine odlazi na studentsku razmjenu ERASMUS gdje boravi na Odjelu za bakteriologiju i imunologiju, Katoličkog Sveučilišta u Leuvenu. Pod vodstvom prof. Lieve Van Mellaert radi na dva znanstvena projekta. U listopadu 2011. godine brani magistarski rad. Od veljače 2012. godine volontira u Laboratoriju za neurobiologiju, Medicinskog Fakulteta Osijek pod vodstvom prof. dr. sc. Marije Heffer te radi na znanstvenim projektima: "Uloga gangliozida u sazrijevanju i plastičnosti mozga", te "Utjecaj stresa na kardiovaskularnu funkciju ovariektomiziranih štakorica". Ubrzo objavljuje rezultata studije kroničnog stresa u časopisu Collegium Antropologicum (2013). U listopadu 2013. godine zapošljava se na Katedri za medicinsku biologiju i genetiku na radnom mjestu asistentice. Suradnica je na HRZZ projektu "Patofiziološke posljedice promjene sastava lipidnih splavi". Stalna je članica organizacijskog odbora Tjedna mozga u Osijeku te se uz znanstveni rad bavi i popularizacijom znanosti. Tijekom 2015. godine postaje stipendisticom Bohdan Malaniak Cedars Sinai Medical Centre – RECOOP Young Scientist Travel Grant stipendije te radi na istraživanju kroničnog stresa i dijabetesa na Odjelu za farmakologiju Sveučilišta u Szegedu pod mentorstvom prof. dr. sc. Roberta Gaspara. Tijekom 2016. godine na istom Odjelu boravi 2 mjeseca, a dio je boravka financiran ERASMUS KA1 stipendijom. Tijekom 2018. dva tjedna boravi na Sveučilištu La Laguna na Tenerifima, Španjolska uz potporu ERASMUS KA1 stipendije. Sudjelovala je na više od 20 znanstvenih skupova te samostalno objavljuje 2 znanstvena članka, a koautorica je na još 3 znanstvene publikacije. Koristi se slijedećim znanstvenim tehnikama: imunohistokemija, izdvajanje DNA, genotipizacija, mikroskopija, protočna citometrija, *Western blotting*, rukovanje, testovi ponašanja i kirurški postupci na pokusnim životinjama, rad s bakterijskim kulturama te molekularno kloniranje. Od osobnih postignuća ističu se sljedeća: 2016. godine dobitnica je nagrade "Medal for Special Achievements", Sveučilište u Kaliforniji,

Irvine, SAD, pomoćnica je urednice i prijevoditeljica knjige D. Purves: Neuroznanost, 5 izdanje, a knjigu 2016. objavljuje Medicinska naklada. U 2019. godini nagrađena je stipendijama Europskog biokemijskog društva (FEBS) te Europskog društva za znanost o pokusnim životinjama (FELASA) za sudjelovanje na znanstvenim konferencijama u Portugalu i Češkoj.