

Karakterizacija animalnog modela tauopatije odabranim testovima ponašanja

Štampar, Emma

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:610281>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Emma Štampar

7235/BT

**KARAKTERIZACIJA ANIMALNOG MODELA TAUOPATIJE
ODABRANIM TESTOVIMA PONAŠANJA**

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta: *„Hiperfosforilacija, agregacija i transsinaptički prijenos tau proteina u Alzheimerovoj bolesti: analiza likvora i ispitivanje potencijalnih neuroprotektivnih spojeva“ (Voditelj: Prof. dr. sc. Goran Šimić)*

Modul: Biotehnologija 4

Mentor: prof. dr. sc. *Blaženka Kos*

Zagreb, 2019.

Rad je izrađen na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost „*Hiperfosforilacija, agregacija i transsinaptički prijenos tau proteina u Alzheimerovoj bolesti: analiza likvora i ispitivanje potencijalnih neuroprotektivnih spojeva*“ (IP-2014-09-9730) (12. listopada 2015. - 11. listopada 2019. godine) pod neposrednim voditeljstvom prof. dr. sc. Gorana Šimića, voditelja projekta i mentorstvom prof. dr. sc. Blaženke Kos s Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

KARAKTERIZACIJA ANIMALNOG MODELA TAUOPATIJE ODABRANIM TESTOVIMA PONAŠANJA

Emma Štampar, 7235/BT

Sažetak: Sporadična Alzheimerova bolest (AB) najčešća je sekundarna tauopatija. Istraživanja na animalnim modelima AB pokazala su transsinaptičko širenje monomernog, oligomernog i fibrilarnog oblika tau proteina, međutim nije jasno utvrđeno je li takvo širenje popraćeno i predmnijevanim kognitivnim promjenama. Stoga je cilj ovog rada bio odrediti hoće li širenje određenog oblika tau proteina biti povezano s kognitivnim promjenama. Nakon 3 i 6 mjeseci po injiciranju tau proteina u entorinalnu moždanu koru Wistar štakora provedeni su odabrani testovi ponašanja. Rezultati dobiveni nakon provedenih testova ponašanja su pokazali da je kognitivni deficit bio ovisan o obliku injiciranog tau proteina i vremenskoj točki u kojoj je izvršeno testiranje. Tri mjeseca nakon injiciranja, testom otvorenog prostora utvrđeno je anksiozno ponašanje kod skupina životinja kojima su injicirani oligomeri tau proteina i skupina životinja kojima su injicirani kratki filamentni tau proteina. T-labirintom je utvrđen deficit kratkoročnog pamćenja kod skupine fibrili nakon 3 i 6 mj i kod skupine oligomer nakon 6 mj, dok testom prepoznavanja novog objekta nije utvrđen deficit dugoročnog pamćenja ni u jednoj od ispitivanih skupina.

Ključne riječi: Alzheimerova bolest, animalni model, memorija, tau protein, testovi ponašanja

Rad sadrži: 33 stranice, 26 slika, 3 tablice, 66 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: *prof. dr. sc. Blaženka Kos*

Pomoć pri izradi: *prof. dr. sc. Goran Šimić (neposredni voditelj), mag. biol. mol. Lea Langer Horvat*

Datum obrane: 9. rujna 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical engineering

Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Starter Cultures Technology

CHARACTERIZATION OF THE ANIMAL MODEL OF TAUOPATHY BY USING SELECTED BEHAVIORAL TESTS

Emma Štampar, 7235/BT

Abstract: Sporadic Alzheimer's Disease (AD) is the most common secondary tauopathy. Research on animal models of AB has shown the trans-synaptic spread of the monomeric, oligomeric, and fibrillar forms of tau proteins. However, it has not been clearly determined whether such propagation parallels presumed cognitive changes. Therefore, the aim of this work was to determine will the spread of tau proteins be accompanied with cognitive changes. Three and six months after injection of tau protein into the entorhinal cortex, selected behavioral tests were performed. Behavior tests results showed that rats exhibited form and time-dependent cognitive deficits. The open field test showed anxiety behavior in the groups receiving the tau oligomer and the groups receiving the tau fibril at 3 m time point. The T-maze test showed a short-term memory deficit in the fibrils group after both 3 and 6 m, and in the oligomer group after 6 m. The novel object recognition test showed no long-term memory deficit in either group.

Keywords: Alzheimer's disease, animal model, behavioral tests, memory, tau protein

Thesis contains: 33 pages, 26 figures, 3 tables, 66 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: *prof. dr. sc. Blaženka Kos*

Technical support and assistance: *prof. dr. sc. Goran Šimić (principal investigator), mag. biol. mol. Lea Langer Horvat*

Defence date: September 9th 2019

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Alzheimerova bolest.....	2
2.2. Faze Alzheimerove bolesti	2
2.3. Simptomi bolesti.....	5
2.4. Teorije nastanka AB.....	6
2.4.1. Tau hipoteza	6
2.4.1.1. Širenje neurofibrilarne degeneracije	9
2.5. Učenje i pamćenje	10
2.6. Povezanost širenja tau patologije s kognitivnim deficitom.....	12
3. MATERIJALI I METODE	14
3.1. MATERIJALI	14
3.1.1. Životinje	14
3.1.2. Kemikalije.....	14
3.1.3. Aparatura i pribor	14
3.2. METODE RADA.....	15
3.2.1. Test otvorenog prostora.....	15
3.2.2. Test prepoznavanja novog objekta.....	17
3.2.3. T-labirint test	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	22
4.1. Test otvorenog prostora.....	22
4.2. Test prepoznavanja novog objekta.....	25
4.3. T-labirint test	26
5. ZAKLJUČAK.....	27
6. LITERATURA	28

1. UVOD

Alzheimerova bolest (AB) kronična je neurodegenerativna bolest i najčešći primarni uzrok sindroma demencije (60-70%) (Blennow i sur., 2006). Podatci pokazuju da danas u svijetu od AB boluje 46,8 milijuna ljudi, a u Hrvatskoj 87 tisuća (Pecotić i Perkov, 2007). Mozak kod AB podvrgnut je karakterističnim promjenama. Te promjene su vidljivi plakovi koji se sastoje od amiloid beta (A β) i neurofibrilarni snopići (neurofibrillary tangles, NFT), od hiperfosforiliranog tau proteina (Clavaguera i sur., 2009). Smatra se da širenje tau proteina prati Braak i Braak neuropatološke stadije (Braak i Braak, 1991) što znači da prve promjene kod AB zahvaćaju područja mozga transentorinalnog korteksa i moždanog debla te se dalje šire u predvidljivom smjeru (Šimić i sur., 2017; Brundin i sur., 2010). Transsinaptičko širenje tau proteina povezuje se sa širenjem priona u prionskim bolestima (Walker i Jucker, 2015; Clavaguera i sur., 2009). Prioni su male proteinske čestice koje uzrokuju neizlječive degenerativne neurološke procese, odnosno prionske bolesti. Budući da se promijenjeni tau protein ponaša na sličan način, modeli koji se koriste u istraživanjima prionskih bolesti služili su za izradu modela širenja tau proteina (Walsh i sur., 2016). Na temelju tih modela dokazano je da se međusobno spajanje tau proteina u agregate može potaknuti ili ubrzati izvanstaničnim dodatkom određenog oblika tau proteina. Prema varijantama tau proteina pokazano je širenje monomernog, oligomernog i fibrilarnog tau oblika. Svaku varijantu proteina je potrebno povezati s toksičnosti i sa simptomima bolesti kod ljudi (Walsh i sur., 2016; Lasagna-Reeves i sur., 2012). Zbog toga istraživanja nisu fokusirana samo na završni stupanj patologije tau agregata već i na usporedbu rezultata s testovima ponašanja (Viola i sur., 2015). Analiza i sprječavanje širenja tau patologije moglo bi poslužiti u razvoju lijekova koji sprječavaju nastanak AB (Watts i sur., 2014). Stoga je cilj ovog rada bio ispitati promjene u kognitivnim sposobnostima životinja u ovisnosti o varijanti proteina i vremenu nakon intracerebralne primjene.

2. TEORIJSKI DIO

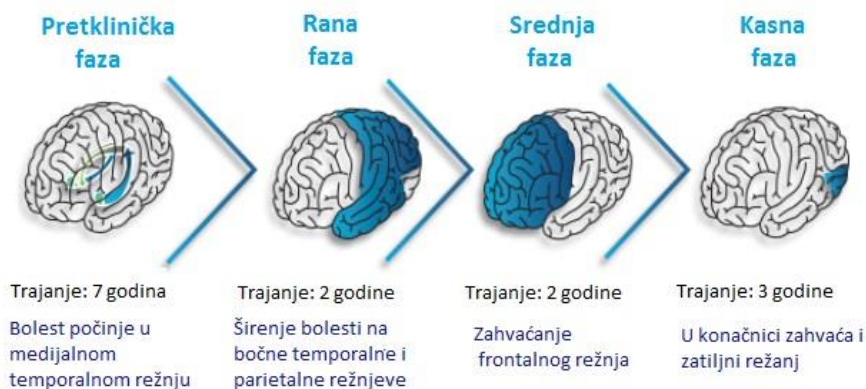
2.1. Alzheimerova bolest

Alzheimerova bolest (AB) je teška, neizlječiva, degenerativna bolest mozga koja može uzrokovati smrt. U svijetu je 2010. godine više od 35 milijuna ljudi bolovalo od AB (Wimo i Prince, 2010), a do 2040. godine broj bi mogao porasti do 81 milijun zbog produženja životnog vijeka čovjeka. Procjenjuje se da u Republici Hrvatskoj trenutno od AB boluje oko 86 tisuća ljudi (Ferri i sur., 2005). Njemački psihijatar dr. Alois Alzheimer je 1906. godine prvi opisao bolest u 51-godišnje pacijentice Auguste Deter proučavanjem histoloških preparata moždanog tkiva. Prvi simptomi u navedene bolesnice uključivali su gubitak pamćenja, probleme s govorom, poteškoće u pisanju, čitanju, promjene osobina ličnosti te nisu odgovarali niti jednom do tada poznatom psihijatrijskom poremećaju (Graeber i sur., 1997). Histopatološkim istraživanjima dokazano je da se senilni plakovi (SP) i neurofibrilarni snopići (NFS), koje je prvi uočio i opisao Alzheimer, nalaze u mozgovima osoba s AB i onih sa senilnom demencijom, no te patološke nakupine izraženije su u AB ranog početka (Blennow i sur., 1991).

Postoje dva temeljna oblika AB, a to su sporadična i nasljedna (obiteljska) AB. Obiteljska AB ima snažnu genetičku podlogu te čini sveukupno manje od 1% svih slučajeva. Sporadična AB se još naziva i AB s kasnim početkom. Najvažniji rizični čimbenik za nastanak sporadične AB je dob, a ostali važni su spol (žene češće obolijevaju) (Altmann i sur., 2014) i genetička podloga (Alzheimer's Association, 2013; Strittmatter, 2012).

2.2. Faze Alzheimerove bolesti

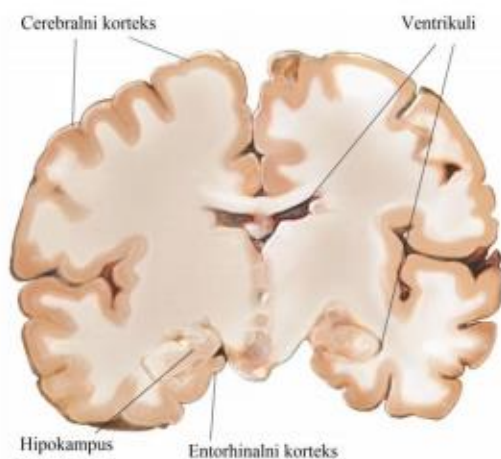
Progresivan tijek i simptomi AB podijeljeni su na pretkliničku fazu AB, ranu fazu AB, srednju fazu AB i kasnu fazu AB (Slika 1).



Slika 1. Prikaz dijelova mozga koje zahvaća Alzheimerova bolest po fazama te njihovo trajanje. Preuzeto i prilagođeno prema Escenta diagnostics (2017)

❖ Pretklinička faza AB

Pretklinička faza je početak AB koji je neprimjetan. Budući da razdoblje od nastanka prvih patoloških promjena u mozgu do pojave kliničkih simptoma može biti i do 10 godina, otežana je rana dijagnoza i liječenje bolesti te tijekom ove faze prvi simptomi nisu vidljivi. U mozgu dolazi do patoloških promjena tako da se izvan stanica formiraju senilni plakovi, a unutar dolazi do hiperfosforilacije proteina tau i stvaranja neurofibrilarnih snopića. Pojava prvih simptoma te brzina kojom napreduje bolest razlikuje se kod osoba s nasljednim tipom AB i osoba sa sporadičnim tipom AB (Sutton, 2011) (Slika 2).



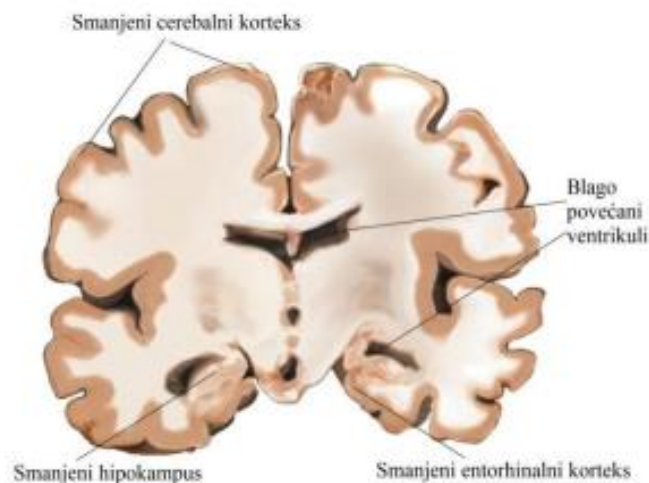
Slika 2. Presjek mozga u pretkliničkoj fazi Alzheimerove bolesti. Preuzeto i prilagođeno prema Mukhopadhyay (2013)

❖ Rana faza AB

Prvi znak koji upućuje na AB u ranoj fazi je blagi kognitivni poremećaj (od eng. mild cognitive impairment - MCI). Problem je što se zaboravljivost često javlja u osoba starije dobi tako da MCI ne mora nužno ukazivati na pojavu AB. Također su prisutne promjene u govoru, kretanju, snalaženju u prostoru i promjene u ponašanju (Sutton, 2011) (Slika 3).

❖ Srednja faza AB

U ovoj fazi AB dolazi do pogoršavanja sposobnosti pamćenja zbog čega se javljaju teškoće u obavljanju svakodnevnih poslova. Oštećenja zahvaćaju dijelove mozga koji kontroliraju razmišljanje, govor i obradu osjetilnih informacija. Zbog toga dolazi do gubitka orijentacije u vremenu i prostoru, siromašnijeg govora i slabijeg razumijevanja (Sutton, 2011) (Slika 3). Prisutne su i promjene raspoloženja i osobnosti, no emocije su još uvijek dobro očuvane.

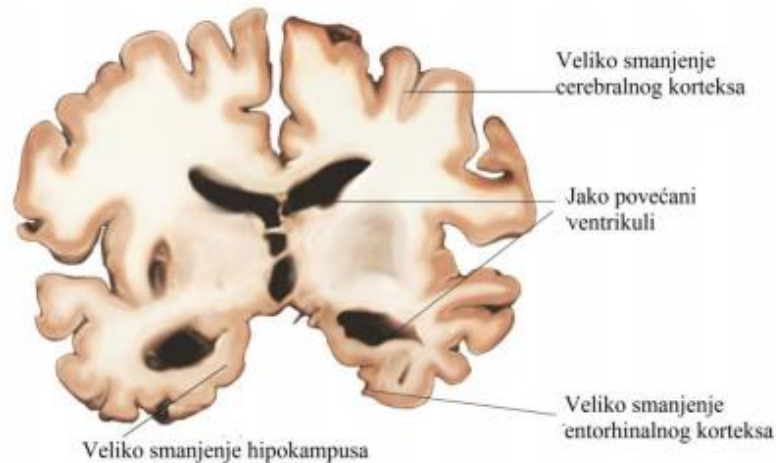


Slika 3. Presjek mozga u ranoj do srednjoj fazi Alzheimerove bolesti.

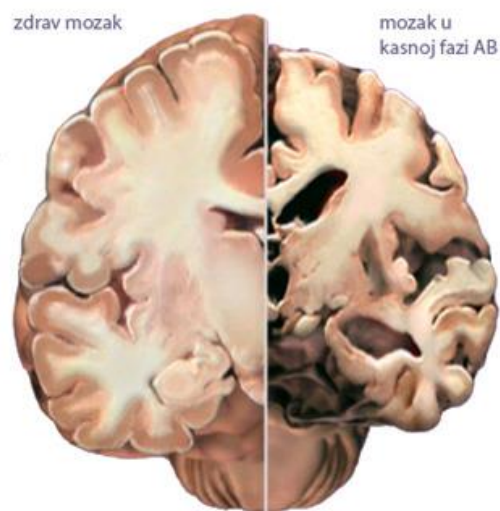
Preuzeto i prilagođeno prema Mukhopadhyay (2013)

❖ Kasna faza AB

U kasnoj fazi dolazi do teškog gubitka svih kognitivnih sposobnosti. Ograničena je sposobnost svakodnevnog funkcioniranja tako da osobe postaju ovisne o drugima. Govor ulazi u fazu eholalije, stereotipnog besmislenog ponavljanja riječi ili fraza druge osobe. Morfološki dolazi do proširenja plakova i snopića po mozgu te gubitka moždanog tkiva (Sutton, 2011) (Slika 4 i 5).



Slika 4. Presjek mozga u kasnoj fazi Alzheimerove bolesti.
Preuzeto i prilagođeno prema Mukhopadhyay (2013)



Slika 5. Izgled zdravog mozga i mozga u kasnoj fazi Alzheimerove bolesti.
Preuzeto i prilagođeno prema Mimici (2019)

2.3. Simptomi bolesti

Glavni simptom koji se povezuje s AB je postepen poremećaj pamćenja nedavnih događaja. Sjögren je 1950. godine podijelio bolest u tri stadija (Sjögren, 1950). Prvi stadij je karakteriziran gubitkom epizodičkog pamćenja. Epizodičko pamćenje se odnosi na sjećanja na događaje koje je sama osoba doživjela. Pored kognitivnih javljaju se i nekognitivni simptomi kao što su promjene raspoloženja, smetnje apetita, poremećaj ciklusa budnosti i spavanja, simptomi depresivnosti te vremenska i prostorna dezorijentacija (Šimić i sur., 2009). Također je prisutno agresivno ponašanje (verbalno, a zatim i fizičko) te halucinacije. U drugom stadiju dolazi do značajnijeg oštećenja

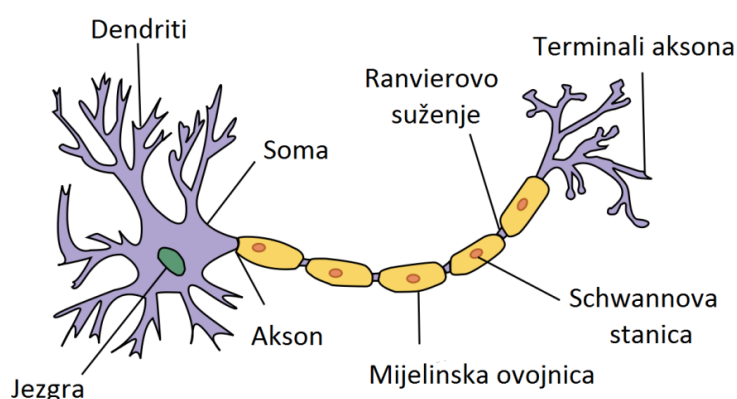
govora i percepcije te poteškoća u prepoznavanju drugih osoba, čak i članova vlastite obitelji. Naposljetku, u trećem stadiju bolesnici u potpunosti postaju ovisni o skrbnicima, postaju komatozni te najčešće uslijed nepokretnosti i poremećaja hranjenja umiru (Sjögren, 1950).

2.4. Teorije nastanka AB

Neuropatološke promjene u AB nastaju kao posljedica različitih patoloških mehanizama i obzirom na te mehanizme, razvilo se nekoliko hipoteza koje objašnjavaju nastanak AB. Neurovaskularna disfunkcija, upalni procesi i oksidativni stres samo su neki od njih, no svakako najbitniji su agregacija amiloid- β peptida ($A\beta$) i njegovo odlaganje u obliku plakova te hiperfosforilacija proteina tau koja dovodi do nastanka stvaranja neurofibrilarnih snopića. Budući smo ovaj rad posvetili istraživanju tau proteina, u nastavku ćemo govoriti samo o tau hipotezi.

2.4.1. Tau hipoteza

Živčani sustav sastoji se od 6 milijardi međusobno povezanih neurona. Neuroni (ili živčane stanice) su glavni tip stanica koje tvore mozak. Građeni su od dendrita (kraći produžetci koji s osjetnih organa ili drugih živčanih stanica dovode živčano uzbuđenje na tijelo stanice), tijela stanice i aksona (duži produžetak neurona) (Kandel i sur., 1981) (Slika 6).

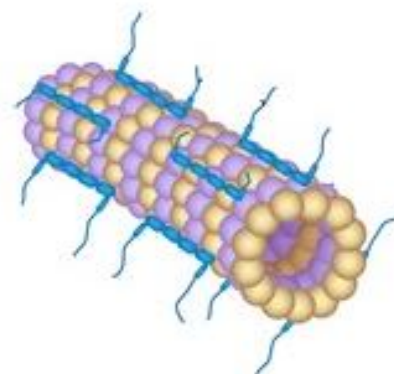


Slika 6. Živčana stanica (neuron).

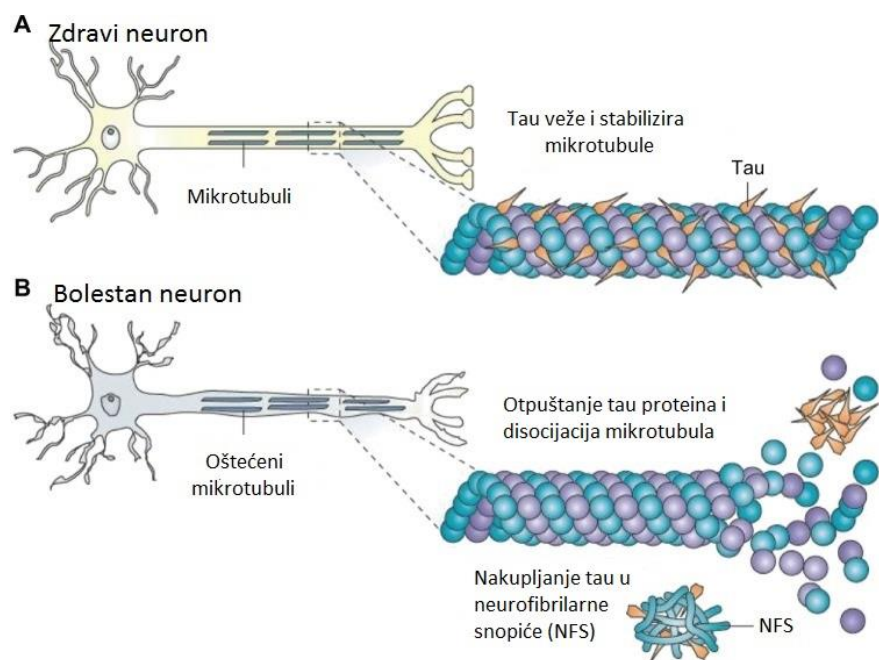
Preuzeto i prilagođeno prema Flagg (2017)

Protein tau primarno se nalazi u aksonima neurona, a u manjoj mjeri u dendritima i glija stanicama. Osigurava povezanost i stabilnost mikrotubula (MT). Jedna od glavnih funkcija mikrotubula je reguliranje cjelokupnog transporta duž aksona.

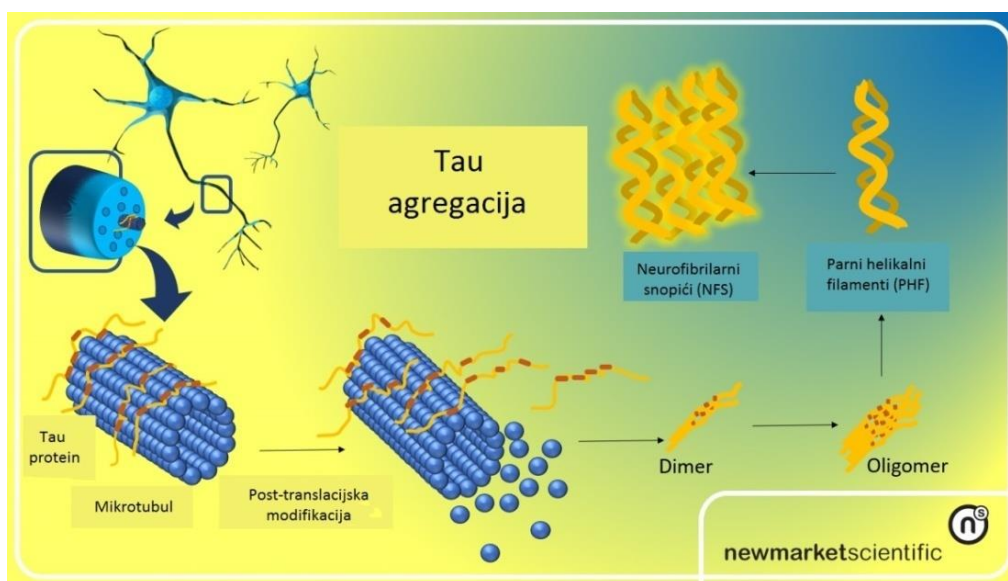
Protein je građen od dviju domena. Projekcijska domena veže se na neurofilamente ili druge mikrotubule dok druga domena kopolimerizira s tubulinom u MT dajući mu pritom stabilnost (Slika 7). Biološka aktivnost tau proteina kontrolirana je fosforilacijom, odnosno ravnotežom kinaza i fosfataza. Ukoliko dođe do hiperfosforilacije tau proteina (više od 8 do 12 mola fosfata po molu proteina umjesto 2-3), mijenja se njegova konformacija što dovodi do njegovog odvajanja od mikrotubula, odnosno razgradnje mikrotubula (Slika 8). Posljedica toga je poremećeni transport unutar aksona, smetnja u sinaptičkoj funkciji neurona te smrt živčanih stanica (Buee i sur., 2000; Iqbal i sur., 2005). Hiperfosforilirani protein tau vremenom se nakuplja u obliku ravnih, a zatim i sparenih uzvojitih filamenata (od eng. paired helical filament – PHF) (Johnson i sur., 2004) te tako u citoplazmi neurona tvori neurofibrilarne snopiće (NFS) (Slika 9). Isto tako abnormalno hiperfosforilirani protein ne nalazi se samo u NFS nego i u nefibriliranom obliku u citosolu moždanog tkiva nakon raspada (smrti) neurona. On kao takav ne stupa u interakciju s mikrotubulom, već mijenja konformaciju drugih, normalnih tau proteina uzrokujući njihovo odvajanje od mikrotubula (Alonso i sur., 1994). Povezivanje abnormalno hiperfosforiliranog tau proteina s normalnim također dovodi do stvaranja snopića. U osoba oboljelih od AB razine proteina tau u citosolu veće su 4 do 8 puta u usporedbi sa zdravim osobama iste dobne i spolne grupe.



Slika 7. Domene tau proteina: projekcijska domena i domena koja povezuje mikrotubul.
Preuzeto i prilagođeno prema Newman (2014)



Slika 8. Razgradnja mikrotubula uslijed odvajanja tau proteina.
 Preuzeto i prilagođeno prema Brunden i sur. (2009)



Slika 9. Prikaz Tau agregacije.
 Preuzeto i prilagođeno prema Dale (2018)

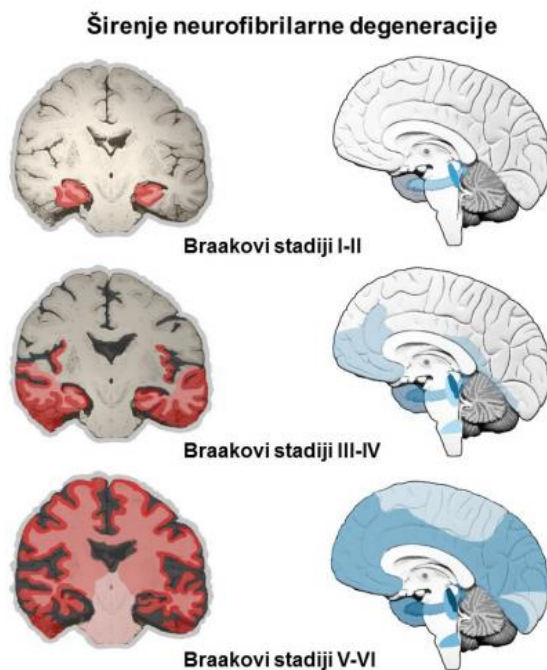
2.4.1.1. Širenje neurofibrilarne degeneracije

Prema Braak i Braak (1991) širenje neurofibrilarne degeneracije prati karakterističan uzorak, odnosno karakterističnu shemu koja obuhvaća šest stadija (Slika 10 i Tablica 1).

Tablica 1. Stadiji neurofibrilarne degeneracije prema Braak i Braak (1991)

STADIJI	
I.	dolazi do nakupljanja neurofibrilarnih snopića u transentorinalnoj i entorinalnoj moždanoj kori
II.	neurodegeneracija se širi na hipokampalnu formaciju
III. i IV.	zahvaćeni su sljepoočni, čeon i tjemeni korteks
V. i VI.	zahvaćena je primarna osjetna i motorička moždana kora

Završni stadiji AB lako se prepoznaju na neuropatološkom pregledu (Braak i Braak, 1991).



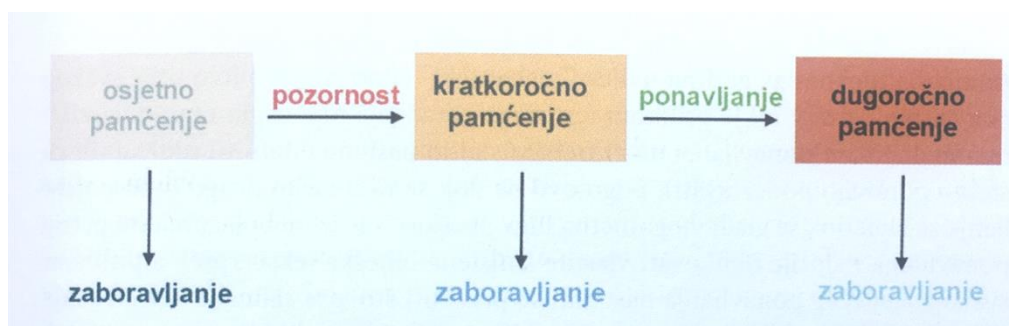
Slika 10. Širenje neurofibrilarne degeneracije.
Preuzeto i prilagođeno prema Braak i Braak (1991)

2.5. Učenje i pamćenje

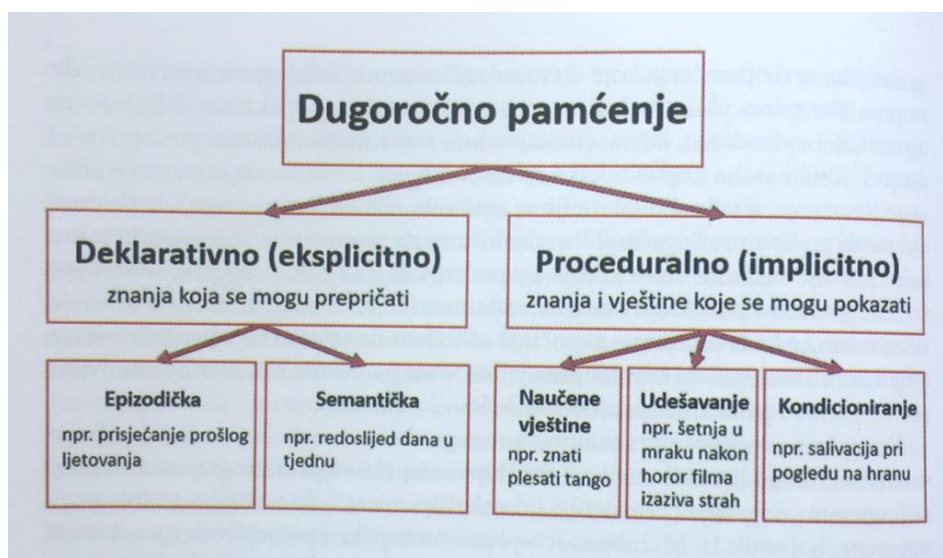
Učenje je proces usvajanja informacija, a pamćenje sposobnost njihova pohranjivanja i prisjećanja, a i jedno i drugo imaju ključnu ulogu u svim kognitivnim sposobnostima. Postoje tri bitne odlike učenja i pamćenja, a one se odnose na stadije učenja (upamćivanje, pohranjivanje i prisjećanje), trajanje pamćenja (osjetno, kratkoročno/radno i dugoročno) i vrste pamćenja (deklarativno i nedeklarativno). Informacije koje dolaze iz okoline registriraju naša osjetila te se one pohranjuju u osjetno (neposredno, senzorno) pamćenje. No, ono je vrlo kratkog trajanja (svega sekundu), stoga se informacije iz osjetnog pamćenja dalje prenose u kratkoročno. Informacije u kratkoročnom pamćenju koristit će se za obavljanje zadataka ili donošenje odluka u kratkom roku (20-30 sekundi), a nakon toga će biti zaboravljene (npr. pamćenje telefonskog broja koji nam je netko rekao sve dok ga ne nazovemo ili zapišemo). Nadalje, ako se neka informacija želi pohraniti za dulje vrijeme, mora biti podvrgnuta obradi. Veći broj ponavljanja ili više susreta s tom informacijom, namjerno ili slučajno, može ju pospremiti u treće 'spremište' informacija, odnosno dugoročno pamćenje. Ovdje se informacije zadržavaju kroz dugi period, relativno trajno. Ako su nam potrebne, do njih dolazimo procesom pronalaženja i prebacivanja u kratkoročno pamćenje pa nam one opet mogu poslužiti u datom trenutku (Šimić i sur., 2019) (Slika 11).

Kada govorimo o vrstama pamćenja, treba napomenuti kako postoji velik broj različitih vrsta učenja i pamćenja te da različiti dijelovi središnjeg živčanog sustava posreduju različite vrste pamćenja. Zbog toga dugoročno pamćenje možemo podijeliti na dvije vrste i više podvrsta (Slika 12). Tako razlikujemo vrstu pamćenja koja sadrži svjesne činjenice i događaje (deklarativno pamćenje) od druge vrste koja se ne temelji na svjesnom doživljavanju (nedeklarativno). Deklarativno pamćenje je svjesno pamćenje činjenica, odnosno obuhvaća informacije koje stječemo procesom učenja. Oslanja se na kognitivne procese prosuđivanja, usporedbe i zaključivanja, a pod djelovanjem je hipokampusu i struktura međumozga. Dijeli se na epizodičko (autobiografsko) i semantičko (značenjsko) pamćenje. Epizodičko pamćenje obuhvaća sjećanje na događaje koje je osoba doživjela (npr. jučer sam za ručak jela...), dok se semantičko odnosi na opće znanje, neovisno o događajima u životu osobe (npr. Shakespeare je napisao Hamleta). Sličnosti ove dvije vrste pamćenja su te da se osoba svjesno i namjerno dosjeća određene informacije. Nadalje, većina procesa učenja i pamćenja kod ljudi i životinja pripada nedeklarativnom pamćenju. Nedeklarativno pamćenje je

nesvjesno pamćenje izvođenja motoričkih zadataka. Iskazuje se poboljšanjem izvođenjem (a ne prisjećanjem) neke motoričke vještine nakon brojnih ponavljanja (npr. hodanje, pričanje, pisanje, vožnja bicla, sport...). Ono ne ovisi o svijesti, pozornosti niti o stupnju znanja. Dijeli se na motoričke, percepcijske i kognitivne vještine i navike, razinu adaptacije, udešavanje te asocijativno i neasocijativno ponašanje. Važno je napomenuti kako su ti oblici nedeklarativnog pamćenja očuvani kod bolesnika s amnezijom upravo zbog toga što takvo pamćenje ne ovisi o strukturama medijalnog dijela sljepoočnog režnja (Šimić i sur.,2019).



Slika 11. Klasični model triju skladišta pamćenja (Šimić, 2019).

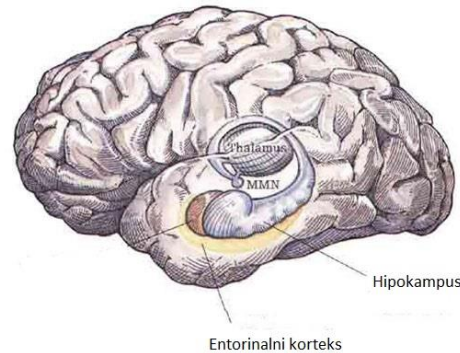


Slika 12. Glavne vrste i podvrste dugoročnog pamćenja (Šimić, 2019).

Ako se vratimo na kratkoročno pamćenje, potrebno je spomenuti posebnu vrstu kratkoročnog pamćenja koje se naziva radno pamćenje. Ono se može definirati kao sposobnost privremenog zadržavanja i baratanja informacijama kojima ćemo se služiti radi postizanja nekog cilja.

2.5.1. Uloga hipokampusa u procesu pamćenja

Najistraživaniji dio središnjeg živčanog sustava zasigurno je hipokampus zbog svoje ključne uloge u stvaranju epizodičkih sjećanja i pretvorbe kratkoročnih u dugoročna sjećanja. Hipokampus je bilateralna struktura medijalnog dijela sljepoočnog režnja (Slika 13).



Slika 13. Prikaz hipokampusa.

Preuzeto i prilagođeno s foruma Biyojidersi (2018)

Proučavanje hipokampusa za istraživanje degeneracije središnjeg živčanog sustava, kao Alzheimerova bolest, ima veliku važnost. Razlog tomu je što tijekom AB dolazi do propadanja živčanih stanica entorinalne moždane kore što znači prekidanje veza prema hipokampusu. Posljedica toga su teški poremećaji učenja i pamćenja u bolesnika (Šimić i sur., 2019).

2.6. Povezanost širenja tau patologije s kognitivnim deficitom

Potrebno je ispitati na koji je način određen oblik tau proteina (oligomer, fibril) povezan s promjenama u kognitivnim sposobnostima, odnosno mora se povezati progresivan razvoj histoloških lezija sa stvarnim funkcionalnim posljedicama (Lv Z-Y i sur., 2017). Razne studije u transgeničnim miševima pokazuju da prisutnost neurofibrilarnih snopića u mozgu ne mora utjecati na neuralnu funkciju i toksičnost (kao što pokazuje nedavno istraživanje na mišjem modelu (Wegmann i sur., 2015)). Pretpostavlja se da su neurofibrilarni snopići lezije koje djeluju samo na citoarhitektoniku stanice, dok su topljivi agregati tj. oligomeri toksični te uzrokuju neuralnu disfunkciju i gubitak pamćenja. Sve veći broj istraživanja potvrđuju da je topljivi tau oligomer neurotoksičan (Spires i sur., 2006; Guo i sur., 2014; Chai i sur., 2012).

Većinom korišteni životinjski modeli su transgenični i oponašaju nasljednu Alzheimerovu bolest (Stancu i sur., 2015). Iz tog razloga postoji potreba za istraživanjem

koje bi razjasnilo nastanak sporadične AB korištenjem modela na netransgeničnim životinjama. Jedan od netransgeničnih modela na kojemu se provodi ovo istraživanje razvijen je stereotaksijskom primjenom tau proteina u entorinalnu moždanu koru štakora (Slike 14 i 15).



Slika 14. Stereotaksijski uređaj (David Kopf instruments, 2019).



Slika 15. Primjer stereotaksijske operacije (vlastita fotografija).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Životinje

Istraživanje se provodi na 60 laboratorijskih štakora soja Wistar starosti 3-4 mjeseca. Životinje su bile podijeljene u dvije skupine po 10 jedinki ovisno o obliku tau proteina koje su primile (tau oligomer, tau fibril), dok je treća, kontrolna, primila fosfatni pufer. Životinje su držane u nastambama s 12/12 h ciklusom izmjene svjetla i mraka, sobnom temperaturom 21-25°C i vlagom u rasponu 40-70%. Nakon 3 i 6 mjeseci testirane su testovima ponašanja.

Tablica 2. Plan izvedbe testova ponašanja

Testovi ponašanja	Vremenske točke	Broj ispitanih životinja po skupinama		
		fosfatni pufer	tau oligomeri	tau fibrili
Test otvorenog prostora	3 mjeseca	n=10	n=10	n=10
Test prepoznavanja novog objekta		n=10	n=10	n=10
T-labirint test		n=10	n=10	n=10
Test otvorenog prostora	6 mjeseci	n=10	n=10	n=10
Test prepoznavanja novog objekta		n=10	n=10	n=10
T-labirint test		n=10	n=10	n=10

3.1.2. Kemikalije

- 70% izopropil alkohol

3.1.3. Aparatura i pribor

- Labirint otvoreno polje za testove ponašanja - četvrtasta kutija od pleksiglasa veličine 90 x 90 x 70cm s označenim poljima na dnu (36 polja dimenzija 14 x 14cm). Iznad kutije postavlja se nadzorna kamera spojena s laptopom, odnosno programom za analizu snimaka. Intenzitet svjetlost iznosio je 70-80 lux.

- T-labirint za test ponašanja - labirint oblika slova T napravljen od pleksiglasa crne boje debljine 3mm. Širina krakova iznosi 10cm, a visina 20cm. Duljina dužeg kraka je 60cm, dok je kraći 30cm. Podloga labirinta je također crne boje.

3.2. METODE RADA

Nakon intracerebralne primjene tau proteina u 2 vremenske točke ispitat će se promjene u učenju, pamćenju i ponašanju korištenjem testova ponašanja: test otvorenog prostora, test prepoznavanja novog objekta i T-labirint test.

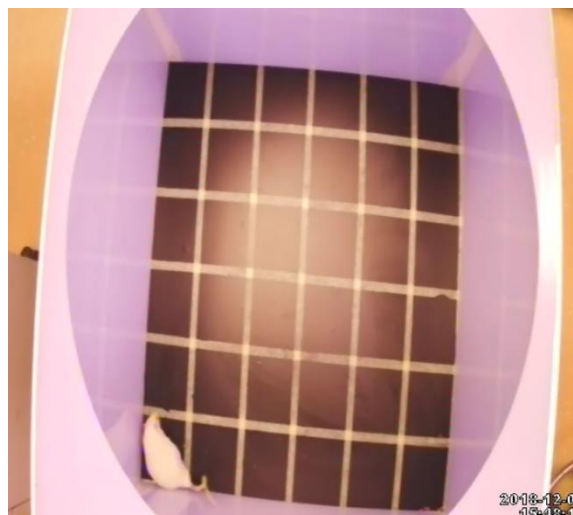
3.2.1. Test otvorenog prostora

Calvin Hall zaslužan je za prvo uvođenje testa otvorenog prostora (Hall, 1934). Test otvorenog prostora (eng. Open field test - OFT) jednostavan je test i aparatura koja se koristi za procjenu spontane istraživačke aktivnosti i ponašanja povezanih s anksioznošću kod glodavaca. OFT nije samo mjera motoričke aktivnosti, već uključuje i druge čimbenike kao što su istraživački nagon (radoznalost) i strah (ili tjeskoba), odnosno tigmotaksija (Walsh i Cummins, 1976). Tigmotaksija je specifično ponašanje životinja da se drže blizu zidova kada istražuju otvoreni prostor, a to se često može vidjeti kod štakora ili miševa. Smatra se da je takvo ponašanje izbjegavanja osvijetljenih otvorenih prostora evolucijsko adaptivno ponašanje. Tendencija glodavaca da se drže blizu zidova postepeno opada tijekom prvih minuta istraživanja. Open field test koristi taj strah kako bi procijenio različite aspekte ponašanja povezanih s anksioznošću (Walz i sur., 2016). Osim opće aktivnosti, odnosno ukupne prijedene udaljenosti, također se analizira i kvaliteta aktivnosti. To uključuje vrijeme provedeno duž zidova (tigmotaksija) u usporedbi s vremenom provedenim u centru, broj ulazaka u centar, podizanje na stražnje noge, itd. (Tablica 2) (Stanford i sur., 2007; Rodgers i sur., 2007; Blizard i sur., 2007). Veća je vjerojatnost da će životinje sa smanjenom razinom anksioznosti istražiti centar otvorene arene od životinja s visokom razinom anksioznosti koje će pokazati smanjenu kretnju i istraživanje s preferencijom da ostanu blizu zidova. Postoje mnoge druge manje uobičajene mjere ispitivanja, uključujući vrijeme provedeno bez kretanja, njuškanje, glasanje i cvokotanje (škripanje) zubima (Walsh i Cummins, 1976).

Tablica 3. Popis parametara mjerenih testom otvorenog prostora

Parametri
- Ukupna prijeđenost (stvarna ili relativna udaljenost) (broj kvadratića) - Podizanje na stražnje noge (vertikalna aktivnost) (broj podizanja) - Ulasci u centralnu zonu (broj ulazaka) - Vrijeme provedeno u centralnoj zoni (s) - Vrijeme provedeno u perifernoj zoni (s) - Vrijeme do prvog podizanja (s)

Aparatura se sastojala od crne kutije od pleksiglasa (90 × 90cm) okružene zidovima visine 70cm. Središnje područje je proizvoljno definirano kao kvadrat od 56 × 56cm te je iznad kutije postavljena nadzorna kamera za video-praćenje (Slika 16). Intenzitet svjetlosti u središtu OF-a bio je 70–80 lux. Ulazak u središnji prostor računao se tek kada je štakor ušao u njega sa sve četiri šape. Svaki štakor je stavljen u lijevi donji kut i njegovo ponašanje se bilježilo tijekom 5 minuta. Zabilježene su sljedeće zavisne varijable: ukupno prijeđen put (mjerenu kao broj prijeđenih kvadratića), broj podizanja na stražnje noge, broj ulazaka u središnje (centralno) područje i vrijeme provedeno u središnjem području, odnosno u periferiji.



Slika 16. Snimak Testa otvorenog prostora (vlastita fotografija)

3.2.2. Test prepoznavanja novog objekta

Test prepoznavanja novog objekta (eng. Novel object recognition test- NORT) procjenjuje pamćenje prethodno istraženog objekta (poznatog) u usporedbi s novim objektom (nepoznatim) u inače poznatom okruženju (Ennaceur i Delacour, 1988). Danas se test široko primjenjuje na proučavanju neuronanatomskih i molekularnih mehanizama koji uključuju proces pamćenja, oblik deklarativne memorije (Bizot i sur., 2005).

Kapacitet za prepoznavanje je posebno dobro dokumentiran kod miševa, štakora i majmuna, kao i kod ljudi. Prepoznavanje objekta je sposobnost percipiranja fizičkih svojstava nekog objekta (kao što su oblik, boja i tekstura), razumijevanje njegove uporabe, prethodnog iskustva s objektom i načina na koji se odnosi na druge (Enns, 2004). Kada subjekt vidi objekt, on zna je li objekt viđen u prošlosti, to se zove memorija prepoznavanja. Općenito je dokazano da se spontana istraživačka aktivnost u štakora može koristiti za mjeru memorijske funkcije (Hirshman i Master, 1997).

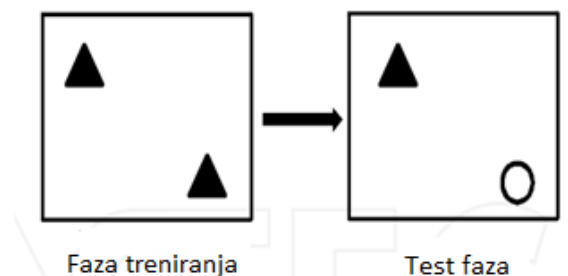
Glavne prednosti ovog testa su da svaka životinja može biti testirana više puta s novim podražajima u istoj sesiji dopuštajući tako usporedbe između subjekata u različitim uvjetima. Isto tako test ne zahtijeva produženu obuku životinja, vanjsku motivaciju, nagradu ili kaznu, a zadatak se može završiti u relativno kratkom vremenskom razdoblju. Predmeti podražaja moraju biti različite boje, teksture i oblika, a mogu biti od stakla, porculana ili plastike kao što su žarulje, šalice, šalice za kavu i slane otopine boce. Mi smo koristili plavu pravokutnu plastičnu kutijicu kao prvi, poznati objekt, a crvenu valjkastu metalnu kutijicu kao drugi, novi (Slika 17). Kompleti sastavljeni od tri kopije istog objekta korišteni su za sprečavanje mirisa, a sve kombinacije i lokacija objekata korištene su kako bi se spriječila pristranost zbog preferencije za određeni objekt ili lokaciju. Životinje nisu mogle premjestiti predmete niti se sakriti u ili ispod njih.

NORT je izveden u istoj OF aparaturi 24 h nakon OF testa. Štakori su testirani tijekom dva ispitivanja (probno ispitivanje i zadržavanje; Slika 18) koji su razdvojeni intervalom od 1 h tijekom kojeg su vraćeni u kaveze. U probnom ispitivanju (trajanje: 5 min), svaki je štakor bio suočen s dva identična objekta (zvanim poznati objekti) smještenima u simetričnom položaju te je zabilježeno vrijeme slobodnog pretraživanja svakog objekta. U retencijskom ispitivanju (trajanje: 5 min), jedan od dva poznata objekta zamijenjen je novim objektom te je također zabilježeno vrijeme pretraživanja

svakog od njih. Ako životinja može prepoznati jedan objekt kao novi, obično pokazuje različito ponašanje usmjereno prema tom novom objektu. Ocjenjivanje zadatka uključuje bilježenje vremena provedenog oko novog objekta u odnosu na vrijeme provedeno s poznatim objektom, a izračunavanje "indeksa diskriminacije" temelji se na tim mjerenjima (Haist & Shimanura, 1992; Ennaceur et al , 1997; Donaldson, 1999). Vrijeme istraživanja je izračunato kada je njuška pokazala na objekt na udaljenost od ≤ 2 cm. Izračunati su sljedeći parametri: indeks diskriminacije = omjer $T_n - T_f$ / diskriminacije = $(T_n - T_f) / (T_n + T_f)$ gdje je T_f ukupno vrijeme provedeno u istraživanju poznatog objekta, dok je T_n vrijeme provedeno u istraživanju novog objekta. Analiza dobivenih rezultata upućuje na to da će kontrolne životinje više vremena provesti istražujući novi objekt od poznatog. Nedostatak bilo kakve razlike u istraživanju dvaju objekata tijekom druge faze može se protumačiti kao nedostatak pamćenja.



Slika 17. Snimak Testa prepoznavanja novog objekta (vlastita fotografija).



Slika 18. Dijagram NORT-a. Lijevo (faza treniranja), životinje su izložene s dva identična objekta (A1 i A2). Desno (test faza), životinja je izložena s dva različita

objekta, jedan prethodno istražen u fazi treninga koji je sada poznat (A1) i novi objekt (B), nikad prije viđen. Preuzeto i prilagođeno prema Carlini (2011)

3.2.3. T-labirint test

T-labirint test (eng. T-maze test) može se koristiti na različite načine za procjenu kognitivnih sposobnosti životinje. Zbog svoje jednostavne konstrukcije i uporabe, u kombinaciji sa svojom osjetljivošću, ima gotovo univerzalnu primjenjivost u otkrivanju kognitivne disfunkcije (Deacon i Rawlins, 2006).

Labirint je jednostavnog oblika slova T napravljen od drva obojanog crnom bojom. Duljina dužeg kraka iznosi 60 cm, dok je kraći 30 cm. Širina krakova je 10 cm, a visina 20 cm. Na kraju oba kraka nalazila se posudica u koju se stavljala hrana (Slika 19).



Slika 19. T-labirint (Orchid Scientific, 2019)

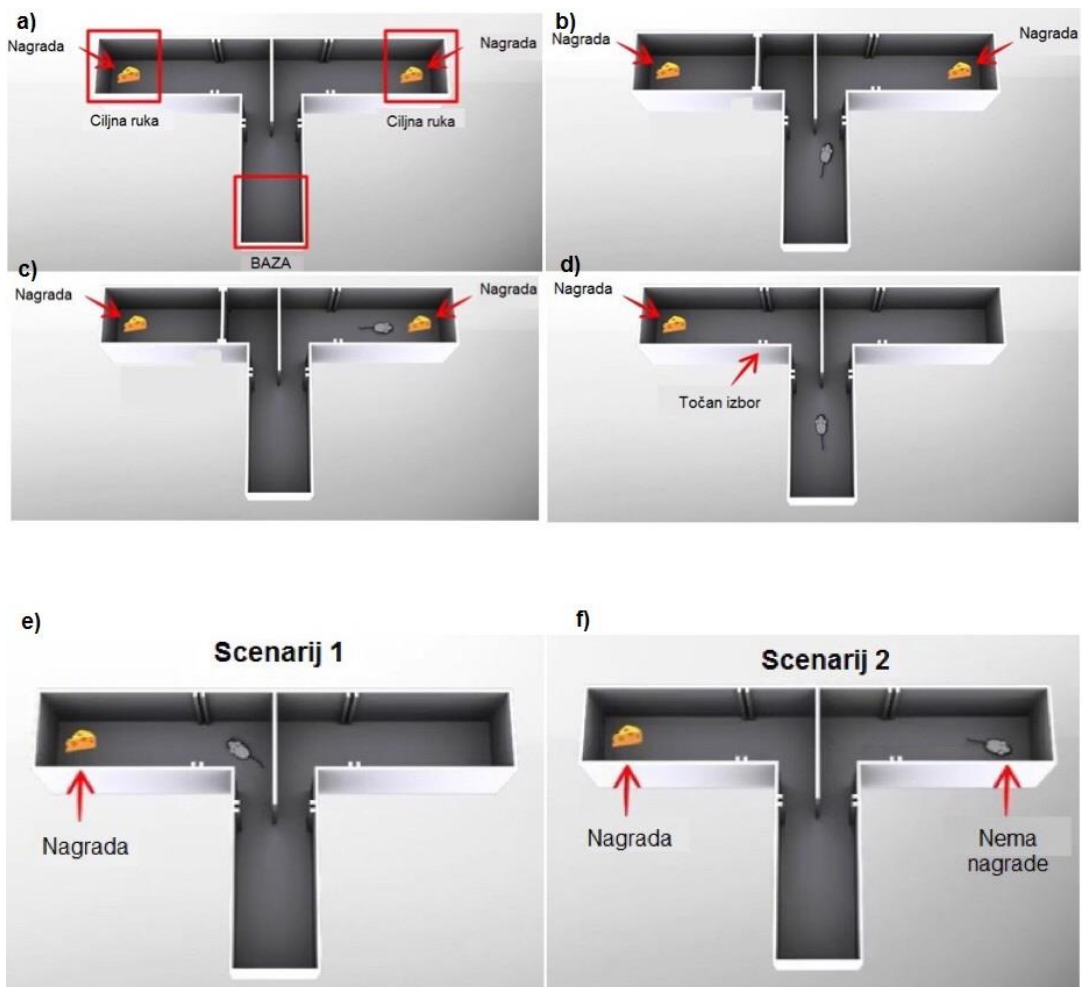
U postupku ispitivanja postoje dvije faze: testna faza (faza prikupljanja informacija gdje životinja nauči u kojem se kraku nalazi hrana) i faza izbora (izbor između prethodno posjećenog kraka i neposjećenog kraka (Crawley 2004, 2007b). Životinje kreću iz baze T-labirinta i dopušteno im je da izaberu jednu od ciljnih ruku (Slika 20a). Ako se dva pokusa daju u brzom slijedu, na drugom pokusu glodavac teži izboru ruke koja nije ranije posjećivana, odražavajući pamćenje prvog izbora. To se naziva "spontana alternacija". Prirodna sklonost štakora i miševa u T-labirintu je izmijeniti izbor cilja. Koriste "radno pamćenje", tj. odgovor na svako suđenje varira ovisno o tome što su prethodno učinili. Izmjena odražava motivaciju životinje da istraži svoje okruženje i pronađe prisutnost resursa kao što su hrana, voda, prijatelji ili sklonište. Životinje ne moraju biti ograničene resursima da bi pokazale takvo

alternativno ponašanje, no ta se tendencija može ojačati tako da životinja postane gladna i nagrađuje se hranom po želji.

Štoviše, izmjenjivanje, bilo nagrađeno ili spontano, izvrsno je u otkrivanju hipokampalne disfunkcije te detekcije delecije GluR-A (GluRI) AMPA receptorske podjedinice. Iako je septalni-hipokampalni sustav presudno uključen u spontanu alternaciju, uključena su i druga područja mozga kao što su mali mozak, talamus i neke druge manje strukture (Deacon i Rawlins, 2006).

Životinje prije testiranja treba naviknuti na nagradu (hranu) kako bi ih navikli na njezin ukus i uklonili hiponeofagiju (inhibicija hranjenja uzrokovana novim okruženjem). Glodavci su oprezni kada jedu nešto novo. Što je bolja navika, potrebno je manje prilagodbe da bi se životinje dobro kretale labirintom. Dobro trenirane životinje će trčati za nagradom. Također životinje bi trebale biti u optimalnom stanju uzbuđenja za testiranje, stoga ih je potrebno ostaviti 5-10 minuta nakon što se odnesu u prostoriju za testiranje. Ako testiramo odmah, biti će više uzbuđeni i neće se moći koncentrirati. Isto tako, ne smije ih se ostaviti sat vremena prije početka jer će inače spavati i griješiti zbog toga što su samo napola budni. Nadalje, životinje se moraju naviknuti na T-labirint. To se najbolje postiže podizanjem svih vrata (na zatvorenom labirintu), punjenjem hrane i stavljanjem cijele skupine životinja iz jednog kaveza (prethodno ograničeni hranom) u labirint na oko 3 min. Naposljetku, životinjama se dopušta da trče iz startne ruke (baze) s jednom rukom blokiranom njezinim vratima. Dati su jednaki brojevi lijevih i desnih staza. Jednom kada se životinje naviknu, može se započeti s pokusom (Deacon i Rawlins, 2006).

Test se izvodio jedan put dnevno, a sastojao se od 10 pokušaja u trajanju od 90 sec. U prvom pokušaju hrana (čokoladne kuglice) se stavila u samo jedan krak pri čemu je drugi krak ostao blokiran (forced trial). Nakon primoranog pokušaja, mijenjala se pozicija hrane te je slijedila inverzija učenja. Obavljen zadatak, odnosno točan odabir se računao kada bi štakor spontano alternirao iz kraka gdje je prethodno bila hrana u suprotan krak i kušao hranu (Slika 20). Bilježio se broj alternacija između krakova. Budući da miris igra glavnu ulogu, labirint mora biti očišćen između ispitivanja (brisanje vlažnim maramicama).



Slika 20. a) Baza T-labirinta, druge dvije ruke se nazivaju ciljne i obično sadrže hranu kao nagradu. **b)** Nagrade se postavljaju u obje ciljne ruke dok je jedna (lijeva) ciljna ruka blokirana vratima, te životinja kreće iz baze T- labirinta. **c)** Životinja trči do ciljne ruke koja nije blokirana (desna) i prima nagradu (testna faza). **d)** Zatim se otvaraju vrata lijeve ciljne ruke i životinja se stavlja na početak T-baze. Životinja sada treba odlučiti koju ruku posjetiti, istražiti (faza izbora) stoga postoje 2 scenarija. **e)** U prvom scenariju životinja odabire točan izbor (ruku koja nije ranije posjećivana) i prima nagradu. **f)** U drugom scenariju životinja odabire pogrešnu ruku (već posjećivanu) i ostaje bez nagrade. Preuzeto i prilagođeno prema He (2018)

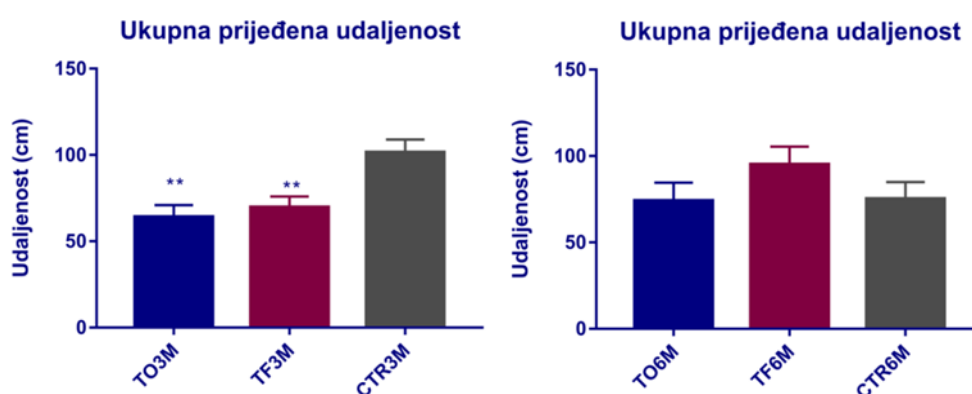
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Test otvorenog prostora

Najvažniji specifični parametar koji se mjeri u testu otvorenog prostora (eng. Open field test) je ukupna prijeđena udaljenost (jedinica mjerenja cm) koja nam pokazuje osnovnu aktivnost životinje. Ukoliko postoji razlika u ukupno prijeđenoj udaljenosti između različitih skupina potreba je daljnja analiza, kao mjerenje ulaska u zone ili vrijeme provedeno u određenoj zoni. Skupina s injiciranim tau oligomerom i tau fibrilom pokazuje smanjenu ukupno prijeđenu udaljenost, odnosno smanjenu aktivnost u odnosu na kontrole za vremensku točku od 3 mjeseca, dok nakon 6 mjeseci nema statističke značajnosti (Slika 21).

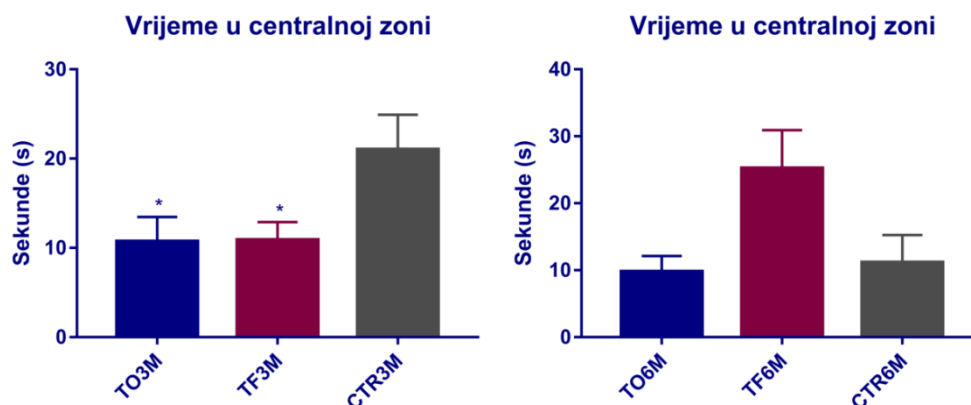
Budući da postoji razlika u ukupno prijeđenoj udaljenosti između tretiranih skupina i kontrola, mjerena je i tigmotaksija, tendencija životinje da se drži uza zid. Stupanj tigmotaksije proporcionalan je s anksioznim ponašanjem životinje. Tigmotaksija se povećava kako se povećava razina anksioznosti. U prvoj vremenskoj točki, 3 mjeseca, postoji statistički značajna razlika u mjerenoj tigmotaksiji između skupina koje su primile fibrile i oligomere te kontrolne skupine (Slika 22). Tretirane skupine provele su manje vremena u centralnoj zoni, odnosno više vremena u perifernoj što sugerira povećanu razinu anksioznosti u odnosu na kontrole. U drugoj vremenskoj točki, 6 mjeseci, nema statistički značajne razlike.

Broj ulazaka u centralnu zonu statistički je važan samo kod skupine tau fibrili u drugoj vremenskoj točki (Slika 23).

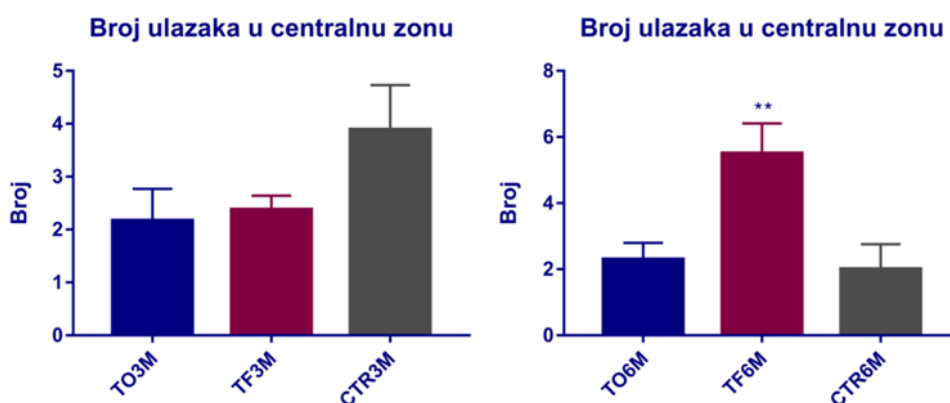


Slika 21. Test otvorenog prostora: ukupna udaljenost. Štakori kojima je injiciran tau oligomer (TO3M/6M) (n = 10), tau fibril (TF3M/6M) (n = 10) te fosfatni pufer (kontrola, CTR3M/6M) (n = 10) podvrgnuti su testu otvorenog prostora. Mjerena je ukupna prijeđena udaljenost (u cm) u ograđenom polju i statistički analizirana kako bi se

prikazale bilo kakve razlike u kretanju. Iz rezultata je vidljivo da su skupine oligomeri i fibrili prošli znatno manju udaljenost od njihovih kontrola u vremenskoj točki od 3 mj.



Slika 22. Test otvorenog prostora: vrijeme provedeno u centralnoj zoni. Štakori kojima je injiciran tau oligomer (TO3M/6M) ($n = 10$), tau fibril (TF3M/6M) ($n = 10$) te fosfatni pufer (kontrola, CTR3M/6M) ($n = 10$) podvrgnuti su testu otvorenog prostora. Mjerilo se vrijeme provedeno u centralnoj zoni i statistički analiziralo kako bi se utvrdile razlike. Vrijeme provedeno u perifernoj zoni mjeri tigmotaksiju i indikativno je ponašanje povezano s anksioznošću. Iz rezultata je vidljivo da su skupine oligomera i fibrila manje vremena proveli u centralnoj zoni što znači da su većinu vremena provodili u periferiji za razliku od kontrola u vremenskoj točki od 3 mjeseca. U vremenskoj točki 6 mjeseci nema statističke značajnosti.

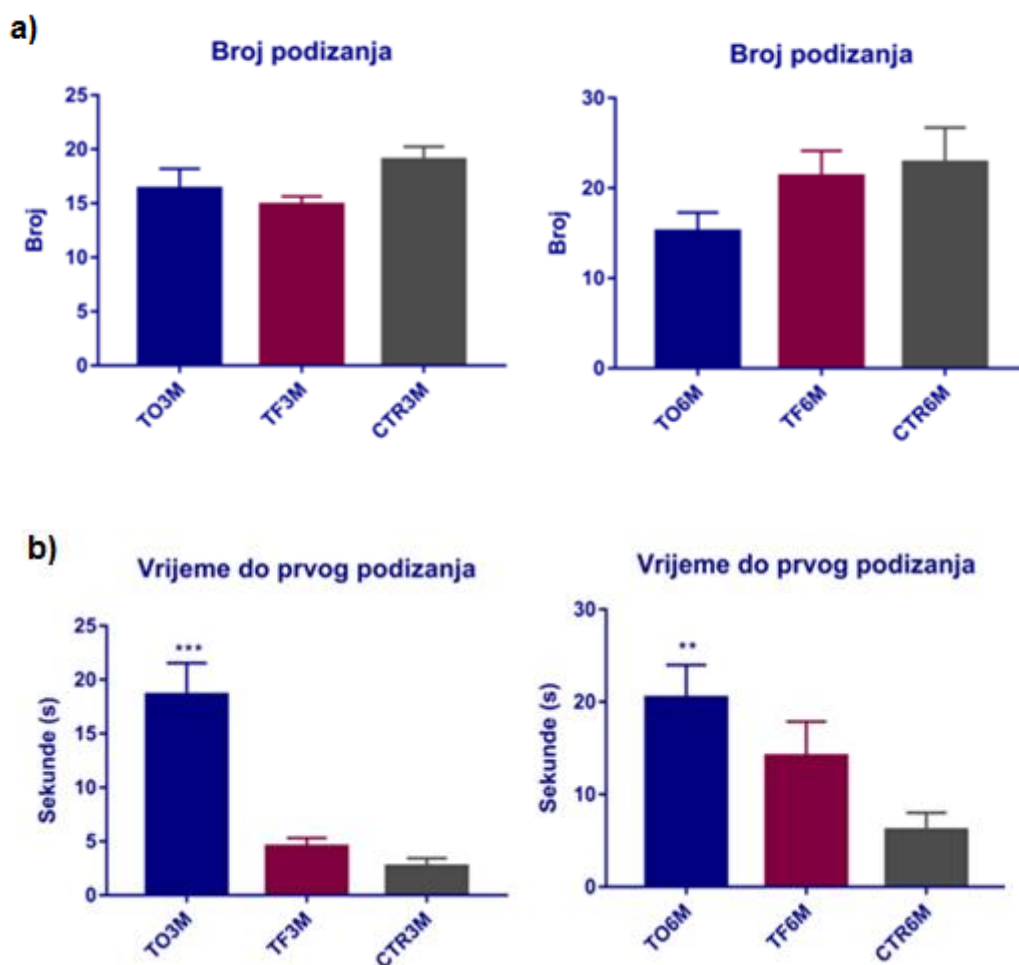


Slika 23. Test otvorenog prostora: broj ulazaka u centralnu zonu. Štakori kojima je injiciran tau oligomer (TO3M/6M) ($n = 10$), tau fibril (TF3M/6M) ($n = 10$) te fosfatni pufer (kontrola, CTR3M/6M) ($n = 10$) podvrgnuti su testu otvorenog prostora te se bilježilo broj ulazaka u centralnu zonu. Iz rezultata je vidljivo da skupine oligomeri i fibrili u vremenskoj točki 3mj pokazuju smanjen broj ulazaka, no ta razlika od kontrole ipak

nije dovoljna da pokaže statističku značajnost. Statistički značajna razlika vidljiva je kod skupine fibrili u vremenskoj točki od 6 mj gdje je pokazano znatno veći broj ulazaka u centar od skupina oligomera i kontrola.

Nadalje, vertikalno podizanje životinje na obje stražnje noge karakterizirano je kao istraživačko ponašanje i uzima se kao mjera anksioznosti u testu otvorenog prostora. Pojedina istraživanja ukazuju da je povećano podizanje na noge povezano s povećanom anksioznošću dok druga istraživanja govore da je smanjeno podizanje povezano s povećanom anksioznošću (Borta i Schwarting, 2005; Costall i sur., 1989). Podizanje bi se moglo koristiti za razlikovanje anksioznog ponašanja od normalnog, istraživačkog. No, rezultati tog parametra pokazuju da su se sve skupine u obje vremenske točke podjednaki broj puta podizale na stražnje noge (Slika 24a).

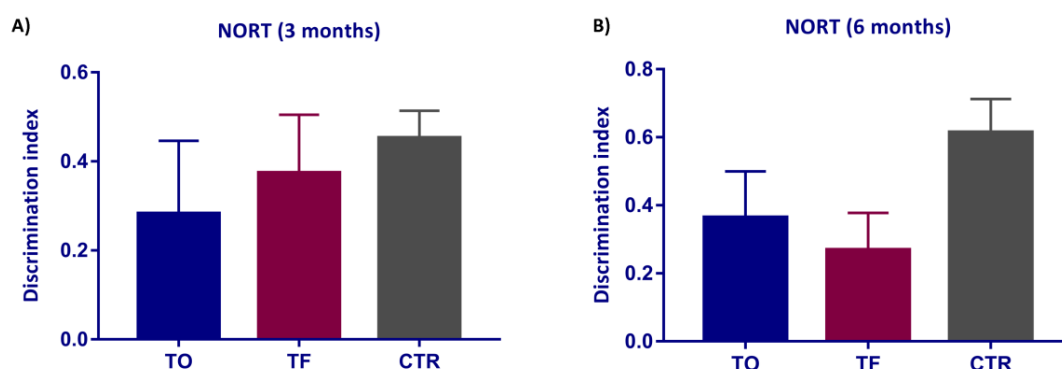
Kada govorimo o vremenu koji prođe do prvog podizanja na stražnje noge, rezultati pokazuju da je skupini oligomera u obje vremenske točke trebalo znatno dulje vrijeme od skupine fibrili i kontrola (Slika 24b).



Slika 24. Test otvorenog prostora: broj podizanja i vrijeme do prvog podizanja. Štakori kojima je injiciran tau oligomer (TO3M/6M) (n = 10), tau fibril (TF3M/6M) (n = 10) te fosfatni pufer (kontrola, CTR3M/6M) (n = 10) podvrgnuti su testu otvorenog prostora te se bilježilo vrijeme do prvog podizanja te ukupan broj podizanja na stražnje noge. Rezultati pokazuju da je skupini oligomera trebalo znatno dulje vremena da se podignu na stražnje noge od ostale dvije skupine u obje vremenske točke, dok kod broj podizanja nema statističke razlike.

4.2. Test prepoznavanja novog objekta

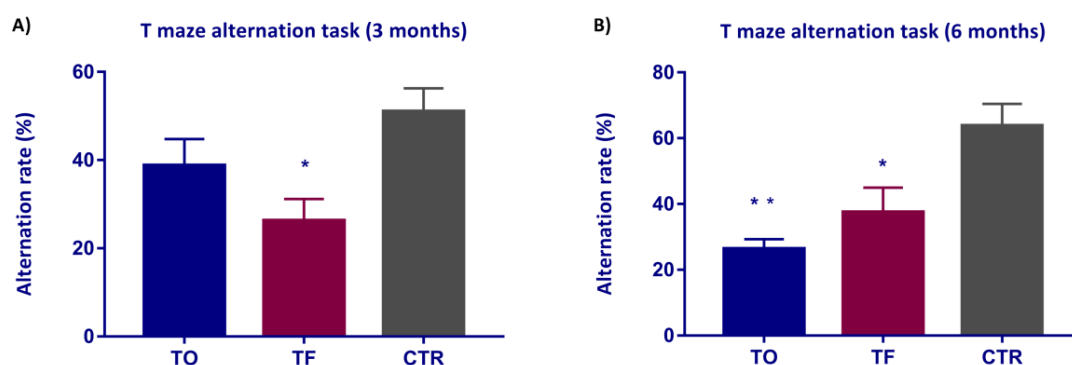
Rezultati testa prepoznavanja novog objekta (eng. Novel object recognition test-NORT) ne pokazuju statistički značajnu razliku u obje vremenske točke između skupina koje su primile tau oligomer i tau fibril u odnosu na kontrolu (Slika 25).



Slika 25. Rezultati testa prepoznavanja novog objekta (NORT). Diskriminacijski indeks, izražen kao odnos istraživanja novog objekt prema starom, nije pokazao značajne razlike između skupina ($p = 0,60$) tau oligomer (TO), tau fibril (TF) i kontrola (CTR). Dugoročna (24 h) memorija za prepoznavanje predmeta bila je netaknuta i za skupine koje su primile tau oligomere i skupine koje su primile tau fibrile u 3 (A) i 6 mjeseci (B) nakon injekcije.

4.3. T-labirint test

Naizmjenični zadaci u T-labirintu (eng. T-maze) korišteni su za procjenu radne memorije štakora. Nakon 3 mjeseca nagrađeno učenje u T-labirintu pokazalo je sporiju krivulju učenja s više pogrešnih izbora kod štakora kojima su ubrizgani tau fibrili (-25%, $p < 0,05$) u usporedbi s kontrolnom i tau oligomer skupinom. Nakon 6 mjeseci skupina oligomeri također pokazuje sporu krivulju, odnosno više pogrešnih izbora (-26%, $p < 0,05$) kao i skupina fibrili (-37%, $p < 0,05$) (Slika 26).



Slika 26. Rezultati T-labirint testa u obliku postotka točnih odabira, odnosno alternacije. A) skupina koja je primila tau fibrile pokazala je manji postotak točnog odabira 3 mjeseca nakon intracerebralne primjene u usporedbi s njihovom odgovarajućom kontrolom u T-labirintu (-25%, $p < 0,05$). B) skupina koja je primila tau fibrile (-37%, $p < 0,05$) i koja je primila tau oligomere (-26%, $p < 0,05$) pokazale su lošiju radnu memoriju 6 mjeseci nakon intracerebralne primjene u odnosu na njihovu kontrolu.

5. ZAKLJUČAK

Anksiozno ponašanje vidljivo je u vremenskoj točki od 3 mj kod skupina koje su primile tau oligomer i skupina koje su primile tau fibril u testu otvorenog prostora zbog smanjenog ukupnog kretanja te držanju blizu zidova (tigmotaksija). Takvo ponašanje pokazala je i skupina oligomer nakon 3 i 6 mj kojoj je predugo vremena trebalo da se podigne na stražnje noge i istraži prostor.

Procjena hipokampalne funkcije kao i funkcije ostalih kortikalnih regija uključenih u prepoznavanje predmeta (NORT) nije pokazala očigledan deficit ni u jednoj skupini životinja. Dugoročna (24 h) memorija za prepoznavanje predmeta bila je netaknuta u skupini koja je primila tau oligomere i skupini koja je primila tau fibrile u obje istraživane vremenske točke.

T-test, korišten za procjenu radne (kratkoročne) memorije, pokazao je sporiju krivulju učenja s više pogrešnih izbora nakon 3 mj od injiciranja kod skupine koja je primila tau fibrile u usporedbi s kontrolnom i tau oligomer skupinom, dok se takve pogreške javljaju kod skupine koja je primila tau oligomer tek nakon 6 mjeseci.

6. LITERATURA

Alonso A.C., Zaidi T., Grundke-Iqbal I., Iqbal K. (1994): Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 5562-5566.

Altmann A., Tian L., Henderson VW., Greicius MD., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative Investigators (2014): Sex modifies the APOE -related risk of developing Alzheimer disease. *Ann Neurol* **75**: 563–573.

Alzheimer's Association (2013): 2013 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement* **9**: 208–245.

Babić M., Švob Štrac D., Mück-Šeler D., Pivac N., Šimić G. (2014): Pathogenesis and early diagnosis of Alzheimer's disease: involvement of the monoaminergic system. *Xjenja* **2**: 78-81.

Biyolojidersi (2018): Hipokampus, forum,
<<https://www.biyolojidersi.org/hipokampus.html>>Pristupljeno 20. kolovoza 2019.

Bizot JC., Herpin A., Pothion S., Pirot S., Trovero F., Ollat H. (2005): Chronic treatment with sulbutiamine improves memory in an object recognition task and reduces some amnesic effects of dizocilpine in a spatial delayed-non-match-to-sample task. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **29**: 928-935.

Blennow K., de Leon M. J., Zetterberg H. (2006): Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology* **368**: 387–403.

Blennow K., Wallin A., Gottfries C.G. (1991): Presence of parietal lobe symptomatology distinguishes early and late onset Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiat* **6**: 147–54.

Blizard D.A., Takahashi A., Galsworthy M.J., Martin B., Koide T. (2007): Test standardization in behavioural neuroscience: a response to Stanford. *J Psychopharmacol* **21**: 136–9.

Borta A., Schwarting R.K. (2005): Inhibitory avoidance, pain reactivity, and plus-maze behavior in Wistar rats with high versus low rearing activity. *J Phys Behav* **84**: 387–396.

Braak H., Braak E. (1991): Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* **82**: 239–259.

Brickell K.L., Steinbart E.J., Rumbaugh M., Payami H., Schellenberg G.D., Van Deerlin V., i sur. (2006): Early-Onset Alzheimer Disease in Families With Late-Onset Alzheimer Disease. *Arch Neurol* **63**: 1307–1311.

Brunden K.R., Trojanowski J.Q., Lee V.M. (2009): Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies. *Nat Rev Drug Discov* **8**:783

Brundin P., Melki R., Kopito R. (2010): Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 301.

Buee L., Bussiere T., Buee - Scherrer V., Delacourte A., Hof P.R. (2000): Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Research Reviews* **33**: 95-130.

Carlini V.P. (2011): The Object Recognition Task: A New Proposal For The Memory Performance Study. Vol.3.

Chai X., Dage J.L., Citron M. (2012): Constitutive secretion of tau protein by an unconventional mechanism. *Neurobiol Dis* **48**: 356–366.

Clavaguera F., Bolmont T., Crowther R.A., Abramowski D., Frank S., Probst A., i sur. (2009): Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol* **11**: 909.

Costall B., Jones B.J., Kelly M.E., Naylor R.J., Tomkins D.M. (1989): Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* **32**: 777–785.

David Kopf instruments (2019): Model 900 Small Animal Stereotaxic Instrument, <<http://kopfinstruments.com/product/model-900-small-animal-stereotaxic-instrument1/>>Pristupljeno 19.kolovoza 2019.

Dale M. (2018): Short Article on Alzheimer's Disease: #5 Tau Aggregation and Propagation.NewmarketScientificBlog,<<http://newmarketscientific.blogspot.com/2018/08/short-article-on-alzheimers-disease-5.html>>Pristupljeno 19. kolovoza 2019.

Deacon R.M.J, Rawlins J.N.P. (2006): T-maze alternation in the rodent. *Nature protocols* **1**: 7.

Ennaceur A., Delacour J. (1988): A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. *Behav Brain Res* **31**: 47–59.

Enns J.T. (2004): *The Thinking Eye, The Seeing Brain: Explorations in Visual Cognition*. New York: W. W. Norton & Company.

Escent diagnostics (2017): The 7 Stages of Alzheimer's Disease, <<http://blog.escentdiagnostics.com/7-stages-alzheimers-disease/>>Pristupljeno 22. Kolovoza 2019.

Ferri C. P., Prince M., Brayne C., i sur. (2005): Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *The Lancet Neurology* **366**: 2112-2117.

Flagg M. (2017): Structure of a Neuron, Owlcation, <<https://owlcation.com/stem/Structure-of-a-Neuron>>Pristupljeno 27. Lipnja 2019.

Graeber M. B. i sur. (1997): Rediscovery of the case described by Alois Alzheimer in 1911: historical, histological and molecular genetic analysis. *Neurogenetics* **1**: 73- 80.

Guo J.L., Lee V.M.Y. (2014): Cell-to-cell transmission of pathogenic proteins in neurodegenerative diseases. *Nat Med* **20**: 130.

Hall C.S. (1934): Drive and emotionality: factors associated with adjustment in the rat. *J Comp Psychol* **17**: 89.

He S. (2018): A Trial Run on the T Maze, Maze Engineers <<https://mazeengineers.com/maze-basics-t-maze-test/>>Pristupljeno 23. kolovoza 2019.

Hirshman E., Master S. (1997): Modeling the conscious correlates of recognition memory: Reflections on the remember–know paradigm. *Mem Cogn* **25**: 345–351.

Iqbal K., Alonso A.D.C., Chen S. i sur. (2005): Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta* **1739**: 198–210.

Johnson G.V., Stoothoff W.H. (2004): Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *J Cell Sci* **117**: 5721-5729.

- Kaminski C.F., Kaminski Schierle G.S. (2016): Probing amyloid protein aggregation with optical superresolution methods: from the test tube to models of disease. *Neurophoton* **3**: 041807.
- Kandel E., Jessell T., Schwartz J.H. (2000): Principles of Neural Science, 4. izd., *New York: McGraw-hill*, str. 19 – 36.
- Khatoon S., Grundke-Iqbal I., Iqbal K. (1992): Brain levels of microtubule-associated protein tau are elevated in Alzheimer's disease: a radioimmunoslot-blot assay for nanograms of the protein. *J Neurochem* **59**: 750–753.
- Laatu S., Revonsuo A., Jaykka H., Portin R., & Rinne, J.O. (2003): Visual object recognition in early Alzheimer's disease: deficits in semantic processing. *Acta Neurologica Scandinavica* **108**: 82-89.
- Lasagna-Reeves C.A., Castillo-Carranza D.L., Sengupta U., Guerrero-Munoy M.J., Kiritoshi T., Neugebauer V., i sur. (2012): Alzheimer brain-derived tau oligomers propagate pathology from endogenous tau. *Sci Rep* **2**: 700.
- Lv Z-Y, Tan C-C, Yu J-T, Tan L. (2017): Spreading of Pathology in Alzheimer's Disease. *Neurotox Res* **32**: 707–722.
- Lyness S. A., Zarow C., Chui H. C. (2003): Neuron loss in key cholinergic and aminergic nuclei in Alzheimer disease: a meta-analysis. *Neurobiol Aging* **24**: 1-23.
- Mandler, G. (1980): Recognizing: the judgment of previous occurrence. *Psychol. Rev.* **87**:252.
- Margittai M., Langen R. (2004): Template-assisted filament growth by parallel stacking of tau. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 10278–10283.
- Mimica M. (2019): Što je Alzheimerova bolest, Hrvatska udruga za Alzheimerovu bolest <<https://alzheimer.hr/ucionica/to-je-to-alzheimerova-bolest/>>Pristupljeno 22. kolovoza 2019.
- Mukhopadhyay, R. (2013): The quiet creep of Alzheimer's disease, <https://www.asbmb.org/asbmbtoday/asbmbtoday_article.aspx?id=33129>Pristuplje no 22. kolovoza 2019.

Newman M. (2014): UTMB Galveston Targets "Tau" to Treat Dementia. BioNews Services Texas, <<https://bionews-tx.com/news/2014/03/24/utmb-galveston-targets-tau-to-treat-dementia/>>Pristupljeno 19.kolovoza 2019.

Orchid Scientific (2019): T Maze, <<https://orchidscientific.com/product/maze-for-all-maze-video-tracking/#1518353300420-1e504b21-019d>>Pristupljeno 29. kolovoza 2019.

Pecotić Z., Perkov D., Babić T. (2007): Alzheimerova demencija, dijagnosticiranje, šifriranje i inicijalna terapija, II nadopunjeno izd. Zagreb: Hrvatska udruga za Alzheimerovu bolest, Zagreb.

Rodgers R.J. (2007): More haste, considerably less speed. *J Psychopharmacol* **21**: 141–143.

Sjögren H. (1950): Twenty-four cases of Alzheimer's disease; a clinical analysis. *Acta Med Scand Suppl* **138**: 225–233.

Spires T.L., Orne J.D., SantaCruz K., Pitstick R., Carlson G.A., Ashe K.H i sur. (2006): Region-specific dissociation of neuronal loss and neurofibrillary pathology in a mouse model of tauopathy. *Am J Pathol* **168**: 1598–1607.

Stancu I-C., Vasconcelos B., Ris L., Wang P., Villers A., Peeraer E., i sur. (2015): Templated misfolding of Tau by prion-like seeding along neuronal connections impairs neuronal network function and associated behavioral outcomes in Tau transgenic mice. *Acta Neuropathol* **129**: 875–894.

Stanford S.C. (2007): The Open Field Test: reinventing the wheel. *J Psychopharmacol* **21**: 134–136.

Strittmatter W.J. (2012): Old drug, new hope for Alzheimer's disease. *Science* **335**: 1447–1448.

Sutton A. L. (2011): Alzheimer Disease sourcebook: basic consumer health information about. Omnigraphics, Detroit.

Šimić G. (2019): Uvod u neuroznanost učenja i pamćenja, 1.izd., Ljevak. str. 13, 36 – 47,67–69,164.

- Šimić G., Babić Leko M., Wraz S., Harrington C.R., Delalle I, Jovanov-Milošević N, i sur. (2017): Monoaminergic neuropathology in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* **151**: 101–138.
- Šimić G., Babić M., Borovečki F., Hof P.R. (2014): Early failure of the default-mode network and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *CNS Neuroscience and Therapeutic* **20**: 692-698.
- Viola K.L., Sbarboro J., Sureka R., De M., Bicca M.A., Wang J., i sur. (2015): Towards non-invasive diagnostic imaging of early-stage Alzheimer's disease. *Nat Nanotechnol* **10**: 91.
- Walker L.C, Jucker M. (2015): Neurodegenerative Diseases: Expanding the Prion Concept. *Annu Rev Neurosci* **38**: 87– 103.
- Walsh D.M., Selkoe D.J., (2016): A critical appraisal of the pathogenic protein spread hypothesis of neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* **17**: 251-260.
- Walsh R.N., Cummins R.A. (1976): The Open-Field Test: a critical review. *Psychol bull* **83**: 482–504.
- Walz N., Mühlberger A., Pauli P. (2016): A human open field test reveals thigmotaxis related to agoraphobic fear. *Biological psychiatry* **80**: 390– 397.
- Watts J.C., Condello C., Stöhr J., Oehler A., Lee J., DeArmond S.J., i sur. (2014): Serial propagation of distinct strains of A β prions from Alzheimer's disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**: 10323–10328.
- Wegmann S., Maury E.A., Kirk M.J., Saqran L., Roe A., DeVos S.L., i sur. (2015): Removing endogenous tau does not prevent tau propagation yet reduces its neurotoxicity. *EMBO J* **34**: 3028–3041.
- Wimo A., Prince M. (2010): World Alzheimer report 2010: the global economic impact of dementia. *Alzheimer's Disease International* **2**: 1-56.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



Ime i prezime studenta