UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

ŽIVALSKI MODELI ZA RAZISKAVE ALZHEIMERJEVE BOLEZNI TER KOGNITIVNE MOTNJE PSOV IN MAČK

ANIMAL MODELS FOR RESEARCH ON ALZHEIMER'S DISEASE AND COGNITIVE DISORDERS IN DOGS AND CATS

Patricija Murko

Delo je pripravljeno v skladu z navodili za Strokovno raziskovalno delo študentov, pod mentorstvom asist. dr. Malan Štrbenc na Inštitutu za predklinične vede Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani

Lektura: Janez Štrbenc

Ljubljana, 2024

P. Murko: Živalski modeli za raziskave Alzheimerjeve bolezni ter kognitivne motnje psov in mačk. Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2024, Raziskovalna naloga

IZVLEČEK

Ključne besede: Alzheimerjeva bolezen; amiloid beta; nevronska sintaza dušikovega oksida; miš; imunohistokemija; možgani.

Nevrodegenerativne bolezni predstavljajo heterogeno skupino bolezni, med katerimi je tudi Alzheimerjevo bolezen (AB). Zaradi nepopolnega razumevanja teh bolezni se vse več študij usmerja v raziskovanje novih in učinkovitejših terapij ter iskanju ustreznih modelov za preučevanje. V naši raziskavi smo želeli ugotoviti, ali so v možganih naravno postaranih miši (C57BL/6J in BALB/c) prisotne spremembe, podobne spontani obliki AB (amiloidni plaki, vnetje, celični stres, atrofija možganske skorje in hipokampusa). Z metodo imunohistokemije na plavajočih rezinah smo v možganih starih miši divjega tipa potrdili prisotnost intracelularnega beta amiloida v nevronih. Ugotovili smo, da se plaki v določenih predelih možganov dosledno pojavljajo na istih lokacijah, in sicer v lateralnem septalnem jedru, hipokampusu in okolici lateralnega ventrikla. Potrdili smo tudi prisotnost nevronske sintaze dušikovega oksida (nNOS) v skoraj vseh predelih možganov, pri čemer so bile najintenzivnejše pozitivne reakcije prisotne v striatumu, piriformnem korteksu in v okolici tretjega možganskega ventrikla. Izmerili smo površino preseka hipokampusa in debelino možganske skorje, vendar zaradi majhnega števila vzorcev z gotovostjo ne moremo potrditi, da s starostjo prihaja do atrofije. Naša raziskava odpira možnost uporabe modelov naravno postaranih miši za preučevanje AB v prihodnosti, vendar so potrebne nadaljnje raziskave, ki bodo upoštevale omejitve teh modelov, kot so velika variabilnost med živalmi, razlike v patologiji med živalmi in ljudmi ter vpliv okoljskih dejavnikov.

P. Murko: Živalski modeli za raziskave Alzheimerjeve bolezni ter kognitivne motnje psov in mačk. Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2024, Raziskovalna naloga

ABSTRACT

Key words: Alzheimer's disease; amyloid beta; neuronal nitric oxide synthase; mouse; immunohistochemistry; brain.

Neurodegenerative diseases represent a heterogeneous group of disorders, including Alzheimer's disease (AD). Due to the incomplete understanding of these diseases, more and more studies are focussing on the research of new and more effective therapies as well as on the search for suitable models for research. In our study, we wanted to find out whether the brains of naturally aged mice (C57BL/6J and BALB/c) show changes that resemble the spontaneous form of AD (amyloid plaques, inflammation, cellular stress, cortical and hippocampal atrophy). Using the immunohistochemistry method on free-floating sections, we confirmed the presence of intracellular beta-amyloid in the neurons of aged wild-type mice. We found that the plaques consistently appeared in specific brain regions, namely the lateral septal nucleus, the hippocampus and the area surrounding the lateral ventricle. We also confirmed the presence of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in almost all brain regions, with the most intense positive responses found in the striatum, piriform cortex and around the third ventricle. We measured the cross-sectional area of the hippocampus and the thickness of the cortex, but due to the small sample size, we cannot confirm with certainty that ageing leads to atrophy. Our research opens up the possibility of using naturally aged mouse models to study Alzheimer's disease in the future. However, further research is needed to address the limitations of these models, such as the high variability between animals, the differences in pathology between animals and humans, and the influence of environmental factors.

KAZALO VSEBINE

1 UVOD 8
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA 8
1.2 CILJ RAZISKOVANJA 8
1.3 DELOVNE HIPOTEZE 8
2 PREGLED LITERATURE 9
2.1 NEVRODEGENERATIVNE BOLEZNI PRI LJUDEH 9
2.1.1 Amiloidoze 9
2.1.2 Taupatije 10
2.1.3 Sinukleinopatije 10
2.1.4 TDP-43 proteinopatija 10
2.2 ALZHEIMERJEVA BOLEZEN 10
2.2.1 Patologija 11
2.2.2 Genetika 11
2.2.3 Hipoteze o nastanku Alzheimerjeve bolezni 11
2.2.4 Terapija Alzheimerjeve bolezni 12
2.3 ALZHEIMERJEVI BOLEZNI PODOBNA OBOLENJA PRI ŽIVALIH 13
2.3.1 PSI 13
2.3.2 MAČKE 15
2.3.3 KONJI 17
2.3.4 DRUGE ŽIVALSKE VRSTE 17
2.3.5 SLONI 17
2.4 ŽIVALSKI MODELI ZA PREUČEVANJE ALZHEIMERJEVE BOLEZNI 18
2.4.1 Nečloveški primati 19
2.4.2 Pasji modeli 19
2.4.3 Genetsko spremenjeni modeli miši 19
2.4.4 Genetsko spremenjeni podganji modeli 20
2.4.5 Navadna cebrica 20
2.4.6 Vinska mušica 20
2.4.7 *Caenorhabditis elegans* 21
2.4.8 Kvasovke 21
2.5 POTENCIALNI MODELI ZA SPORADIČNO OBLIKO ALZHEIMERJEVE BOLEZNI 21
2.5.1 Modeli inducirani s sintetično dvojno vijačno RNK 21

2.5.2 Modeli inducirani s okadaično kislino 21
2.5.3 Modeli inducirani s kolhicinom 22
2.5.4 p25 transgeni model 22
2.5.5 Ankyrin G (AnkG) transgeni modeli 22
2.5.6 Modeli inducirani s skopolaminom 22
2.5.7 Modeli inducirani z aftinom 22
2.6 MODELI, KI TEMELJIJO NA INDUCIRANIH PLURIPOTENTNIH MATIČNIH CELICAH 23
3 MATERIALI IN METODE 25
3.1 MATERIALI 25
3.1.1 Pridobitev in priprava vzorca 25
3.2 METODE 25
3.2.1 Postopek imunohistokemije na parafinskih rezinah 25
3.2.2 Postopek imunohistokemije na plavajočih rezinah 25
3.2.3 Meritev površine preseka hipokampusa in možganske skorje 26
4 REZULTATI 27
4.1 Imunohistokemični prikaz amiloidnih plakov in izoform sintaze dušikovega oksida na parafinskih rezinah 27
4.2 Imunohistokemični prikaz amiloidnih plakov in nevronske sintaze dušikovega oksida na plavajočih rezinah 27
4.3 Obseg hipokampusa in debelina možganske skorje 31
5 RAZPRAVA 33
5.1 Imunohistokemični prikaz amiloidnih plakov in izoform sintaze dušikovega oksida na parafinskih rezinah 33
5.2 Imunohistokemični prikaz amiloidnih plakov z metodo plavajočih rezin 33
5.3 Imunohistokemični prikaz nevronske sintaze dušikovega oksida na plavajočih rezinah 34
5.4 Obseg hipokampusa in debelina možganske skorje 35
6 SKLEPI 36
7 POVZETEK 37
8 SUMMARY 38
9 LITERATURA 39

KAZALO TABEL

Tabela 1: Povprečno število nevronov pozitivnih na nNOS v striatumu na polje velikosti 280 000 μm²…… 31

KAZALO SLIK

Slika 1: Področje Bregme -1,5, kjer smo opravili meritev obsega (površino preseka) hipokampusa in debelino možganske skorje pri 40x povečavi. 26
Slika 2: Prikaz nespecifične signalizacije (artefakt) med iskanjem amiloidnih plakov na možganskih rezinah v treh barvnih kanalih – zelenem (A), rdečem (B) in modrem (C), pri 400x povečavi.....27
Slika 3: Prikaz intracelularnega Aβ (črna puščica) v nevronih hipokampusa na področju Bregme -1,3 pri 18 mesečni BALB/c miši pri 400x povečavi. 28
Slika 4: Prikaz večjih agregacij Aβ (črna puščica) v lateralnem septalnem jedru na področju Bregme 1,1 pri 24 mesecev stari C57BL/6J miši. 28
Slika 5: Prikaz pozitivne obarvanosti perikariona nevronov (črna puščica) in njihovih podaljškov (rdeča puščica) na nNOS v striatumu na področju Bregme -1,0 pri 400x povečavi.....29
Slika 6: Prikaz pozitivne reakcije na nNOS (zelen pravokotnik) ob tretjem možganskem ventriklu na področju Bregme -1,0 pri 4 mesece stari BALB/c miši pri 100x povečavi. 29
Slika 7: Prikaz pozitivne reakcije na nNOS v piriformnem korteksu na področju okoli Bregme 0 pri 18 mesecev stari BALB/c miši. 30
Slika 8: Prikaz pozitivne reakcije na nNOS v laterodorzalnem jedru tagmentuma na področju Bregme -5,0 pri 24 mesečni miši C57BL/6J. 30
Slika 9: Prikaz pozitivne reakcije na nNOS v interpedunkularnem jedru na področju Bregme -3,8 pri 24 mesečni miši C57BL/6J. 30
Slika 10: Prikaz površine preseka hipokampusa na Bregmi -1,5 v povezavi s starostjo miši..31
Slika 11: Prikaz debeline možganske skorje v področju primarnega somatosenzornega korteksa (S1) na Bregmi -1,5 v povezavi s starostjo miši. 32

P. Murko: Živalski modeli za raziskave Alzheimerjeve bolezni ter kognitivne motnje psov in mačk. Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2024, Raziskovalna naloga

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

AB	Alzheimerjeva bolezen
ApoE	apolipoprotein E
APP	amiloidni prekurzorski protein
Aβ	amiloid-β
BSA	goveji serumski albumin
CCD	pasja kognitivna disfunkcija
CDS	sindrom kognitivne disfunkcije
DAB	3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid
eNOS	endotelijska sintaza dušikovega oksida
iNOS	inducibilna sintaza dušikovega oksida
iPSC	pluripotentne matične celice
NB	nevrodegenerativne bolezni
NFT	znotrajcelične nevrofibrilarne pentlje
NGS	normalni kozji serum
nNOS	nevronska sintaza dušikovega oksida
NO	dušikov oksid
PBS	fosfatni pufer z NaCl
PSEN1	presenilin 1
PSEN2	presenilin 2
ROS	kisikove reaktivne zvrsti
SAB	sporadična oblika Alzheimerjeve bolezni

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Nevrodegenerativne bolezni predstavljajo v današnjem svetu vse večji problem za javno zdravje, predvsem zaradi (v veliki meri) neozdravljivosti in vse večje razširjenosti. Med najbolj znanimi boleznimi, ki prizadenejo ljudi, sta Alzheimerjeva bolezen in Parkinsonova bolezen. Za nevrodegenerativna obolenja, ki lahko povzročajo izgubo spomina in kognitivni upad ali pa prizadenejo sposobnost govora, gibanja in dihanja, je značilna velika raznolikost v patofiziologiji (1).

Zaradi slabega razumevanja teh bolezni in pomanjkanja učinkovitih zdravljenj se vse več študij usmerja v raziskovanje novih in bolj učinkovitih terapij. Ena izmed bolj obetavnih metod za razumevanje mehanizmov nastanka teh bolezni in za iskanje terapevtskih učinkovin vključuje različne modele, od enoceličnih organizmov do višje razvitih živali. Ti modeli omogočajo boljše razumevanje bolezni, saj spontano ali inducirano posnemajo njihove značilnosti. Delo z različnimi modeli omogoča široko raznolikost pri odkrivanju mehanizmov nevrodegeneracije, vključno z redkimi obolenji. Ena izmed novejših metod je uporaba induciranih pluripotentnih matičnih celic (iPSC) in njihovo gojenje v treh dimenzijah, kar vodi v izdelavo organoidov. Možganska tkiva v obliki organoidov predstavljajo sodobne modele za raziskovanje nevrodegenerativnih bolezni in odkrivanju novih učinkovin za zdravljenje (1).

1.2 CILJ RAZISKOVANJA

V okviru tega strokovno raziskovalnega dela smo želeli preučiti možgane naravno postaranih miši linij C57BL/6J in BALB/c z metodo imunohistokemije, da bi ugotovili prisotnost sprememb, podobnih tistim v možganih s spontano obliko Alzheimerjeve bolezni: kopičenje beta amiloida, znaki vnetja in celičnega stresa, atrofija možganske skorje in hipokampusa. Namen našega dela je bil pridobiti okviren vpogled v to, ali bi postarane miši divjega tipa lahko služile kot model za preučevanje nevrodegenerativnih procesov, povezanih s staranjem, predvsem Alzheimerjeve bolezni, kognitivne disfunkcije pri psih in mačkah ter možnosti za nadaljnje raziskave na tem področju.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

H1: V možganih starih miši so prisotni plaki beta amiloida.

H2: V možganih starih miši so prisotne morfološke spremembe v primerjavi z mladimi živalmi.

H3: Na morfološke razlike ne vpliva linija miši (C57BL/6J in BALB/c) ali spol.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 NEVRODEGENERATIVNE BOLEZNI PRI LJUDEH

Nevrodegenerativne bolezni (NB) predstavljajo zelo heterogeno skupino kompleksnih bolezni, ki so po vsem svetu vse pogostejši vzrok smrtnosti, predvsem v starejši populaciji. Kljub določenim skupnim lastnostim imajo posamezne nevrodegenerativne motnje zelo raznoliko klinično sliko in fiziologijo, kar otežuje diagnostiko, ki je ključna z vidika prognoze in ustreznega zdravljenja (2). Za te motnje je značilen progresiven upad motorične in/ali kognitivne funkcije kot posledica selektivne izgube nevronov v centralnem živčnem sistemu, številne patološke spremembe na molekularnem in celičnem nivoju pa se začnejo že več let preden se bolezen klinično izrazi (3). Med najpogostejše NB sodijo Alzheimerjeva bolezen (AB), frontotemporalna demenca (FTD), progresivna supranuklearna paraliza (PSP), kortiko-bazalna degeneracija (CBD), Parkinsonova bolezen (PB), demenca z Lewyjevimi telesci (DLT), multipla sistemska atrofija (MSA) in Huntingtonova bolezen (HB). Histopatološko si te bolezni delijo določene skupne lastnosti, kot so kopičenje beljakovin s spremenjenimi lastnostmi v možganskem tkivu, aktivacija glija celic in izguba oziroma smrt nevronov. Velika večina teh bolezni nastane spontano, zato govorimo o sporadični obliki, poznamo pa tudi družinsko obliko, za katero so značilne mutacije v genu, ki neposredno ali posredno vodi do kopičenja proteina, ki ga ta gen kodira. Različne študije na živalskih modelih so pokazale, da indukcija teh mutacij ne povzroča zgolj nenormalne funkcije nevronov, temveč tudi mitohondrijsko disfunkcijo, blokado aksonskega transporta, motnje v konformaciji proteinov in disregulacijo transkripcije. Te ugotovitve nakazujejo, da je osnova napredujoče izgube nevronov nalaganje nenormalnih proteinov, kar je temelj mnogih terapij, ki ciljajo na patomehanizme kopičenja proteinov z namenom njihovega zaviranja. Na živalskih modelih so z določenimi učinkovinami uspeli zavreti nevralne poškodbe in vedenjske motnje, vendar se učinkovitost teh terapij ni potrdila v kliničnih preskušanjih pri ljudeh. Razlogi za neuspeh so verjetno številni biološki dejavniki (napredovanje patologije, kompleksnost mehanizmov nevronalne smrti, staranje, varnost učinkovin), ki vplivajo na učinkovitost spojin. Glavna ovira v razvoju uspešne terapije pa je pomanjkljivo poznavanje predkliničnega napredovanja bolezni, saj je nenormalno delovanje in smrt nevronov ter nalaganje proteinov mogoče zaznati že v fazah, ko klinični znaki še niso prisotni (2).

Med najpogostejše nevrodegenerativne motnje, pri katerih se proteini z nenormalnimi konformacijami v celici in anatomsko različno razporejajo, spadajo amiloidoze, taupatije, sinukleinopatije in TDP-43 (TAR DNA vezavni protein) proteinopatije. Za razliko od celičnih inkluzij, ki nastanejo pri virusnih infekcijah in vsebujejo tuje proteine, se pri teh motnjah nalagajo proteini, ki so že prisotni v nevronih. Poleg teh proteinov se lahko kopičijo tudi druge celične komponente (4).

2.1.1 Amiloidoze

O amiloidozah govorimo kadar kopičenje netopnih vlaknastih proteinov, imenovanih amiloidi, povzroči nastanek amiloidnih plakov, katerih morfologija se razlikuje glede na tip in vrsto amiloida, stopnjo bolezni ter anatomsko lokacijo plakov. Gre za motnjo skupno mnogim NB, pri katerih se plaki lahko nahajajo v citoplazmi nevronov in glije, ekstracelularno kopičenje amiloidov pa lahko najdemo v možganskem parenhimu ali stenah krvnih žil kar vodi v amiloidno angiopatijo. Najpogostejša oblika amiloidoze je proteolitični

produkt amiloidnega prekurzorskega proteina (APP), poznan kot amiloid-β (Aβ), ki ga kodira gen na 21. kromosomu. Aβ izolirani iz človeških možganov se razlikujejo v velikosti peptidnih fragmentov in v posttranslacijskih modifikacijah. Kopičenje Aβ je ena glavnih značilnosti AB, vendar se lahko pojavlja tudi pri številnih drugih nevrodegenerativnih motnjah pri starejših, še posebej pri osebah z genetskim dejavnikom tveganja za razvoj AB (4).

2.1.2 Taupatije

Taupatije so motnje, povezane s patološkim kopičenjem tau proteina v nevronih in glija celicah, ki jih lahko delimo na primarne in sekundarne teupatije. Sekundarne so tiste, pri katerih kopičenje tau ni glavna značilnost bolezni, najboljši primer za to je AB. Tau je fosfoprotein, odgovoren za stabilizacijo mikrotubulov, pri čemer poleg fosforilizacije doživlja tudi druge posttranslacijske modifikacije, ki so povezane z nastankom nenormalnega tau, ki se kopiči pri degenerativnih taupatijah. Z odkritjem mutacij v genu MAPT, ki kodira tau protein, so pri frontotemporalni demenci in parkinsonizmu, povezanimi s 17. kromosomom, dokazali, da lahko nenormalnosti tau proteina vodijo do razvoja nevrodegeneracijskih sprememb (4).

2.1.3 Sinukleinopatije

Sinukleinopatije so skupina NB, za katere je značilno kopičenje nepravilno zvitega α-sinukleina v nevronih in glija celicah, predvsem v oligodendrocitih. Ta protein so sprva odkrili kot ne-amiloidno komponentno senilnih plakov pri AB, kasneje pa so pri družinski obliki PB odkrili mutacije v genu SNCA, ki kodira α-sinuklein. Prav tako je α-sinuklein tudi glavni sestavni del Lewyjevih telesc, nevralnih inkluzij, ki jih najdemo pri PB, PB z demenco in DLT. Patološko kopičenje α-sinukleina se pojavlja tudi pri MSA, kjer so agregati proteina večinoma prisotni v oligodendrocitih, medtem ko jih pri drugih sinukleinopatijah najdemo pretežno v nevronih (4).

2.1.4 TDP-43 proteinopatija

TDP-43 je protein, ki predstavlja glavno komponento nevralnih inkluzij pri amiotrofični lateralni sklerozi (ALS) in različnih oblikah FTD. Pri NB TDP-43 formira inkluzije v citoplazmi, jedru in celičnih podaljških. Nenormalne proteine lahko najdemo tudi pri 25 % do 50 % bolnikov z AB (4).

2.2 ALZHEIMERJEVA BOLEZEN

Alzheimerjeva bolezen je izraz, ki se pogosto uporablja tako za patološko stanje kot tudi za klinični sindrom, ki ga nekateri imenujejo Alzheimerjeva demenca, saj je povezana s specifičnim nevropatološkim procesom (2). Zanj so značilni amiloidni plaki in znotrajcelične nevrofibrilarne pentlje (NFT), sestavljene pretežno iz hiperfosfolirilanega proteina tau, ter izguba nevronov. Ko NFT dozorijo, nevron, v katerem se nahaja inkluzija, odmre, za seboj pa pusti ekstracelularni NFT (2, 4, 5). AB predstavlja najpogostejši vzrok demence pri ljudeh in je predvsem bolezen starejših, čeprav se lahko pojavi tudi pri mlajših. Prevalenca bolezni izrazito narašča s staranjem. Poleg starosti obstajajo številni dejavniki tveganja za razvoj AB, kot so genetska predispozicija, cerebrovaskularna bolezen, hiperlipidemija, kajenje, diabetes, debelost in travmatska možganska poškodba (TBI). Večina primerov AB je tipičnih, medtem ko do 15 % primerov predstavlja atipične oblike z različnimi simptomi. Za tipično AB je

značilna postopna in napredujoča izguba spomina, zlasti spominov, povezanih s specifičnimi časovnimi, prostorskimi in čustvenimi dogodki, še posebej v zgodnji fazi bolezni. Poleg tega se pojavlja tudi izguba drugih kognitivnih sposobnosti. Atipična oblika AB prizadene dele možganov, odgovorne za vizualno percepcijo (prepoznavanje obrazov, predmetov, besed) in vizualno-prostorske sposobnosti. Možne so vedenjske spremembe, kot sta apatija in dezinhibicija ter motnje govora (2).

2.2.1 Patologija

Nevroanatomska razporeditev NFT in nevralnih plakov se razlikuje. Običajno so NFT sprva vidne v entorhinalnem korteksu, nato se razširijo v hipokampus in druge paralimbične strukture (bazalna jedra, amigdala, anterodorzalno talamično jedro) ter naprej v izokorteks in druge subkortikalne strukture. Na koncu prizadenejo tudi prefrontalna področja. V primarnih motoričnih, senzoričnih in vidnih področjih se plaki nabirajo šele v poznejših stadijih bolezni. V primerjavi z NFT je tvorba amiloidnih plakov običajno bolj iregularna. Sprva se oblikujejo v bazalnem izokorteksu, nato se razširijo še v senzorično-motorična področja. V hipokampusu jih običajno ni, se pa kopičijo v subkortikalnih strukturah (vključno s striatumom, talamusom in hipotalamusom) (2).

2.2.2 Genetika

Tveganje za nastanek AB je večje, če je bolezen prisotna pri enem sorodniku, in še višje, če je prisotna pri več sorodnikih. Družinska AB oziroma AB z zgodnjim začetkom se pojavlja redko in je povezana z mutacijo enega od treh genov, in sicer presenilin 1 (PSEN1), kar je najpogostejše, presenilin 2 (PSEN2) ali APP (2). V večini primerov gre za sporadično obliko AB (SAB) oziroma AB s poznim začetkom, pri kateri ni glavnega genetskega vzroka. Tveganje za nastanek te oblike je povezano s prisotnostjo specifičnih alelnih variant apolipoproteina E (ApoE), in sicer ε2, ε3 in ε4. Približno 1 od 5 ljudi je nosilec ApoE, kar za trikrat poveča tveganje za nastanek AB in predstavlja kar 65 % vseh primerov AB. Mehanizmi nastanka, ki povezujejo prisotnost ApoE z AB, še niso popolnoma dognani, vendar se predvideva, da to vodi do kopičenja Aβ v možganih (2, 5).

2.2.3 Hipoteze o nastanku Alzheimerjeve bolezni

<u>Amiloidna hipoteza in protein tau</u>

Za to hipotezo sta ključna Aβ in NFT, katerih depoziti so rezultat napačnega zvijanja proteinov. APP je transmembranski glikoprotein, katerega cepitev, ki jo povzročajo α-, β- in ɣ- sekretaze, lahko vodi do nastanka peptidov Aβ preko amiloidogene poti, za katero je značilna cepitev preko β-sekretaze. Ti netopni peptidi imajo različna števila fragmentov, od 39 do 43, med katerimi ima $A\beta_{42}$ citotoksične lastnosti, povezane z nevrodegeneracijo. Skupaj ti fragmenti oblikujejo strukture, ki jih histopatološko prepoznamo kot senilne oziroma starostne plake ter prispevajo k smrti nevronov. NFT so posledica hiperfosforilizacije proteina tau, ki nastane zaradi povečane ekspresije tau. Raziskave na miših so pokazale, da lahko visoke koncentracija Aβ vodijo do njegove hiperfosforilizacije, kar nakazuje soodvisnost med kopičenjem Aβ in tau proteina. Ta povezava predstavlja končno stopnjo patogeneze AB (5).

Vnetni mehanizem in mitohondrijska disfunkcija

AB je tesno povezana z vnetnimi procesi. Mnoge študije so pokazale, da kronična in akutna vnetja močno poslabšajo tau patologijo. Pomembno vlogo pri nastanku vnetnega odziva imajo celice mikroglije na območjih, kjer so amiloidni plaki najgostejši, kar vodi do aktivacije mikroglije in izločanja vnetnih citokinov. Domneva se, da depoziti Aβ in tau proteinov vplivajo toksično na delovanje mitohondrijev v možganskih celicah, še posebej na njihov oksidativni metabolizem (5).

Holinergična hipoteza

Holinergična hipoteza o nastanku in razvoju AB je ena izmed najbolj preučenih teorij in velja za prvo teorijo povezano z njeno patogenezo. Po tej hipotezi izguba holinergičnih nevronov in zmanjšanje centralne holinergične nevrotransmisije privede do razvoja kognitivnih in nekognitivnih simptomov AB. Možgani pacientov z AB, poleg že opisanih histopatoloških značilnosti, kažejo tudi atrofijo, sinaptično izgubo in pomanjkljivosti nevrotransmisije. Na začetku bolezni prihaja do izgube holinergičnih nevronov bazalnih jeder in entorhinalnega korteksa, napredovanje AB pa lahko povzroči do 90% izgubo holinergičnih nevronov v bazalnih jedrih. V živalskih modelih oslabljeno delovanje holinergičnega sistema povzroča pomanjkanje spomina, kar je podobno kot pri AB. Holinergična hipoteza prav tako omenja padanje koncentracije acetiltransferaze, ki je odgovorna za sintezo acetilholina v korteksu in hipokampusu ter pomanjkanje acetilholina, noradrenalina in serotonina, kar je posledica celične disfunkcije in smrti nevronov (5).

Oksidativni stres

Oksidativni stres, ki ga povzroča kopičenje Aβ, je ključen za patogenezo in napredovanje AB, saj gre za tako vzrok kot tudi posledico vnetnih procesov, značilnih za NB. Do njegovega nastanka privede povečana tvorba kisikovih reaktivnih zvrsti (ROS), ki sicer nastajajo v procesu mitohondrijske oksidativne fosforilacije, vendar v manjših količinah. Povečana tvorba ROS vodi v porušitev homeostaze zaščitnih mehanizmov, kar povzroči kopičenje teh zvrsti in lahko deluje ekscitotoksično na nevrone. Ta mehanizem je v veliki meri odvisen od kopičenja Aβ, ki povzroči redukcijo železa in bakra v možganih ter lahko prispeva tudi k poškodbi DNK (5).

Vse več študij preučuje vlogo dušikovega oksida (NO) v procesu nevrodegeneracije, vključno z AB, saj je povečana tvorba te molekule povezana s številnimi patološkimi stanji (NB, vnetje, ishemija) in nitrozativnim stresom. NO, sicer nujno potreben za normalno delovanje možganov (nevrotransmisija, vnetni proces, agregacija trombocitov), tvorijo trije encimi: nevronska sintaza NO (nNOS), inducibilna sintaza NO (iNOS) in endotelijska sintaza NO (eNOS). V centralnem živčnem sistemu lahko najdemo predvsem nNOS, eNOS je značilna za endotelijske celice krvnih žil, iNOS pa povezujemo z vnetjem (6).

2.2.4 Terapija Alzheimerjeve bolezni

Za zdravljenje AB trenutno ne obstaja zdravilo, ki bi popolnoma preprečilo razvoj in napredovanje bolezni, vendar pa z različnimi farmakološkimi substancami lahko blažimo simptome bolezni in izboljšamo kakovost življenja pacientov. Med takšnimi zdravili so zaviralci holinesteraz (zvišujejo raven acetilholina (ACh)), nekompetitivni antagonisti receptorja N-metil-D aspartata (NMDA) (zavira z glutamatom povzročeno ekscitotoksičnost in nevrodegeneracijo), inhibitorji sekretaz (vplivajo na encime, ki sodelujejo pri cepitvi APP)

in zaviralci GSK3-β (angl. *Glycogen Synthase Kinase-3*) (2, 5). Drugi pristopi za zdravljenje AB vključujejo uporabo protivnetnih zdravil (zmanjšanje vnetnega odziva v možganskem tkivu), antioksidantov (zaščita celic pred oksidativnim stresom), estrogenskih nadomestkov (spodbuja sproščanje nevrotransmiterjev ter poveča pretok krvi skozi možgane) in cepiv (5).

2.3 ALZHEIMERJEVI BOLEZNI PODOBNA OBOLENJA PRI ŽIVALIH

2.3.1 PSI

Podobno kot ljudje lahko tudi psi, predvsem starejši, razvijejo obolenje, ki je zelo podobno AB. To stanje imenujemo pasja kognitivna disfunkcija/motnja (angl. *Canine cognitive dysfunction* - CCD) ali pasja demenca. Pri psih se CCD izraža s kognitivnimi nepravilnostmi primerljivimi s simptomi AB pri ljudeh (dezorientacija, izguba spomina, vedenjske spremembe). Skupne lastnosti bolezni vključujejo senilne plake Aβ v zunajceličnem prostoru in okoli krvnih žil, poškodbo možganov zaradi oksidativnega stresa, mitohondrijsko disfunkcijo nevronov, ekscitotoksično poškodbo nevronov in vnetni odziv. Bolezen predstavlja velik problem za zdravje starejših psov, zato je pomemben razvoj novih veterinarskih diagnostičnih postopkov in bioloških označevalcev ter zdravil za terapijo. CCD prizadene do 60 % psov, večinoma starejše od 11 let, klinična slika in patologija obolenja pa se med pasmami psov posebej ne razlikujeta. Bolezni so bolj podvržene psice in kastrirani psi. Klinične znake pogosteje opažajo pri manjših pasmah, kar je najverjetneje posledica daljše življenjske dobe. Poleg tega so opazili povezavo med idiopatsko epilepsijo in zgodnjim razvojem CCD, kar je podobno ljudem, kjer je že uveljavljena povezava med epilepsijo temporalnega režnja in AB z zgodnjim začetkom (7, 8).

Patologija pasje kognitivne disfunkcije

Za AB sta najbolj značilna kopičenje Aβ v obliki senilnih plakov in nepravilno fosforiliranega proteina tau v obliki NFT, ki naj bi bila vzrok za značilne kognitivne in vedenjske spremembe. Raziskave so pokazale, da so spremembe v možganih ljudi z AB in možganih psov s kognitivno motnjo zelo podobne (izguba nevronov, kortikalna atrofija). Najpogostejši simptomi CCD so dezorientacija, tesnoba, plašljivost, agresivnost ali apatičnost, imajo težave pri nadzoru izločanja telesnih tekočin ter spremembe v cirkadianem ritmu. V možganih psov s CCD, pri katerih so se pojavili ti klinični znaki, so našli amiloidne plake, ki so lahko prisotni še preden simptomi bolezni postanejo očitni (7).

Podobnost med psi in ljudmi je visoka homolognost v aminokislinskem zaporedju APP in encimov, ki sodelujejo pri njegovi cepitvi in posledično nastanku Aβ. Nasprotno pa velja za zaporedje proteina tau, saj se ta med psi in ljudmi bolj razlikuje. Aβ v obliki netopnih plakov je prisoten v možganih tako pri psih kot ljudeh, vendar še ni bila odkrita povezava med količino nakopičenega Aβ in simptomi CCD pri psih. Senilni plaki so večinoma odkriti kot ekstracelularni depoziti, vendar so v nekaterih študijah poročali tudi o prisotnosti Aβ depozitov znotraj posameznih nevronov v pasjih in človeških možganih. Pri psih opazujejo nastanek in zorenje depozitov Aβ s pomočjo imunohistokemijskih tehnik, s katerimi so ugotovili značilno razporeditev depozitov, opazovano tudi pri AB ljudi. V nekaterih študijah so pri psih odkrili povezanost te razporeditve z resnostjo kognitivnih motenj in razlike med različnimi starostnimi skupinami in velikostmi psov. Pri manjših in srednje velikih pasmah so našli več nakopičenega Aβ, kar bi lahko pojasnili z daljšo življenjsko dobo teh psov (7). Ti depoziti Aβ se pri psih začnejo kopičiti pri starosti 8 let, o kognitivnem upadu pa so nekatere študije na beaglih poročale že pri starosti 7 let in manj. Pri teh psih so ugotovili

povišane vrednosti Aβ v cerebrospinalni tekočini, v primerjavi s tistimi z nižjimi vrednostmi Aβ v cerebrospinalni tekočini pa so ti prikazovali težave z učenjem (8).

Raziskave na možganih starejših psov s CCD so pokazale, da se bolezen običajno začne v prefrontalni skorji možganov in se nato razširi na parietalne, entorhinalne in okcipitalne režnje. Pojav patologij v različnih delih možganov je povezan z določenimi vedenjskimi motnjami. Amiloidni plaki so bili v pasjih možganih odkriti v frontalnem, temporalnem, parietalnem in entorhinalnem korteksu ter v hipokampusu. Pri psih s CCD so opazili tudi aktivacijo astrocitov in celic mikroglije (astroglioza in mikroglioza) ter hipertrofijo astrocitov. Nivo patološkega Aβ v prefrontalnem korteksu pasjih možganov je v pozitivni korelaciji s starostjo, ne pa s stopnjo kognitivne motnje ali izgube nevronov. Pri starejših psih s kognitivno motnjo so zaznali degeneracijo noradrenergičnih nevronov, kar je povezano z višjo koncentracijo Aβ plakov v prefrontalnem korteksu. Podobno kot pri ljudeh z AB tudi pri psih pride do degeneracije lokusa ceruleusa in izgube možganskih noradrenergičnih nevronov že v zgodnjih fazah bolezni. S starostjo upada tudi aktivnost pasjega holinergičnega sistema. Starejši psi s kognitivnimi motnjami so imeli bistveno manjše število bazalnih holinergičnih nevronov v možganih v primerjavi s starejšimi psi brez kognitivne motnje in mlajšimi psi, vendar to ni koreliralo z obsegom amiloidne obremenitve. Pri človeških pacientih so ugotovili, da so holinergični nevroni najbolj dovzetni za Aβ patologijo, njihovo uničenje pa, skupaj z izgubo sinaps, prispeva k napredovanju bolezni in pripomore k težavam s spominom in pozornostjo pri AB. Enake ugotovitve veljajo tudi za pse (7).

Za razliko od AB pri ljudeh so v pasjih možganih le redko odkrili inkluzije hiperfosforiliranega proteina tau, v nobeni študiji pa ni bila potrjena prisotnost NFT, ki so značilne za AB pri ljudeh. Doslej obstajajo zgolj domneve o vzroku tega pojava. Sumijo, da bi lahko bila razlika posledica raznolikosti sekvence pasjega tau proteina v primerjavi s človeškim ali pa v krajši življenjski dobi psov, ki je prekratka, da bi prišlo do tvorbe NFT (7).

Skupna značilnost pacientov z AB in psov s CCD je tudi kopičenje Aβ v stenah krvnih žil možganov. Pri ljudeh gre večinoma za kopičenje $A\beta_{40,}$ medtem ko so pri psih opazili tako $A\beta_{40}$ kot, še pogosteje, $A\beta_{42}$. Poleg tega so tako pri ljudeh kot pri psih znotraj možganov zaznali krvavitve (7, 8).

Genetika pasje kognitivne disfunkcije

CCD še ni bila povezana z nobenimi mutacijami genov, kot je to pri družinski obliki AB pri ljudeh. Kljub temu večina primerov CCD, podobno kot pri AB, velja za sporadične, kar pomeni, da niso povezani s specifičnimi genetskimi mutacijami (7).

Diagnoza pasje kognitivne disfunkcije

Kljub pogostosti CCD je le malo primerov dejansko diagnosticiranih. To je v veliki meri posledica trenutnega načina diagnosticiranja, ki temelji na izključevanju drugih možnih obolenj s podobnimi simptomi (npr. možganski tumorji, hipertenzija, metabolična obolenja, hormonska neravnovesja, druga nevrološka obolenja). Končna diagnoza temelji na podlagi značilnih kliničnih znakih, kot so dezorientacija, spanje podnevi in nemirnost čez noč, spremenjene socialne interakcije, zmanjšana interakcija z lastniki, anksioznost, izguba priučenih vedenj in spremembe v aktivnosti. Diagnoza je v veliki meri odvisna od opažanj lastnikov in veterinarjev. Veliko simptomov CCD je spregledanih, saj so pripisani normalnemu staranju psa. Veliko veterinarjev pri diagnosticiranju uporablja različne

vprašalnike, s katerimi ocenijujejo stopnjo kognitivnega upada. Postavitev diagnoze s pomočjo slikanja z magnetno resonanco (MRI) je pri psih redka, predvsem zaradi zapletov v povezavi z anestezijo in visokimi stroški. Na MRI lahko pri psih s CCD, podobno kot pri ljudeh z AB, opazimo atrofijo možganov, povečanje ventriklov in razširjene ter dobro razmejene žlebove možganov (7).

Biomarkerji

NB so izredno zahtevne za diagnozo, še posebej v zgodnjih fazah. Zaradi tega si številni raziskovalci že dolgo prizadevajo odkriti biomarker, ki bi omogočil hitrejšo diagnozo ali celo napovedal razvoj AB pri ljudeh. Doslej so odkrili več potencialnih markerjev v krvi in cerebrospinalni tekočini, vendar se nobeden od teh še ne uporablja rutinsko v klinični praksi. V humani medicini se za zgodnjo diagnozo AB najpogosteje uporabljajo biološki označevalci Aβ, celokupnega tau in hiperfosforiliranega tau v cerebrospinalni tekočini, poleg tega pa tudi pozitronska emisijska tomografija (PET) za prikaz depozitov amiloida in tau v možganih. (7).

Za pse trenutno ne obstajajo biološki označevalci, ki bi olajšali diagnozo CCD. Obstajajo študije, ki raziskujejo $A\beta_{42}$ v plazmi kot potencialni biomarker, vendar so rezultati teh raziskav zelo raznoliki. V nekaterih študijah so odkrili znižan nivo Aβ v plazmi, kar bi lahko bila posledica kopičenja Aβ v možganih. Podobno so ugotovili tudi pri ljudeh z Alzheimerjevo demenco. Pri zdravih psih, pri katerih so se zaradi staranja razvili Aβ depoziti, so ugotovili znižan nivo $A\beta_{42}$ v cerebrospinalni tekočini, medtem ko nivo $A\beta_{40}$ ni bil znižan. V eni študiji so prav tako poročali o povišanih koncentracijah laktata, piruvata in kalija v cerebrospinalni tekočini, kar je bilo povezano z močnim kognitivnim upadom, vendar nobeden od teh biomarkerjev še ni bil potrjen kot diagnostično zanesljiv (7).

Terapija pasje kognitivne disfunkcije

Možnosti zdravljenja CCD trenutno vključujejo preprečevanje bolezni ter upočasnitev in/ali izboljšanje kognitivnega upada pri psih. Na voljo so določena zdravila in prehranski dodatki za starejše pse, ki naj bi delovali nevroprotektivno, bodisi s povečanjem pretoka krvi v možgane ali z antioksidativnim delovanjem. Anksioznost in agresivnost, ki pogosto spremljata CCD, je mogoče zdraviti z antidepresivi. Upočasnitev napredovanja bolezni bi lahko dosegli tudi z dieto, bogato z antioksidanti, v kombinaciji z obogatitvijo okolja in povečanjem aktivnosti psov, kar spodbuja delovanje možganskih funkcij (7).

2.3.2 MAČKE

Pri domačih mačkah, podobno kot pri nekaterih drugih domačih živalih, se NB razvijejo spontano. Študije na možganih naravno postaranih mačk so, poleg izgube nevronov v hipokampusu, pokazale prisotnost Aβ depozitov in NFT, ki bi lahko prispevali h kognitivnemu upadu, čeprav ta povezava še ni dokončno uveljavljena (7). V primerjavi s psi je razumevanje teh procesov pri mačkah manj raziskano in manj podrobno (9).

Stanje, podobno AB pri ljudeh in CCD, ki lahko prizadene starejše mačke, je sindrom kognitivne disfunkcije (angl. *Cognitive dysfunction syndrome* ali CDS), pri katerem kognitivni upad vodi v razvoj demence. Do razvoja obolenja najverjetneje pride zaradi več sprememb v možganih, kot so oksidativni stres, vaskularne spremembe in moten cerebrovaskulatni pretok krvi. Klinični znaki so primerljivi s klinično sliko pri psih s kognitivno motnjo (dezorientacija, spremenjena interakcija z lastniki, spremembe v stopnji

aktivnosti, motnje ritma spanja, izguba spomina, anksioznost). Podobno klinično sliko pa lahko opazimo tudi pri številnih drugih stanjih, kot so hipertenzija, hipertiroidizem, bolečina (pogosto zaradi osteoartritisa) in drugih, zato je pomemben podroben klinični pregled starejših mačk, da se določi vzrok teh vedenjskih sprememb. Veliko lastnikov te spremembe obravnava kot del normalnega procesa staranja in posledično ne obvesti veterinarja, kar še dodatno oteži pravočasno diagnozo. V raziskavi, ki je temeljila na anketnih vprašalnikih, je 36 % lastnikov mačk, starih 7 do 10 let, opazilo vedenjske spremembe, povezane s staranjem (uriniranje na neobičajnih mestih, spremembe v aktivnosti). Pri mačkah starih 16 do 19 let, se je ta odstotek povečal na 88 %. Prevalenca CDS pri mačkah, starih med 11 in 14 let, je okoli 28 %, pri mačkah, starejših od 15 let, pa se zviša na 50 % (9).

Patologija mačjega sindroma kognitivne disfunkcije

Podobno kot pri ljudeh so v možganih starejših mačk opazili atrofijo, izgubo nevronov, povečanje velikosti prekatov, razširitev žlebov, perivaskularne spremembe, kopičenje lipofuscina, Aβ depozite in hiperfosforilizacijo proteina tau. Te spremembe so običajno manj izrazite kot pri ljudeh. Holinergični sistem je prizadet tako pri AB kot CDS, pri čemer lahko izguba holinergičnih nevronov neposredno vpliva na kognitivne funkcije. Pri mačkah, starih 15 do 18 let, so v primerjavi z mlajšimi opazili degeneracijo aksonov ter izrazito zmanjšanje velikosti holinergičnih nevronov in dolžine dendritov v lokusu ceruleusu. Prizadeto je tudi področje hipokampusa. Izguba nevronov je najhujša ob prisotnosti plakov Aβ in hiperfosfolirilanega tau. Plaki Aβ so v mačjih možganih prisotni samo intracelularno in imajo v primerjavi s plaki pri ljudeh bolj difuzno razporeditev ter manj zrelo strukturo (9). Plake večinoma sestavlja $A\beta_{42}$, medtem ko $A\beta_{40}$ pri mačkah ni prisoten (10). Nekatere študije niso našle dokazov o prisotnosti NFT, medtem ko so druge zaznale depozite, ki predstavljajo zgodnjo fazo v njihovega nastanka, kar pomeni, da povezava med NFT in CDS še ni povsem razjasnjena. Hiperfosfolirilan tau znotraj nevronov je mogoče najti tudi pri mačjih mladičih v zgodnjem poporodnem obdobju, kot posledica ishemije in napadov. V povezavi s staranjem in CDS so pri mačkah v možganih opazili vaskularne spremembe, in sicer mikro-krvavitve, infarkte, ne-lipidno obliko arterioskleroze in kopičenje Aβ v obliki plakov tudi okoli krvnih žil (9).

Diagnoza mačjega sindroma kognitivne disfunkcije

Diagnoza CDS pri mačkah je, podobno kot pri psih s kognitivno motnjo, zahtevna, saj je klinična slika pogosto nejasna in kompleksna. Ključno je, da se pred končno diagnozo izključijo vsa druga možna obolenja, še posebej zato, ker se pri starejših mačkah pogosto prekrivajo različna zdravstvena stanja. Za postavitev diagnoze je potrebno celovito ocenjevanje vseh, tudi preteklih, zdravstvenih in vedenjskih težav ter natančen klinični pregled (9).

Terapija mačjega sindroma kognitivne disfunkcije

Za CDS pri mačkah trenutno ni specifičnega zdravila, obstajajo pa načini za izboljšanje kakovosti življenja pacientov. Zdravljenje je podobno terapiji za CCD in vključuje obogatitev okolja, diete bogate z antioksidanti, prehranska dopolnila in nekatera zdravila. Obogatitev okolja pomeni zagotovitev miselne stimulacije in povečanje aktivnosti mačk, kar se priporoča predvsem mlajšim mačkam kot preventiva. Pri starejših mačkah pa lahko pretirane spremembe okolja povzročijo stres in dodatno poslabšajo simptome CDS. Kot prehransko dopolnilo se lahko uporablja S-adenozil-metionin, ki lahko izboljša kognitivne

funkcije, ter različni antioksidanti in vitamini. Uporabljajo se tudi antidepresivi in anksiolitiki, vendar veliko zdravil še ni bilo testiranih na mačkah (9).

2.3.3 KONJI

Klinični znaki, podobni kognitivni motnji, se lahko pojavijo tudi pri konjih. Kljub temu ne obstajajo natančne raziskave, ki se bi osredotočale na starostne spremembe in nevrološke nepravilnosti v njihovih možganih. Prav tako ni znanih stanj, ki bi jih pri konjih povezovali s kopičenjem patoloških proteinov, značilnih za demenco. V eni študiji so sicer odkrili prisotnost tau proteina znotraj nevronov v področju hipokampusa, medtem ko NFT niso zaznali. V raziskavi iz leta 2018 so ovrgli prepričanje, da bi lahko stereotipija pri konjih bila posledica kognitivnih nepravilnosti (7).

2.3.4 DRUGE ŽIVALSKE VRSTE

Do razvoja NB najverjetneje prihaja pri številnih drugih vrstah sesalcev, vendar je na voljo zelo malo literature, ki bi to podrobno opisovala. Večina raziskav se osredotoča na ugotavljanje prisotnosti Aβ plakov, fosforiliranega tau in/ali NFT, ki jih lahko odkrijemo postmortalno, o kognitivnem upadu za časa življenja pa običajno ni podatkov (11). Slednje je pri prostoživečih živalih še težje opazovati. Poročila o difuznih depozitih Aβ v parietalnem korteksu in gostejših senilnih plakih v malih možganih prihajajo iz raziskav na delfinih. Razvoj amiloidnih plakov in prisotnost fosforiliranega tau so opazili pri ovcah, kozah, gepardih, bizonih, medvedih in večini nečloveških primatov. Vendar večina teh vrst nima prisotnih NFT v osrednjem živčnem sistemu. V možganih rjavega lemurja, opice rezus, pavijana, zajca, gvanaka in bizona so našli večjo količino fosforiliranega proteina tau, medtem ko so NFT odkrili v možganih starega bizona (7).

V študiji (11) so pri postaranih miših linije C57BL/6J, starih 15 mesecev, odkrili ekstracelularne agregate, ki so podobni difuznim amiloidnim plakom, opaženim pri pacientih z AB. Pri mlajših miših je bil nivo Aβ pod mejo detekcije. Amiloidne plake so zaznali v citosolu in lizosomih nevronov v temporalnem korteksu, cingularnem področju, mostu (pons) in malih možganih, kot tudi ekstracelularno v periventrikularnem področju. Na podlagi teh ugotovitev so postarane miši, vsaj linije C57BL/6J, predlagali kot primeren model za preučevanje AB. Zaradi povezave med staranjem in boleznimi, povezanimi s kognitivnim upadom, so v študiji (12) ugotavljali primernost miši kot model za preučevanje starostnih sprememb. Ugotovili so, da prihaja s starostjo do strukturnih sprememb v možganih, kot so zmanjšanje debeline skorje, povečanje možganskih prekatov in nastanek mikrokrvavitev, zlasti v talamusu. Zaradi teh dognanj so zaključili, da bi miši lahko služile kot model za raziskovanje kognitivnih motenj, povezanih s starostnimi spremembami v ožilju ter demence.

2.3.5 SLONI

Sloni veljajo za dolgo živeče sesalce, ki pogosto dočakajo več kot 70 let, kar jih postavlja v zanimiv položaj za raziskovanje procesov staranja in bolezni, ki prizadenejo predvsem starejše ljudi, kot sta rak in kognitivni upad. Raziskovalci predvidevajo, da so sloni razvili posebne mehanizme, ki jih ščitijo pred boleznimi, povezanimi s starostjo. Za slone je značilna velika odvisnost od socialnih vezi, odličen spomin in kognicijske sposobnosti, kar jih naredi zelo podobne ljudem. Eden izmed ključnih mehanizmov, ki bi lahko prispeval k daljši življenjski dobi slonov, je večkratna kopija tumor supresorskega gena TP53, znanega

kot varuh genoma. Ta gen kodira protein p53, ki ima pomembno vlogo pri popravilu DNK in preprečevanju nenadzorovane rasti celic. Pri ljudeh obstaja samo ena kopija tega gena, medtem ko so pri slonih našli od 19 do celo 24 kopij (13). Protein p53 ima izredno pomembno vlogo pri AB, saj ne le ščiti pred oksidativnim stresom, temveč je del obrambe pred nevrodegeneracijo. Povezali so ga tudi s kopičenjem amiloidnih plakov v možganih, saj ima vsaka deregulacija tega proteina vpliv na signalne poti, ki so povezane s patogenezo AB (14). Kljub dolgemu življenju sloni redko kažejo vedenjske spremembe povezane s staranjem (kognitivni upad, socialna izolacija), skozi celotno življenje pa se zanašajo na svoj izredno dober spomin. Posledično bi sloni lahko bili zanimiv model za raziskovanje o kognitivnem upadu povezanem s starostjo, saj je možno, da so med evolucijo razvili specifične adaptacije. Raziskovalci domnevajo o možnosti, da so sloni razvili zaščitne mehanizme, ki upočasnijo nevrodegeneracijo ter bi lahko služili kot model za preučevanje AB in drugih oblik demence, saj do sedaj v njihovih možganih niso odkrili sprememb, značilnih za te bolezni ali za nevrodegeneracijo, ki bi nastala kot posledica staranja (13).

2.4 ŽIVALSKI MODELI ZA PREUČEVANJE ALZHEIMERJEVE BOLEZNI

Patogeneza AB še vedno ni povsem pojasnjena, kar je v veliki meri tudi posledica pomanjkanja ustreznih živalskih modelov. Z modeli za preučevanje AB skušajo posnemati patološke značilnosti bolezni, zlasti plake *Aβ* in NFT. To dosežejo z uvajanjem z mutacij, povezanih z AB (APP, PSEN1, PSEN2 in mutacije tau) (15).

Največ raziskav je bilo opravljenih na transgenih laboratorijskih glodavcih, za katere je značilno, da načeloma ne razvijejo spontane oblike NB, njihova sposobnost posnemanja AB pa je le delna. Kljub temu, da je kopičenje proteinov v možganih uveljavljen mehanizem v patogenezi AB, je malo znanega o začetnih fazah tega procesa *in vivo*. Študije na človeških možganih so močno odvisne od rezultatov postmortem preiskav, zato se iščejo novejši in boljši modeli za raziskave, ki bi omogočili vpogled v zgodnje faze bolezni, v katerih prihaja do razvoja proteinskih plakov (7). Z razvojem transgenih tehnik se v namen preučevanja mehanizmov nastanka AB in preizkušanja novih načinov zdravljenja uporabljajo različne živali, tako vretenčarji kot nevretenčarji. Največ raziskav se osredotoča na družinsko obliko AB, povezano s specifičnimi genskimi mutacijami, medtem ko za spontano obliko AB ne obstajajo dobro uveljavljeni živalski modeli, saj ni neposredno povezana z nobeno gensko mutacijo. Prav tako različni modeli niso zmožni dovolj natančno posnemati patoloških dogajanj, predvsem v predkliničnih fazah bolezni in fazi blage kognitivne okvare. Osredotočanje na te faze bolezni bi lahko prispevalo k hitrejši diagnozi in preventivi bolezni (15).

Živalske modele lahko glede na različne patološke in patofiziološke dejavnike razdelimo na spontane, interventne in gensko spremenjene modele. Spontano kopičenje Aβ in hiperfosforiliranega tau opazimo pri nekaterih vrstah nečloveških primatov, vendar pogosto zaznamo samo eno od teh patologij, ne pa obeh hkrati. Za te živali je značilna dolga življenjska doba in AB podobni simptomi ter značilne patološke spremembe, do katerih pa prihaja pri starejših. Kljub temu, da primati služijo kot dober model za raziskave spontane AB, številni dejavniki, kot so visoki stroški vzdrževanja, nevarnost prenosa zoonoz in izzivi pri ravnanju z njimi, omejujejo njihovo uporabo v raziskavah. Pri interventnih modelih so AB podobni simptomi in patološke spremembe, predvsem nevroinflamacija, *in vivo* povzročene z uporabo kemikalij. Velik prispevek k študiju, predvsem človeških bolezni, pa imajo gensko spremenjene (transgene) živali (15).

2.4.1 Nečloveški primati

Kljub omejenemu število študij, ki so uporabile nečloveške primate kot modele za AB, je očitno, da postarane opice spontano kažejo znake kognitivnega upada. Patološke spremembe pri teh živalih so zelo podobne tistim pri ljudeh z AB. Rezus makaki (*Macaca mullata*) pri starosti 20 let kažejo znake vedenjskih in kognitivnih nepravilnosti, vključno z amiloidnimi plaki in biokemijskimi spremembami, podobnimi AB. Pri 20 % starejših makakov so našli tudi izražen ApoE. Podobne spremembe v možganih so našli pri *M. arctoides*, vendar se pri njih vedenjske motnje pojavijo kasneje. Ker spontan razvoj AB podobnih znakov traja več let ali celo desetletij, so začeli z vbrizgavanjem živalskih modelov z različnimi snovmi za preučevanje patologije, saj so pretekle študije pokazale, da injiciranje Aβ oligomerov v lateralni ventrikel makakov povzroči njihovo akumulacijo, izgubo sinaps, hiperfosforilizacijo tau in aktivacijo glija celic (15).

Uporaba nečloveških primatov kot modelov za AB lahko pripomore k boljšemu razumevanju bioloških in okoljskih dejavnikov, povezanih s to boleznijo ter k preučevanju patogeneze in učinkov terapevtskih učinkovin. Vendar je treba upoštevati, da se patologija v nekaterih pogledih med opicami in ljudmi razlikuje, zlasti glede na lokacijo plakov in prisotnost NFT (15).

2.4.2 Pasji modeli

Psi so zelo zanimivi kot model za AB, predvsem zaradi podobnosti med CCD in AB. Uporabljajo jih kot model za sporadično obliko AB, saj se Aβ naravno kopiči v njihovih možganih, prav tako pa je raven Aβ plakov povezana s kognitivnim upadom, kar je značilno tako za pse kot za ljudi. Podobne so tudi patološke spremembe v možganih in simptomi obolenj, zaradi pomanjkanja NFT pri psih pa se sklepa, da je CCD primerljiv z začetnimi fazami AB (7, 15).

2.4.3 Genetsko spremenjeni modeli miši

Pri glodavcih se AB naj ne bi razvila spontano ali vsaj ne v obliki, primerljivi z AB pri ljudeh. Glodavci se večinoma uporabljajo za raziskovanje družinske oblike AB oziroma AB z zgodnjim začetkom, pri čemer se v modele vključijo človeški geni, povezani z razvojem te bolezni. Človeški pacienti s tem obolenjem so pogosto nosilci genske mutacije v APP genu ali genih, ki kodirajo PSEN1 ali PSEN2. Med transgenimi modeli so miši najpogostejše zaradi svojih številnih prednosti, vključno s kratkim reprodukcijskim ciklom, relativno nizkimi stroški vzdrževanja in dobro uveljavljenimi raziskovalnimi postopki. Poleg tega so miši idealne za preučevanje osnovnih mehanizmov učenja in spomina (15).

Prvi model transgene miši, ki je prikazoval AB podobno patologijo, so razvili leta 1995. Je tudi prvi model, pri katerem so opazili očiščenje amiloida po imunoterapiji. Amiloidni plaki se pri teh miših razvijejo pri 6-9 mesecih starosti, s staranjem pa kažejo motnje pri zaznavanju prostora. Drugi modeli transgenih miši, poimenovani Tg2576 in APP23, se od prejšnjega razlikujejo v mestu mutacije in času pojava amiloidnih depozitov ter motnjah spomina. Nekateri modeli vsebujejo dvojne mutacije gena. Med njih spadata modela TASD in TgCRND8, ki v primerjavi z modeli z eno mutacijo kažejo začetek AB podobne patologije prej. Razvili so tudi modele, pri katerih se patologija AB začne pojavljati naravno, za razliko od drugih se Aβ plaki pri njih eksponentno povečujejo. Eden izmed najbolj pogosto uporabljenih modelov za preučevanje taupatije in amiloidne patologije je 3xTg-AD. Model 5xFAD je znan po najhitrejšem razvoju bolezni in ekstremni patologiji, saj se senilni plaki

pojavijo že pri starosti 2 mesecev, kognitivni upad pa se pojavi pri 4-6 mesecih, kar je hitreje kot pri drugih modelih. Razvili so tudi modele miši, ki so nosilci ApoE gena in modele z mutacijami, povezanimi z družinsko obliko AB. Določene modele so razvili s križanjem različnih modelov med seboj (15).

2.4.4 Genetsko spremenjeni podganji modeli

V primerjavi z mišmi so podgane fiziološko in genetsko bolj podobne ljudem. Zaradi večjih teles in velikosti možganov se za določene poskuse lažje uporabljajo, prav tako pa je preučevanje njihovega vedenja bolj natančno. Kljub temu je razvoj transgenih podgan počasnejši, predvsem zaradi nižje reproduktivne sposobnosti, večjih zahtev po prostoru in omejenih tehnik modificiranja. Modeli se med seboj razlikujejo v času nastanka amiloidnih plakov. Pri nekaterih se ti začnejo pojavljati pri 17-18 mesecih starosti, medtem ko se pri drugih pojavijo že pri 9 mesecih. Kljub temu je pri nekaterih modelih količina plakov majhna (tudi pri starejših). Modeli so z vidika preučevanja drugih patologij pomanjkljivi, nekateri pa poginejo prehitro zaradi hipertenzije, bolezni ledvic in imunosupresije, kar bi lahko bila posledica insercije več genov. Za podganji model Tg F344 je značilna močna akumulacija Aβ, povezana s starostjo, in strukture, podobne NFT, ki so opazne samo pri nečloveških primatih in o njih še niso poročali pri nobenem drugem podganjem ali mišjem modelu (15).

2.4.5 Navadna cebrica

Navadna cebrica je vrsta ribe, ki predstavlja zelo pomemben model za preučevanje molekularnih in genetskih mehanizmov raznolikih vedenjskih oblik in NB, kot je AB. Njena prednost je enostavna gojitev, hitra zrelost in visoka homolognost, saj je kar 84 % genov, povezanih z demenco, homolognih človeškim genom. Kot modeli so uspešno uporabljene za preizkušanje zdravil za različne bolezni, saj se lahko farmakološke učinkovine dodajo v akvarijsko vodo za sistemsko aplikacijo, kjer se absorbirajo skozi kožo, ali pa se aplicirajo neposredno na določeno mesto. Na njih so testirali tudi več zdravil, namenjenih za zdravljenje AB, vključno z donepezilom in memantinom. Poleg tega cebrice kažejo številne kognitivne in vedenjske nepravilnosti, podobne tistim pri AB (15).

2.4.6 Vinska mušica

Vinska mušica (*Drosophila melanogaster*) je insekt s kratkim reprodukcijskim ciklom in življenjsko dobo okoli 30 dni. Kot model se uporablja za preučevanje vplivov genskih mutacij na vedenje, saj prikazujejo različna vedenja, značilna za sesalce, kot so pozornost, pričakovanje, agresija, učenje, spomin, orientacija, spanje, cirkadiani ritem. Na njih je mogoče izvesti različne genetske manipulacije, ki so pri sesalcih neizvedljive. Transgene modele mušic za preučevanje AB lahko razdelimo v tri tipe, in sicer modele na osnovi ɣ-sekretaze, tau in APP ali Aβ. Prvi model lahko pomaga pojasniti vlogo gena presenilin pri razvoju in degeneraciji ter molekularnih mehanizmov bolezni. Na modelih, ki temeljijo na osnovi tau, so opazili AB podoben fenotip pri mušicah z ekspresijo človeškega tau. Obstajajo tudi modeli z ekspresijo obeh proteinov, $A\beta_{42}$ in tau, ki se uporabljajo za preučevanje njunih medsebojnih odnosov. Najpogostejši model vinske mušice za AB temelji na APP ali Aβ, za katerega je značilno kopičenje Aβ in starostno pogojena smrt nevronov. Razvili so tudi modele z direktno ekspresijo $A\beta_{42}$ v možganih, ki so namenjeni boljšemu preučevanju amiloidnih plakov (15).

2.4.7 *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans je nematod, ki se uporablja kot poenostavljen model za preučevanje nevronov. Kljub temu, da ne dosega evolucijske kompleksnosti višje razvitih organizmov, ima številne molekularne poti in celične mehanizme skupne s sesalci, kar omogoča primerjalne študije med njimi in človekom ter ima velik potencial kot model za preučevanje človeških bolezni. *C. elegans* je zmožen razlikovati med različnimi vonjavami, hrano in temperaturo. Prvi model za AB so razvili leta 1995 na podlagi amiloidne hipoteze, kasnejši modeli pa vključujejo ekspresijo človeških ApoE alelov, bodisi z $A\beta_{1-42}$ ali brez (15).

2.4.8 Kvasovke

Kvasovke sicer nimajo živčnega sistema, vendar imajo visoko homologne molekularne signalne poti in proteine s človeškimi ter dobro opredeljeno gensko zaporedje. Ti modeli za preučevanje patologije AB so pripeljali do pomembnih odkritij, povezanih s celičnimi potmi pri obdelavi APP in oligomerizaciji Aβ. Za preučevanje procesa obdelave APP pri kvasovkah dosežejo z indukcijo ekspresije človeškega APP gena, nastanek β- in ɣ- sekretaz v kvasovki pa dosežejo z ekspresijo funkcionalnega človeškega APP gena in izdelanih kompleksov ɣ-sekretaze. Inducirajo lahko tudi ekspresijo β-sekretaze. In vivo pa je možno modelirati tudi Aβ oligomerizacijo (15).

2.5 POTENCIALNI MODELI ZA SPORADIČNO OBLIKO ALZHEIMERJEVE BOLEZNI

Sporadična oblika AB (SAB) je najpogostejša oblika AB, za katero velja, da ni neposredno povezana z nobeno genetsko mutacijo, v njeno patogenezo pa je povezanih več različnih dejavnikov. Posledično je razvoj modelov za to obliko bolezni zahteven, rezultati raziskav pa manj zanesljivi. Poleg tega pa obstaja precejšna razlika med patologijo SAB človeka in živalskih modelov. Idealni model bi moral poleg posnemanja patoloških sprememb in simptomov te spremembe prikazati v enakem časovnem zaporedju, kot se pojavljajo pri dejanski bolezni. Zato, ob upoštevanju hipoteze o nastanku AB v povezavi z vnetnim odzivom, bi morala biti zgodnja kronična nevroinflamacija prisotna že pred kopičenjem Aβ plakov in hiperfosforilacijo tau proteina. Trenutno obstaja več potencialnih SAB modelov glodavcev, ki temeljijo na hipotezi o nevroinflamaciji (15).

2.5.1 Modeli inducirani s sintetično dvojno vijačno RNK

Sintetična dvojna vijačnica RNK (angl. *Polyriboinosinic-polyribocytidylic acid* oziroma Polyl:C) pri modelih povzroči prirojene imunske odzive. Polyl:C inducirani modeli služijo za preučevanje posledic dolgotrajne nevroinflamacije na kognitivne sposobnosti. Pri izpostavljenih plodovih so v starosti treh tednov zaznali povišane ravni citokinov v možganih, medtem ko hiperfosforilacija tau proteina ni bila prisotna vse do starosti treh mesecev. V tem modelu so bile patološke spremembe in kognitivni upad podobni tistim pri AB, vendar depoziti v možganih niso odražali terminalne faze bolezni. Zato so ti modeli primerni za preučevanje začetnih faz bolezni (15).

2.5.2 Modeli inducirani s okadaično kislino

Okadaična kislina (OKK) je toksin, ki selektivno inhibira serinske/treoninske fosfataze 1 in 2A. Pri AB so ugotovili zmanjšano aktivnost protein fosfataze tipa 2A, injiciranje OKK podganam pa je povzročilo okvaro spomina, kar nakazuje na možnost uporabe tega modela

za preučevanje AB. Večkratna infuzija OKK je pri podganah povzročila več patologij, povezanih z AB, kot so hiperfosforilizacija tau, celična smrt z apoptozo in depoziti Aβ, vendar do razvoja NFT ni prišlo (15).

2.5.3 Modeli inducirani s kolhicinom

Injiciranje kolhicina v visokih odmerkih lahko privede do razvoja patologij, povezanih z AB, kognitivnih motenj in vedenjskih sprememb. Poleg tega lahko povzroči hude spremembe v hipokampusu, ki vodijo do izgube nevronov in kognitivnega upada. Kasnejše študije so zaznale tudi nevroinflamacijo. Kljub temu pa na tem modelu ni bilo opravljenih dovolj raziskav, da bi z gotovostjo ugotovili, ali so spremembe res podobne tistim pri AB (15).

2.5.4 p25 transgeni model

Pri AB so opazili kopičenje nenormalnega p25, pri miših pa lahko prekomerna ekspresija človeškega p25 povzroči hiperfosforilizacijo proteina tau, kar vodi do razvoja patologije, podobne AB. Ti transgeni modeli miši najprej razvijejo nevroinflamacijo, ki je prva zaznavna patološka sprememba in nastane pred drugimi. Patološki procesi sledijo kronološkemu zaporedju, saj pride do vnetja že v prvem tednu po prekomerni ekspresiji p25, medtem ko se hiperfosforilacija tau proteina in nastanek amiloidnih depozitov pojavita po štirih oziroma osmih tednih. Kognitivni upad je zaznaven po šestih tednih (15).

2.5.5 Ankyrin G (AnkG) transgeni modeli

AnkG je protein, ki se nahaja na začetnem segmentu aksona nevronov, kjer povezuje citoskelet z ionskimi kanali na membrani, kar omogoča nastanek akcijskih potencialov na tem mestu. Mutacije v genu za AnkG so povezane s kognitivno disfunkcijo in AB. Pri klasičnih modelih miši za AB je njegova ekspresija manjša, kar vodi do nepravilnega delovanja začetnega segmenta aksona. Obstajajo številne linije miši, ki izražajo različne izooblike (190 kDa, 270 kDa in 480 kDa) AnkG, namenjene preučevanju njegove vloge pri patologiji AB (15).

2.5.6 Modeli inducirani s skopolaminom

Skopolamin je dobro poznan alkaloid z antiholinergičnim učinkom, ki se pogosto uporablja za povzročitev kognitivnega upada v eksperimentalnih raziskavah. Pri miškah njegova aplikacija v amigdalo ali intraperitonealno povzroči poslabšanje spomina in sposobnosti učenja, saj vodi do poškodbe nevronov v hipokampusu. Ker je upad funkcije holinergičnega sistema povezan z AB, bi lahko modeli, inducirani s skopolaminom, služili za preučevanje te bolezni (16).

2.5.7 Modeli inducirani z aftinom

Aftin je sposoben povzročiti nastanek $A\beta_{1\text{-}42}$ iz APP preko aktivacije ɣ-sekretaze v celičnih kulturah. Intracerebroventrikularna aplikacija mišim poveča nivo $A\beta_{1\text{-}42}$ v hipokampusu možganov, vendar ne $A\beta_{1\text{-}40}$. V hipokampusu so opazili tudi povečano lipidno peroksidacijo (pokazatelj oksidativnega stresa). Zaznali so še zvišane vrednosti pro-inflamatornih citokinov, znake astrocitne reakcije in zmanjšano sposobnost učenja. Sistemska aplikacija aftina je povzročila le oksidativni stres in manjšo sposobnost učenja (17).

2.6 MODELI, KI TEMELJIJO NA INDUCIRANIH PLURIPOTENTNIH MATIČNIH CELICAH

V zadnjih dveh desetletjih inducirane pluripotentne matične celice (iPSC) vse bolj pridobivajo na pomenu za preučevanje bolezni in odkrivanju zdravil *in vitro*. Njihova uporaba je izrednega pomena pri raziskovanju AB, predvsem odkrivanje novih mehanizmov na molekularni ravni, ki bi lahko pripomogli k razvoju in preizkušanju novih učinkovin za zdravljenje te bolezni, ki še vedno ostaja neozdravljiva (18).

Odkritje iPSC in sistema CRISPR/Cas9 sta omogočila velik napredek pri modeliranju človeških boleznih, povezanih s centralnim živčnim sistemom, in preizkušanju ter odkrivanju različnih zdravil. S pomočjo različnih tehnik diferenciacije, pri katerih večina strategij posnema razvoj in vivo, lahko iz iPSC nastanejo živčne matične celice, nevroni, glija celice in možganski organoidi, ki jih lahko uporabimo kot modele za preučevanje AB in testiranje zdravil. Postopki diferenciacije običajno zahtevajo določene medije celičnih kultur, rastne faktorje in majhne inhibitorne molekule, ki jih zaporedno dodajajo v gojišče celične kulture. Vse bolj pogosti so postopki, ki temeljijo na prekomerni ekspresiji specifičnih transkripcijskih faktorjev, ki usmerjajo diferenciacijo proti določenemu tipu celic. Vse *in vitro* metode lahko razdelimo na dvodimenzionalne (2D), pri katerih je lažje kategorizirati celične populacije in trodimenzionalne (3D), ki so bolj kompleksne in bolje posnemajo i*n vivo* dogajanje. Primarno zanimanje za preučevanje NB predstavljajo nevroni, ki lahko *in vitro* nastanejo s pomočjo različnih metod, katerih izbira je odvisna od namena raziskave. Pri nekaterih raziskavah je ustrezneje, da diferenciacija v nevrone poteka spontano brez dodatnih rastnih faktorjev, ki bi jim lahko pomagali premostiti določene probleme nastale ob spontani diferenciaciji. Pri takšnih modelih je potrebno upoštevati, da odsotnost glija celic lahko vpliva na rezultate raziskav, še posebej, če preučevan mehanizem vpliva tudi na druge celice in ne samo na nevrone. Študije so pokazale, da bi tudi astrociti, pridobljeni iz iPSC, lahko služili kot model za preučevanje NB. Uspelo je izolirati Aβ plake, prav tako pa so pri astrocitih ugotovili spremenjeno homeostazo kalcija, moten metabolizem lipidov ter sposobnost preoblikovanja v reaktivne astrocite (18).

Ena izmed omejitev modelov, ki temeljijo na iPSC, je *in vitro* preučevanje patoloških lastnosti NB, povezanih s staranjem, saj se starostni fenotip diferenciranih celic iz iPSC ne ujema s tistim pri celicah *in vivo*. To oviro lahko premagamo na več načinov in sicer s prekomerno ekspresijo progerina, ki povzroči razvoj starostnega fenotipa, z inhibicijo telomeraz, z aplikacijo kemijskih snovi, ki povzročijo stres in posledično starostni fenotip ter z metodo transdiferenciacije somatskih celic neposredno v željen tip celice (18).

Možganski organoidi so trodimenzionalni celični skupki, ki izvirajo iz iPSC in posnemajo fetalni razvoj človeških možganov. Značilnost organoidov je, da lahko pridobijo določene funkcije, ki so prisotne v organu, na podlagi katerega so modelirani. Zato jih lahko uporabimo za preučevanje fetalnega razvoja možganov, tkivne organizacije, staranja, metaboličnih procesov, bolezni in preizkušanje zdravil. Nastanejo s pomočjo vodenih in ne-vodenih metod. Pri vodenih metodah nastanejo organoidi le določenega področja možganov, medtem ko pri ne-vodenih metodah vključujejo več različnih področij znotraj organoidov. Področno specifični organoidi boljše predstavljajo strukturo, celično sestavo in molekularne procese določenega področja možganov ter nastanejo s pomočjo določenih rastnih faktorjev, diferencialnih dejavnikov in celičnih inhibitorjev. Razvoj takšnih 3D modelov odpira nove možnosti za preučevanje možganov, saj lahko bolje posnemajo človeško patologijo v

primerjavi z živalskimi modeli in ponujajo prednosti pred 2D celičnimi kulturami, ki jim manjka kompleksnost značilna za *in vivo* okolje. Poleg tega bi takšni organoidi lahko nastajali tudi na podlagi genetske informacije pacienta. Kljub vsem prednostim pa še vedno obstajajo določene omejitve, kot so pomanjkanje vaskularizacije in staranje, ki otežujejo popolno ujemanje s fiziologijo možganov (18).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Pridobitev in priprava vzorca

V namen raziskave smo, kot vzorce, uporabili možgane miši divjega tipa C57BL/6J in BALB/c različnih starosti. Skupno smo imeli 12 miši: samca in samico C57BL/6J stara 4 mesece, samico BALB/c staro 4 mesece, tri samice BALB/c stare 18 mesecev, dve samici C57BL/6J stari 18 mesecev, samca C57BL/6J starega 20 mesecev in tri samice C57BL/6J stare 24 mesecev. Vir vzorcev je vzrejna kolonija miši na Inštitutu za predklinične vede, VF UL, ki so bile usmrčene iz razloga odvečne (stare) iz vzreje ali na podlagi odobrene priglasitve za delo na tkivih in organih (odločba UVHVVR U34401-15/2021/4). Možgani so bili po odvzetju fiksirani s 4 % paraformaldehidom (perfuzija pri izkrvavljeni živali) in hranjeni v hladilniku. Polovico vzorcev smo vklopili v parafin in rezali z mikrotomom, drugo polovico smo rezali z vibratomom.

3.2 METODE

3.2.1 Postopek imunohistokemije na parafinskih rezinah

Vzorce možganov smo po vključevanju v parafin z Leica TP1020 rezali z rotacijskim mikrotomom (Leica RM2125 RTS) na 5-6 µm debele rezine, ki so bile zbrane iz vodne kopeli (45˚C) na adhezivna predmetna stekla. Osredotočili smo se na regije, ki so v članku (11) označene s C5, C10, C15 in C20. Po atlasu (19) so ta področja ustrezala Bregmi 2.5, 0, -2 in -5.5. Po končanem zbiranju vzorcev na predmetna stekla je sledila faza deparafinizacije in rehidracije, ki smo jo izvedli z namakanjem predmetnih stekel za 5 minut v raztopini Neoclear, seriji padajočih alkoholov in dvakrat v destilirani vodi ter v PBS (fosfatni pufer z NaCl) z 0,05 % Tween 20 na stresalniku. Za izpostavitev antigena smo uporabili citratni pufer (pH 6,0) v mikrovalovni pečici za 5 minut, nato je sledilo 30 minutno ohlajevanje na sobni temperaturi. Za blokado nespecifične vezave smo uporabili BSA (goveji serumski albumin) v PBS Tween 20 za 1 uro. Sledila je inkubacija s primarnimi protitelesi na 4 ˚C preko noči v vlažni komori. Uporabili smo štiri primarna protitelesa proti Aβ (Abcam, ab10148, 1:250), nevronalni sintazi dušikovega oksida (nNOS) v razredčitvi 1:1000 (ImmunoStar, 24287), inducibilni sintazi dušikovega oksida (iNOS) v razredčitvi 1:100 (Novus Biologicals, NB300-60555) in endotelijski sintazi dušikovega oksida (eNOS) v razredčitvi 1:500 (abcam, ab3520). Naslednji dan je sledilo spiranje v PBS na stresalniku in inkubacija z ustreznim (proti kuncu) sekundarnim protitelesom, vezanim s fluoroforom (Cy2-DAR, Jackson ImmunoResearch, 1:100) za 1 uro v vlažni komori pri sobni temperaturi ter spiranje s PBS. Rezine smo analizirali na mikroskopu Nicon Eclipse 80i s programsko opremo NIS-Elements F 2.20.

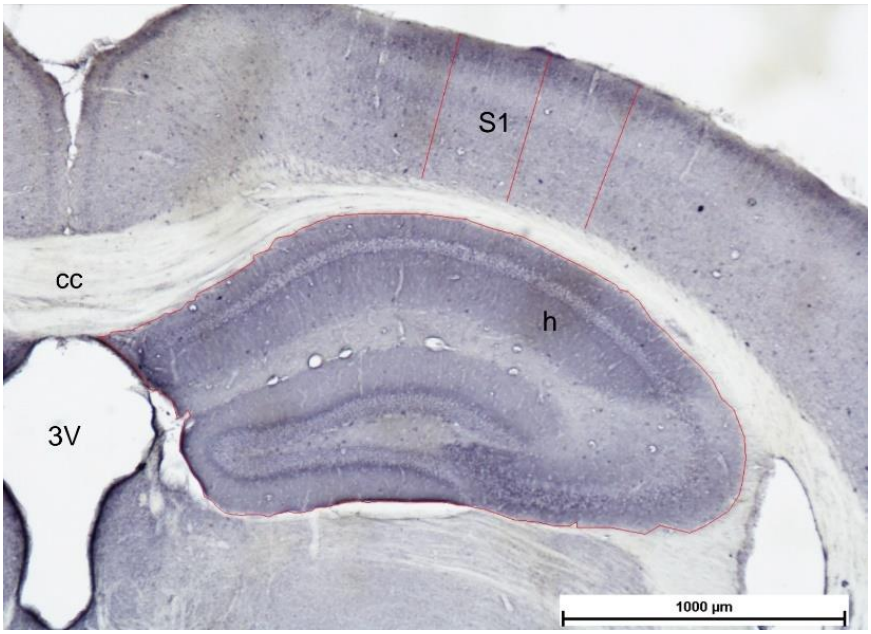
3.2.2 Postopek imunohistokemije na plavajočih rezinah

Vzorce možganov oblite s 5 % agarozo smo rezali z vibratomom Leica VT1000 S na 40 µm debele rezine in pustili čez noč v hladnem PBS. Osredotočili smo se na 6 področij možganov, ki so po atlasu (19) ustrezala Bregmi 2.5, 1, 0, -1.5, -3 in -4.5. Naslednji dan je sledila inkubacija v glicinu in ohlajenem PBS za pol ure na stresalniku in spiranje v ohlajenem PBS. Sledilo je demaskiranje v 0,5 % natrij borovem hidratu v PBS za 15 minut in spiranje v PBS.

Blokiranje nespecifične vezave smo dosegli s 5 % NGS (normalni kozji serum) v 0,5 % Tritonu (Tx) v PBS z 1 % H_2O_2 (vodikov peroksid) za pol ure. Za tem smo rezine inkubirali 36 ur pri 4°C s tremi primarnimi protitelesi: proti nNOS (ImmunoStar, 24287, 1:160) in proti Aβ dveh različnih proizvajalcev, in sicer Abcam (ab10148, kunčje, 1:300) ter BioLegend (800712, mišje, 1:160). Po končani inkubaciji smo spirali s pufrom in inkubirali 2 uri s sekundarnimi protitelesi, vezanimi z biotinom, proti kuncu narejena v oslu (JacksonImmunoResearch, F $(ab')_2$, 1:500) in proti miši narejena v oslu (JacksonImmunoResearch, F $(ab')_2$, 1:2500). Sledilo je spiranje in vizualizacija s kompleksom streptovidinom-peroksidaza za 1 uro. Po spiranju smo za končno barvno reakcijo uporabili raztopino DAB (3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid) in nikljev sulfat. Sledilo je spiranje in prenos rezin na predmetna stekla. Sliko smo analizirali na mikroskopu Nikon ECLIPSE Ni s programsko opremo NIS-Elements BR 4.6.

3.2.3 Meritev površine preseka hipokampusa in možganske skorje

Meritve smo opravili na rezinah možganov pridobljenih po postopku imunohistokemije na plavajočih rezinah (primarno protitelo proti nNOS). Sliko smo analizirali na mikroskopu Nikon ECLIPSE Ni s programsko opremo NIS-Elements BR 4.6. Na podlagi atlasa (19) smo površino preseka hipokampusa (programski ukaz »surface area«) izmerili na področju Bregme -1,5. Na vseh možganih smo opravili dve meritvi (leva in desna polovica možganov), kot je prikazano na sliki 1. Na podlagi atlasa (19) smo meritev debeline možganske skorje opravili v področju primarnega somatosenzornega korteksa (S1) na Bregmi -1,5. Na vsaki polovici možganov smo opravili tri meritve, kot je prikazano na sliki 1. Rezultati so prikazani kot povprečje vrednosti na starostno skupino.

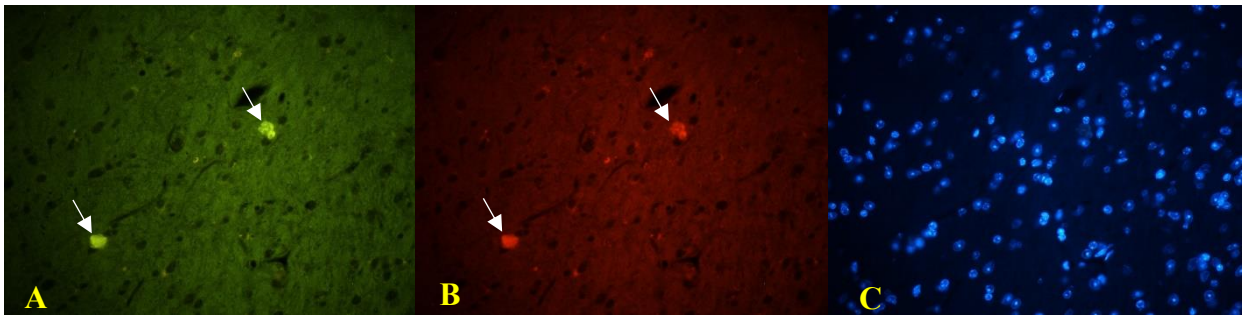


Slika 1: Področje Bregme -1,5, kjer smo opravili meritev obsega (površino preseka) hipokampusa in debelino možganske skorje pri 40x povečavi. cc – možganski prečnik (*corpus callosum*), 3V – tretji ventrikel, S1 – primarni somatosenzorni korteks.

4 REZULTATI

4.1 Imunohistokemični prikaz amiloidnih plakov in izoform sintaze dušikovega oksida na parafinskih rezinah

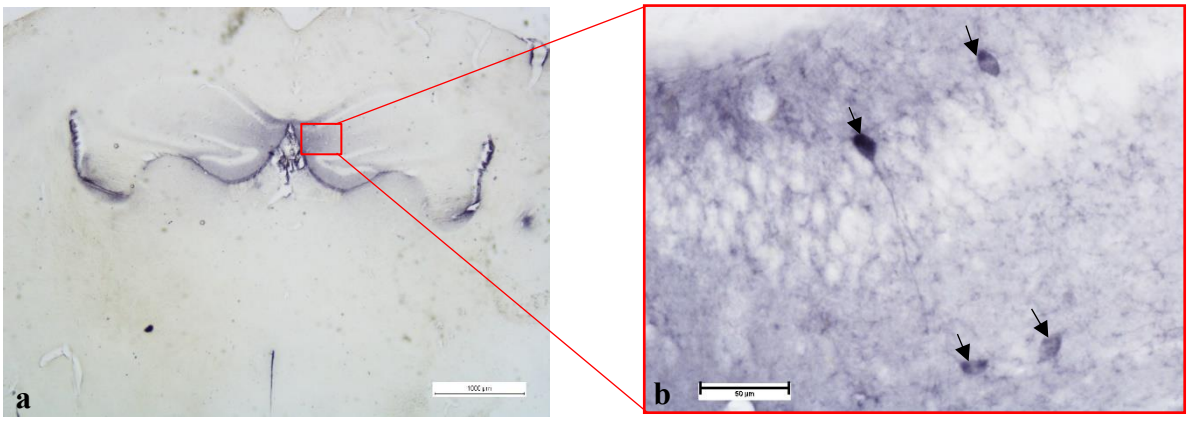
Z analizo možganskih rezin, kjer smo z imunohistokemijo želeli prikazati prisotnost amiloidnih plakov, nismo opazili prisotnosti Aβ. Na zelenem kanalu mikroskopa, kjer smo pričakovali pozitiven signal, smo opazili le manjše obarvane strukture, ki so bile očitne tudi v rdečem kanalu, včasih tudi modrem, zato ocenjujemo, da so bili to zgolj artefakti. Omenjene strukture, prikazane na sliki 2, niso bile povezane z nevroni ali krvnimi žilami, kar smo potrdili z analizo slike na modrem kanalu (barvilo DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol)), ki se uporablja za prikaz celičnih jeder. Pozitivnih signalov na prisotnost izoform sintaze dušikovega oksida (nNOS, iNOS in eNOS) nismo našli.



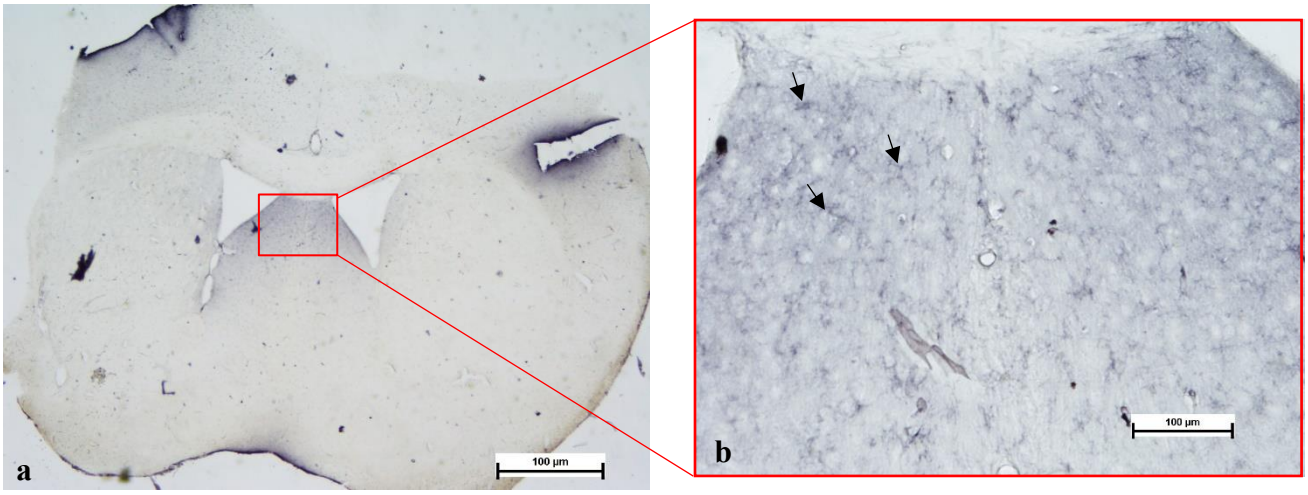
Slika 2: Prikaz nespecifične signalizacije (artefakt) med iskanjem amiloidnih plakov na možganskih rezinah v treh barvnih kanalih – zelenem (A), rdečem (B) in modrem (C), pri 400x povečavi. Z belo puščico je označen artefakt. Prisotnosti amiloidnih plakov nismo zaznali.

4.2 Imunohistokemični prikaz amiloidnih plakov in nevronske sintaze dušikovega oksida na plavajočih rezinah

Pri analizi možganskih rezin smo z metodo imunohistokemije potrdili prisotnost amiloidnih plakov, vendar zgolj s protitelesom proizvajalca BioLegend. Redke pozitivne signale Aβ smo zaznali intracelularno v nevronih, kar je prikazano na sliki 3, medtem ko večjih agregacij, prikazane na sliki 4, nismo mogli zanesljivo potrditi. Opazili smo, da se plaki v določenih predelih možganov konsistentno pojavljajo na istih lokacijah. V začetnih delih možganov, med Bregmo 3 in 1.5, glede na atlas (19), nismo zaznali prisotnosti amiloidnih plakov. V področju Bregme 1 smo opazili Aβ predvsem v lateralnem septalnem jedru. V hipokampusu smo posamezne pozitivne nevrone z intracelularnimi vključki Aβ našli pri vseh živalih, analiziranih s to metodo. Pozitivni nevroni so bili na Bregmi -1,5 prisotni v plasti radiatum (stratum radiatum), plasti oriens in piramidalni plasti hipokampusa, na Bregmi -2 so se nahajali v plasti radiatum, medtem ko so se na področju Bregme -2,5 nahajali predvsem v plasti oriens in piramidalni plasti hipokampusa ter v okolici lateralnega ventrikla. Pozitivne reakcije smo zaznali pri miših, starih 18 in 24 mesecev, medtem ko pri miših, starih 4 mesece, očitne pozitivne reakcije ni bilo. Med različnima linijama miši (C57BL/6J in BALB/c), ki smo jih imeli na voljo, nismo opazili očitnih razlik.

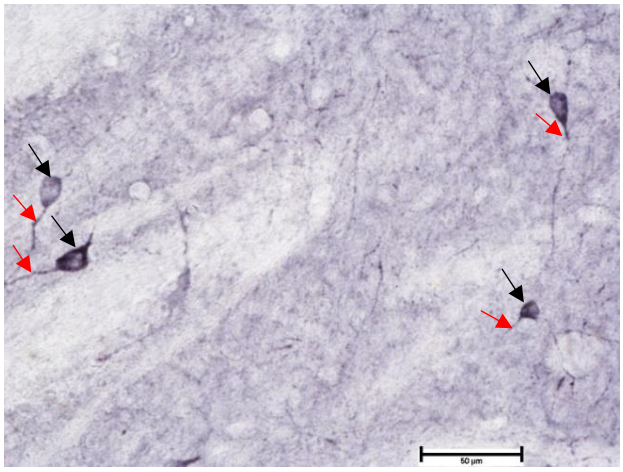


Slika 3: Prikaz intracelularnega Aβ (črna puščica) v nevronih hipokampusa na področju Bregme -1,3 pri 18 mesečni BALB/c miši pri 400x povečavi (slika b); slika a pri 2x povečavi.



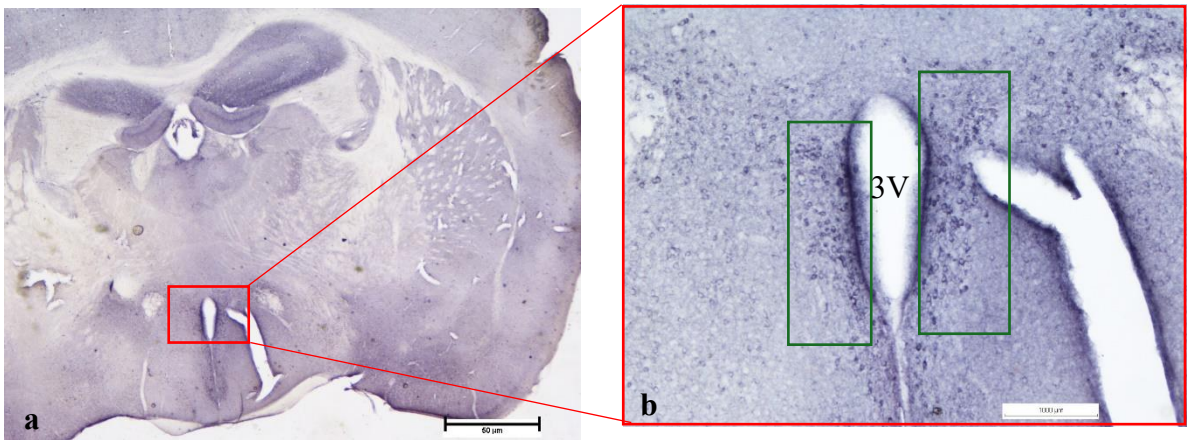
Slika 4: Prikaz večjih agregacij Aβ (črna puščica) v lateralnem septalnem jedru na področju Bregme 1,1 pri 24 mesecev stari C57BL/6J miši; slika a pri 20x povečavi, slika b pri 200x povečavi.

Prisotnost pozitivne reakcije na nevronsko sintazo dušikovega oksida (nNOS) smo z metodo imunohistokemije ugotovili v skoraj vseh predelih možganov. V določenih področjih je bila reakcija bolj intenzivna, medtem ko je bil v zadnjih delih možganov nNOS izražen bolj difuzno. Pozitivno so se obarvali perikarioni živčne celice (nevroni) in njihovi podaljški (dendriti in aksoni), kar je prikazano na sliki 5.

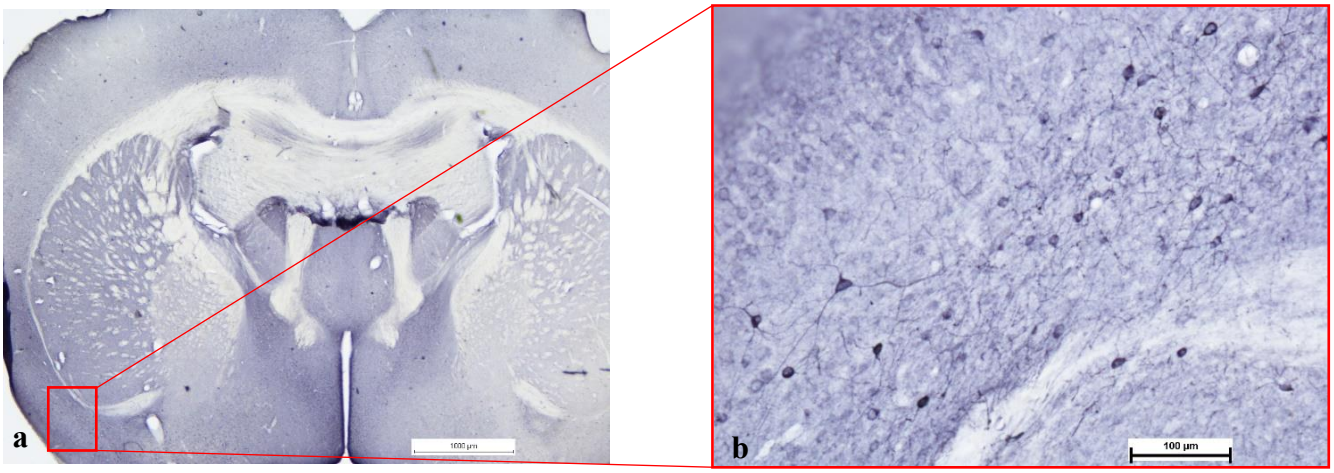


Slika 5: Prikaz pozitivne obarvanosti perikariona nevronov (črna puščica) in njihovih podaljškov (rdeča puščica) na nNOS v striatumu na področju Bregme -1,0 pri 400x povečavi. Miš linije BALB/c pri starosti 18 mesecev.

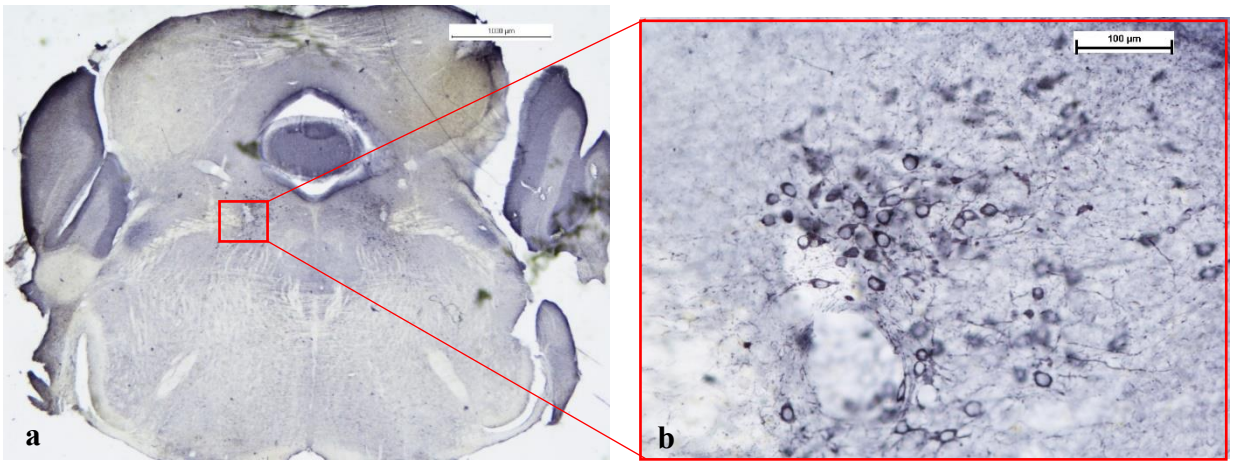
Najintenzivnejše pozitivne reakcije na nNOS smo, s pomočjo atlasa (19), pri vseh starostih (4, 18 in 24 mesecev), opazili okoli 3. ventrikla (na Bregmi 0 in -1), kar je razvidno na sliki 6, v področju striatuma (na Bregmi 0, -1 in -2) in piriformnem korteksu (na Bregmi 2, 0 in -1), kar je razvidno na sliki 7. V piriformnem korteksu smo pozitivne reakcije našli tudi v ventralnem in dorzalnem endopiriformnem jedru, okoli 3. ventrikla pa v anterodorzalnem in medialnem preoptičnem jedru ter paraventrikularnem hipotalamusnem jedru. Difuzne pozitivne reakcije so bile pri vseh starostih prisotne v možganski skorji, predvsem v motornem in primarnem somatosenzornem področju, pri čemer smo s starostjo zaznali širjenje ventrolateralno. V hipokampusu smo opazili difuzne pozitivne reakcije v različnih plasteh, predvsem v plasti piramidalnih celic in plasti radiatum ter v interpedunkularnem jedru (na Bregmi med -3 in -4), kar je prikazano na sliki 9. Pozitivno obarvani nevroni so bili prisotni tudi v jedru akumbens (na Bregmi 1) in amigdaloidni regiji. Pri miših, starih 4 mesece, smo zaznali pozitivne reakcije na nNOS v periventrikularnem in paraventrikularnem hipotalamusnem jedru, medtem ko so bile v področju tagmentuma (na Bregmi -5), prikazano na sliki 8, prisotne pri vseh starostnih skupinah.



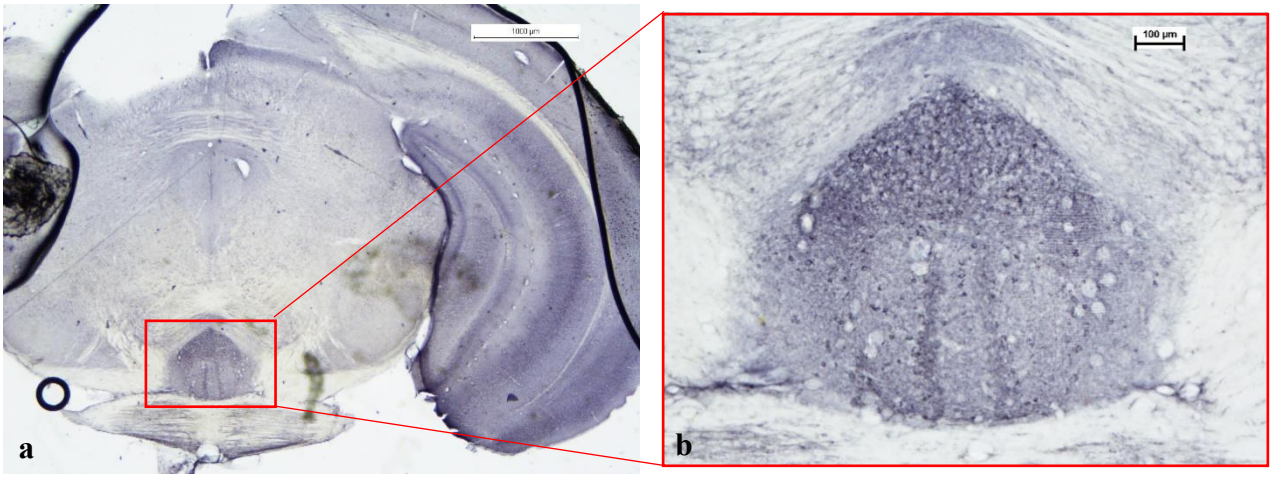
Slika 6: Prikaz pozitivne reakcije na nNOS (zelen pravokotnik) ob tretjem možganskem ventriklu na področju Bregme -1,0 pri 4 mesece stari BALB/c miši pri 100x povečavi (slika b); slika a pri 20x povečavi, 3V – tretji možganski ventrikel.



Slika 7: Prikaz pozitivne reakcije na nNOS v piriformnem korteksu na področju okoli Bregme 0 pri 18 mesecev stari BALB/c miši; slika a pri 20x povečavi, slika b pri 200x povečavi.



Slika 8: Prikaz pozitivne reakcije na nNOS v laterodorzalnem jedru tagmentuma na področju Bregme -5,0 pri 24 mesečni miši C57BL/6J; slika a pri 20x povečavi, slika b pri 200x povečavi.



Slika 9: Prikaz pozitivne reakcije na nNOS v interpedunkularnem jedru na področju Bregme -3,8 pri 24 mesečni miši C57BL/6J; slika a pri 20x povečavi, slika b pri 100x povečavi.

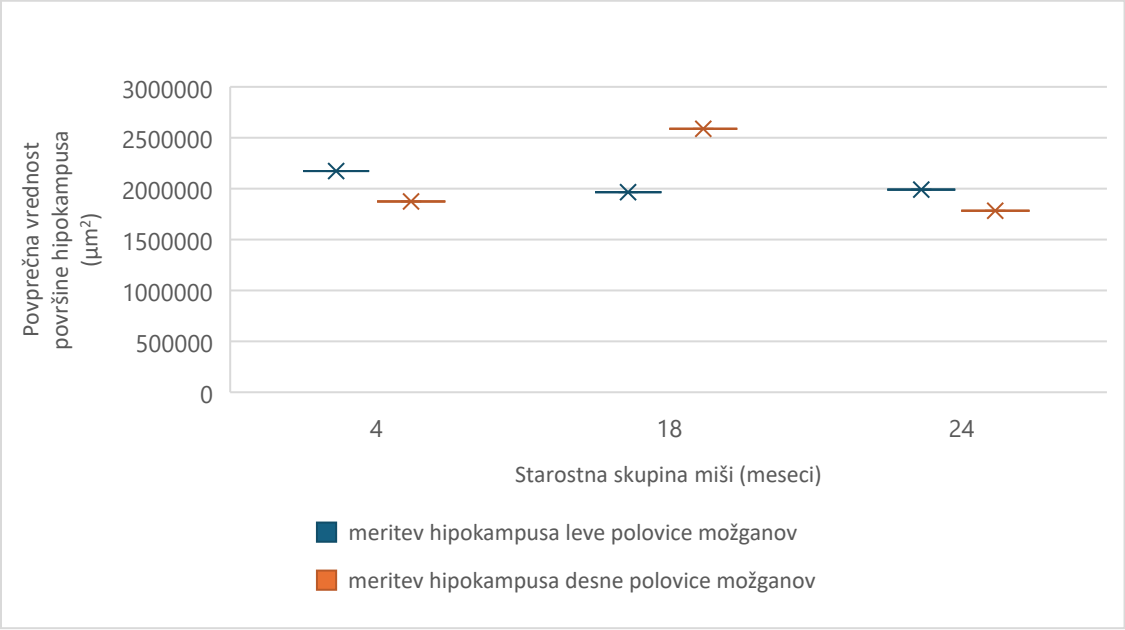
V striatumu na Bregmi 1,0 smo prešteli število nevronov pozitivnih na nNOS v levi in desni polovici možganov, v treh poljih velikosti 280 000 µm^2. Na enih možganih smo skupno prešteli pozitivne nevrone v šestih poljih, rezultate pa podali kot povprečno število pozitivnih nevronov na eno polje za vsako žival, kar je prikazano v tabeli 1. Med rezultati smo opazili razlikovanje glede na starost, vendar statistična analiza razlik zaradi majhnega števila vzorcev (n=2 na starostno skupino) ni bila izvedljiva.

Tabela 1: Povprečno število nevronov pozitivnih na nNOS v striatumu na polje velikosti 280 000 µm².

Starost in linija miši	Število pozitivnih nevronov na nNOS
4M BALB/c	4,83
4M C57BL/6J	10,83
18M BALB/c	5,17
18M C57BL/6J	6,67
24M C57BL/6J	9,67
24M C57BL/6J	14,67

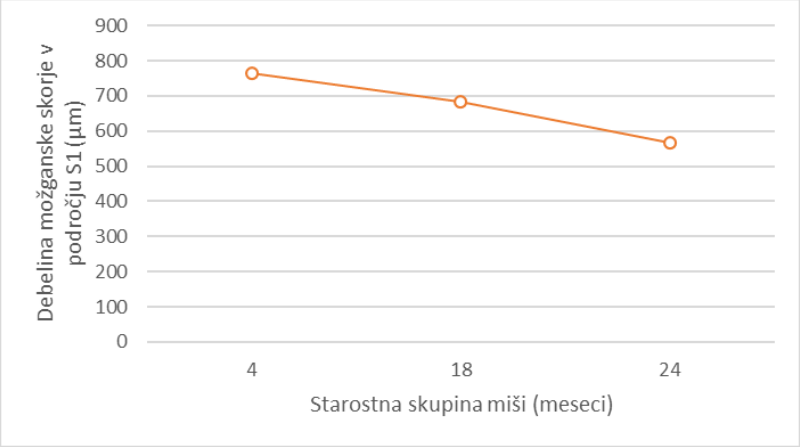
4.3 Obseg hipokampusa in debelina možganske skorje

Površino preseka hipokampusa smo izmerili na področju Bregme -1,5 pri 100x povečavi. Na vseh možganih smo opravili dve meritvi (leva in desna polovica), kot je prikazano na sliki 1. Rezultati so podani kot povprečje vrednosti na starostno skupino in prikazani v grafu 1. Z analizo rezultatov meritev smo ugotovili, da vrednosti meritev opravljene na levi hemisferi možganov kažejo trend upadanja v povezavi s staranjem, medtem ko o meritvah na desni polovici tega ne moremo trditi. Zaradi majhnega števila vzorcev statistična analiza razlik ni bila izvedljiva.



Slika 10: Prikaz površine preseka hipokampusa na Bregmi -1,5 v povezavi s starostjo miši.

Meritve debeline možganske skorje smo izvedli v področju primarnega somatosenzornega korteksa (S1) na Bregmi -1,5. Na vsaki polovici možganov smo pri 100x povečavi opravili tri meritve, kot je prikazano na sliki 1. Rezultati so predstavljeni kot povprečje vrednosti za posamezno starostno skupino in prikazani v grafu 2. Ugotovili smo, da se debelina skorje s starostjo zmanjšuje.. Zaradi majhnega števila vzorcev statistično ovrednotenje razlik ni bilo mogoče opraviti.



Slika 11: Prikaz debeline možganske skorje v področju primarnega somatosenzornega korteksa (S1) na Bregmi -1,5 v povezavi s starostjo miši.

5 RAZPRAVA

5.1 Imunohistokemični prikaz amiloidnih plakov in izoform sintaze dušikovega oksida na parafinskih rezinah

V naši raziskavi smo želeli ugotoviti, ali so v možganih, predvsem pri starih miši, prisotni amiloidni plaki, ki so značilni za NB, kot je AB. Prav tako smo preučevali prisotnost treh izoform sintaze dušikovega oksida (NO) – nevronske (nNOS), inducibilne (iNOS) in endotelijske (eNOS), saj je povečana tvorba NO povezana s številnimi patološkimi stanji, kot so NB, vnetje, ishemija in nitrozativni stres (6). Predvidevali smo, da bomo v možganih miši potrdili prisotnost Aβ in izoform NOS, vendar pozitivnih reakcij nismo zaznali. V študiji Ahlemeyerja in sodelavcev (11), kjer so uporabili enako metodo imunohistokemije na parafinskih rezinah, so v možganih starih miši linije C57BL/6J odkrili prisotnost amiloidnih plakov, zato sklepamo, da smo z našo metodo dobili lažno negativne rezultate. Ti so lahko posledica slabe vezave primarnega protitelesa na antigen, bodisi zaradi nezadostne koncentracije, slabše afinitete ali denaturacije antigena med postopkom obdelave tkiva, saj je vključevanje v parafin bolj agresivno do tkiva. Obstaja tudi možnost, da sekundarno protitelo ni prepoznalo primarnega, kar je lahko posledica izbire neustreznega protitelesa ali nepravilno izvedenega postopka. Prav tako fluorescentna protitelesa, čeprav imajo večjo občutljivost, veljajo za manj stabilna, kar lahko vodi do izgube signala. Dodatno lahko signalizacijo oteži autofluorescenca. Lažno negativni rezultati bi lahko bili nadalje posledica različnih napak v postopku, kot so sušenje tkiva, neustrezno shranjeni ali zastareli reagenti ter nepravilen čas inkubacije s protitelesi. V našem primeru pa sklepamo, da je najverjetnejši vzrok način obdelave tkiva, saj smo z enim od teh primarnih protiteles – proti nNOS - dobili ustrezno vezavo na antigen v nadaljevanju raziskave.

5.2 Imunohistokemični prikaz amiloidnih plakov z metodo plavajočih rezin

Večina trenutnega znanja, ki ga imamo o NB, predvsem AB, je rezultat raziskav s transgenimi mišmi, s katerimi je mogoče posnemati amiloidne plake kot tudi številne druge patološke značilnosti povezane z nevrodegeneracijo. Vendar večina primerov AB pri ljudeh je spontana oblika, ki se naj ne bi razvila pri miših divjega tipa. Literature, ki bi podrobneje preučevala nevrodegenerativne spremembe, vezane na Aβ, pri miših divjega tipa skoraj ni. V naši raziskavi smo na prisotnost amiloidnih plakov pregledali možgane miši, starih 4, 18 in 24 mesecev. Predvidevali smo, da bo pri starih, 24 mesečnih miših, ki so dosegle skoraj maksimum svoje pričakovane življenjske dobe, prisotnega največ Aβ. Naše rezultate smo primerjati z rezultati študije Ahlemeyerja in sodelavcev (11), ki so potrdili prisotnost Aβ v možganih pri 15 mesecev stari miši linije C57BL/6J. V omenjeni študiji so potrdili prisotnost intracelularnih vključkov v nevronih 15 mesečnih miši, medtem ko pri miših, starih do 5 mesecev, prisotnosti Aβ niso zaznali, kar je skladno z rezultati naše študije, saj smo prisotnost Aβ zaznali le pri 18 in 24 mesecev starih miših. Vendar zaradi majhnega števila vzorcev z gotovostjo ne moremo potrditi, da se plaki pojavljajo le pri starih miših. Med primerjavo dveh linij miši, in sicer C57BL/6J in BALB/c, v naši raziskavi očitnih razlik nismo opazili. Literature, ki bi opisovala prisotnost amiloidnih plakov pri stari miši divjega tipa BALB/c nismo našli. Podobno kot v naši študiji so tudi v študiji Ahlemeyerja in sodelavcev (11), zaznali pojavljanje Aβ v specifičnih regijah možganov, kar bi lahko nakazovalo na določene anatomske predispozicije za kopičenje Aβ. Pozitivne nevrone smo opazili v periventrikularnem področju lateralnega ventrikla in nekaterih plasteh hipokampusa.

Dodatno so v študiji Ahlemeyerja in sodelavcev (11) našli Aβ intracelularno v možganski skorji, na področju talamusa in v malih možganih ter večje ekstracelularne plake okoli lateralnega ventrikla in v okolici. Tega z našo študijo nismo potrdili, kar je lahko tudi posledica pomanjkanja ustrezne pozitivne kontrole v postopku. V študiji, kjer so preučevali mišji transgeni model za AB, ki hitreje razvije patološke in kognitivne spremembe (20), so imunohistokemično prisotnost Aβ potrdili pri transgenih miših, medtem ko pri kontrolni skupini, za katero so uporabili 9 mesecev stare miši divjega tipa C57BL/6J, prisotnosti Aβ niso zaznali, kar je delno v nasprotju z našimi rezultati in rezultati Ahlemeyerja in sodelavcev (11).

Protitelesa proti beta amiloidu proizvajalca Abcam niso dala pozitivne reakcije, sklepamo da zaradi nespecifičnosti, saj so primarno proizvedena za raziskave na tkivu ljudi in jih v nadaljnjih analizah ne bi uporabili za to metodo.

5.3 Imunohistokemični prikaz nevronske sintaze dušikovega oksida na plavajočih rezinah

Dušikov oksid je v telesu pomembna signalna molekula, ki v možganih deluje kot nevrotransmiter. Sintetizirajo ga tri izoforme, med katerimi je tudi nevronska sintaza dušikovega oksida (nNOS), predstavlja glavno obliko NOS v centralnem živčnem sistemu (21). V naši raziskavi smo želeli ugotoviti, kje v možganih se pojavlja in ali pri miših divjega tipa s starostjo prihaja do kakršnih koli sprememb. V študiji Tewarija in sodelavcev (6) poročajo, da je bil NOS identificiran v različnih delih možganov – hipokampusu, možganski skorji, paraventrikularnih in supraoptičnih jedrih hipotalamusa, olfaktornem bulbusu, ventralnem endopiriformnem jedru, jedru akumbens, talamusu, malih možganih, amigdaloidnem področju in striatumu. Tudi v naši raziskavi smo imunohistokemično potrdili prisotnost nNOS v vseh od omenjenih področij, razen v malih možganih. Večinoma je nNOS izražen v citoplazmi nevronov, kar se ujema z našimi ugotovitvami, lahko pa se pojavlja tudi v astrocitih in nevralnih matičnih celicah (6). V zdravih možganih encimi NOS igrajo pomembno vlogo pri učenju in spominu, številne raziskave na živalskih modelih in ljudeh pa so pokazale ključno vlogo dušikovega oksida (NO) pri NB (6, 22). S staranjem prihaja do motenj v delovanju encimov in drugih patoloških procesov, kar lahko poruši raven aktivnosti encimov NOS. V centralnem živčnem sistemu lahko to vodi v nitrozativni stres, nevrodegeneracijo in smrti nevronov. Odkrili so, da ima NO pomembno vlogo tudi v patofiziologiji AB, saj so prekomerne količine NO, ki nastanejo bodisi zaradi aktivacije nNOS ob ekscitotoksičnosti, indukcije iNOS v glialnih celicah ali aktivacije eNOS v žilnem tkivu, potencialno škodljive (22). Kljub številnim raziskavam o povezavi med starostjo in ekspresijo nNOS ostajajo mnenja razdeljena glede tega, ali se z naraščajočo starostjo njegova ekspresija povečuje ali zmanjšuje. Študija Tomiga in sodelavcev (21) navaja, da so se prejšnje raziskave osredotočale predvsem na hipokampus, male možgane in možgansko skorjo, vendar so bile ugotovitve zelo različne – nekateri raziskovalci so zaznali povečanje ekspresije, drugi zmanjšanje, nekateri pa sprememb niso zaznali. Vzroki za te razlike ostajajo nejasni. Sklepamo, da je lahko ekspresija nNOS pri starih možganih povezana z lokacijo. V naši študiji smo raziskovali ali s starostjo prihaja do sprememb v številu nNOS pozitivnih nevronov v striatumu, a zaradi velike variabilnosti in majhnega števila vzorcev rezultatov ne moremo zanesljivo interpretirati. Poleg tega se večina raziskav opravljena na človeških možganih ali s transgenimi mišjimi modeli, kljub iskanju pa v literaturi nismo našli študije, ki bi se osredotočila na izražanje encimov NOS pri divjem tipu miši.

5.4 Obseg hipokampusa in debelina možganske skorje

Znano je, da ima proces staranja vpliv na vedenje in kognitivne sposobnosti. Z našo raziskavo smo želeli ugotoviti, ali ima staranje vpliv na velikost hipokampusa, zato smo površino preseka, na podlagi atlasa (19), izmerili na področju Bregme -1,5. Hipotetizirali smo, da se bo zaradi s starostjo povezane atrofije hipokampus skrčil. Že v študiji Lessard-Beaudoina in sodelavcev (23) so pri miših C57BL/6J ugotovili, da prihaja s starostjo do očitnega padca v teži hipokampusa, do enake ugotovitve so prišli z raziskavami na človeških možganih, pri podganah pa so ugotovili, da s starostjo prihaja do odebelitve. Njihove ugotovitve nakazujejo, da s staranjem pri C57BL/6J miših prihaja do sprememb v volumnu hipokampusa, zato bi lahko te miši služile kot model za preučevanje starostno pogojenih bolezni, kot je AB. Prav tako je hipokampus področje, ki ga AB močno prizadane. Rezultati naše študije so bili nejasni, saj smo ugotovili, da samo meritve opravljene na hipokampusu leve hemisfere možganov kažejo trend upadanja s starostjo. Zaradi merilne netočnosti (možno, da so bile rezine nehote rezane poševno in zato razlika med levo in desno polovico) in premajhnega števila vzorcev ne moremo z gotovostjo trditi, ali staranje res vpliva na obseg hipokampusa. V naši študiji smo ugotavljali tudi, ali prihaja s starostjo pri miših divjega tipa do sprememb v debelini možganske skorje, ki bi lahko nakazovale na atrofijo. Debelino možganske skorje smo na podlagi atlasa (19) izmerili v področju somatosenzornega področja na Bregmi -1,5. V študiji Taylorja in sodelavcev (12) so opazili očiten padec debeline možganske skorje pri starih miših divjega tipa, kar se ujema z našimi ugotovitvami, a zaradi majhnega števila vzorcev z gotovostjo tega ne moremo potrditi.

6 SKLEPI

Na osnovi rezultatov naše raziskovalne naloge smo prišli do sledečih sklepov:

- Potrdili smo prvo hipotezo, saj smo z metodo imunohistokemije na plavajočih rezinah dokazali prisotnost amiloidnih plakov v možganih starih miši.
- Drugo in tretjo hipotezo, ki se nanašata na morfološke spremembe v možganih ter vpliv linije in spola na te spremembe, nismo mogli ne potrditi ne ovreči, kar pripisujemo premajhnemu številu vzorcev.
- Ugotovili smo, da je način obdelave tkiva pomembnejši od izbire metode (fluorescentne ali kromogene). Imunohistokemija na parafinskih rezinah ni dala ustreznih rezultatov v primerjavi z metodo na plavajočih rezinah.
- Študijo bi lahko nadgradili z analizo prisotnosti 3-nitrotirozina (3-NT), ki je označevalec nitrozativnega stresa, povezanega s spremembami v aktivnosti encima NOS.
- Študijo bi nadaljevali z vključitvijo večjega števila vzorcev za obe liniji in oba spola živali in pregledom vseh regij možganov (zbiranje vseh koronalnih rezin) za pridobitev bolj zanesljivih rezultatov.
- Modeli postaranih miši bi lahko bili primerni za predklinične raziskave na področju Alzheimerjeve bolezni (AB) in kognitivnih motenj pri živalih (predvsem pri psih in mačkah), saj kažejo nekatere podobnosti z AB, kot je prisotnost amiloidnih plakov. Kljub temu so na tem področju potrebne nadaljnje raziskave in upoštevanje omejitev teh modelov, kot so izredno velika variabilnost teh živali, določene razlike v patologiji med živalmi in ljudmi ter med posameznimi živalskimi vrstami, pa tudi vpliv okoljskih dejavnikov.

7 POVZETEK

Nevrodegenerativne bolezni (NB) predstavljajo v današnjem svetu vse večji problem. Zaradi slabega razumevanja teh bolezni in pomanjkanja učinkovitih zdravljenj se vse več študij usmerja v raziskovanje novih in bolj učinkovitih terapij ter iskanju novih modelov, s katerimi bi omogočili boljše razumevanje teh bolezni. V naši raziskavi smo zato želeli ugotoviti, ali so v možganih naravno postaranih miši linij C57BL/6J in BALB/c prisotne spremembe podobne tistim v možganih s spontano obliko Alzheimerjeve bolezni: kopičenje beta amiloida, znaki vnetja in celičnega stresa, atrofija možganske skorje in hipokampusa. Zanimalo nas je, ali bi te miši potencialno lahko predstavljale model za preučevanje Alzheimerjeve bolezni (AB) in kognitivnih motenj pri živalih, kot so psi in mačke. Z metodo imunohistokemije smo na vzorcih možganov miši divjega tipa C57BL/6J in BALB/c različnih starosti (4, 18, 24 mesecev) v različnih regijah iskali prisotnost amiloidnih pakov in izoform sintaz dušikovega oksida (NOS) – inducibilna sintaza dušikovega oksida (iNOS), nevronska sintaza dušikovega oksida (nNOS) in endotelijska sintaza dušikovega oksida (eNOS). Z metodo imunohistokemije na parafinskih rezinah v področjih možganov na Bregmi 2.5, 1, 0, -1.5, -3 in -4.5 nismo našli amiloidnih plakov ali izoform NOS, kar je bila najverjetneje posledica obdelave tkiva. Z metodo imunohistokemije na plavajočih rezinah smo potrdili prisotnost amiloidnih plakov in nNOS. Redke pozitivne signale beta amiloida (Aβ) smo zaznali intracelularno v nevronih miši, starih 18 in 24 mesecev, večjih agregacij pa nismo mogli zanesljivo potrditi. Opazili smo, da se plaki v določenih predelih možganov konsistentno pojavljajo na istih lokacijah, in sicer v lateralnem septalnem jedru, hipokampusu (plast radiatum, plast oriens in piramidalna plast) in okolici lateralnega ventrikla. Med linijama miši, ki smo jih imeli na voljo (C57BL/6J in BALB/c), nismo opazili očitnih razlik. Pozitivno reakcijo na nNOS smo ugotovili v skoraj vseh predelih možganov. Pozitivno so se obarvali perikarioni živčne celice (nevroni) in njihovi podaljški (dendriti in aksoni). V določenih področjih je bila reakcija bolj intenzivna (okolica 3. ventrikla, striatum, piriformni korteks), medtem ko je bil v zadnjih delih možganov nNOS izražen bolj difuzno. Difuzne pozitivne reakcije so bile pri vseh starostih prisotne v možganski skorji, predvsem v motornem in primarnem somatosenzornem področju, pri čemer smo s starostjo zaznali širjenje ventrolateralno. Opazili smo jih tudi v hipokampusu, interpedunkularnem jedru, jedru akumbens in amigdaloidni regiji. Pri miših, starih 4 mesece, smo zaznali pozitivne reakcije na nNOS v periventrikularnem in paraventrikularnem hipotalamusnem jedru, medtem ko so bile v področju tagmentuma prisotne pri vseh starostnih skupinah. V striatumu na Bregmi 1,0 smo prešteli število nevronov pozitivnih na nNOS in opazili razlikovanje glede na starost, vendar statistična analiza razlik zaradi majhnega števila vzorcev ni bila izvedljiva. V naši raziskavi smo izmerili tudi površino preseka hipokampusa na področju Bregme -1,5, vendar ravno tako statistična analiza razlik ni bila mogoča. Opravili smo tudi meritve debeline možganske skorje v področju primarnega somatosenzornega korteksa na Bregmi -1,5. Ugotovili smo, da se debelina skorje s starostjo zmanjšuje, a zaradi majhnega števila vzorcev z gotovostjo tega ne moremo potrditi. Za zanesljivejše rezultate bi morali v študijo vključiti večje število vzorcev za obe liniji in oba spola in pregledati vse regije možganov. Dejstvo, da smo v možganih potrdili amiloidne plake, kaže, da bi v prihodnosti lahko uporabili modele naravno postaranih miši kot modele za preučevanje AB in kognitivnih motenj živali, vendar so na tem področju potrebne nadaljnje raziskave in upoštevanje omejitev teh modelov, kot so izredno velika variabilnost teh živali, določene razlike v patologiji med živalmi in ljudmi ter med posameznimi živalskimi vrstami, pa tudi vpliv okoljskih dejavnikov.

8 SUMMARY

Neurodegenerative diseases (ND) are an increasing concern in today's world. Due to the lack of understanding of these diseases and the lack of effective treatments, more and more studies are focusing on the development of new and more effective therapies, as well as the search for new models that could improve our understanding of these diseases. In our research, we wanted to find out whether naturally aged C57BL/6J and BALB/c mice show similar changes in the brain as in the spontaneous form of Alzheimer's disease (AD): accumulation of beta-amyloid, signs of inflammation and cellular stress, cortical and hippocampal atrophy. We were also interested in whether these mice could potentially serve as a model for studying AD and cognitive disorders in animals such as dogs and cats. Using immunohistochemistry, we examined the presence of amyloid plaques and isoforms of nitric oxide synthase (NOS) – inducible nitric oxide synthase (iNOS), neuronal nitric oxide synthase (nNOS) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) – in different brain regions of wild-type C57BL/6J and BALB/c mice of different ages (4, 18, 24 months). In paraffin sections of brain regions at Bregma 2.5, 1, 0, -1.5, -3 and -4.5, we found no amyloid plaques or NOS isoforms, probably due to tissue processing. However, using immunohistochemistry on free floating sections, we were able to confirm the presence of amyloid plaques and nNOS. Rare positive beta-amyloid (Aβ) signals were detected intracellularly in neurons of 18 and 24 month old mice, but we could not reliably confirm larger aggregates. We observed that the plaques consistently appeared in specific brain regions, particularly in the lateral septal nucleus, hippocampus (radiatum layer, oriens layer and pyramidal layer) and around the lateral ventricle. There were no obvious differences between the two strains (C57BL/6J and BALB/c). Positive reactions for nNOS were observed in almost all brain regions. Neuronal cell bodies (perikarya) and their projections (dendrites and axons) were positively stained. In certain areas, the immunohistochemistry response was more intense (around the third ventricle, striatum and piriform cortex), while in the posterior brain regions, nNOS expression was more diffuse. Diffuse positive reactions were present in the cerebral cortex at all ages, particularly in the motor and primary somatosensory areas, with a lateral spread observed with increasing age. We were also able to detect them in the hippocampus, the interpeduncular nucleus, the nucleus accumbens and the amygdaloid region. In 4-month-old mice, positive reactions for nNOS were observed in the periventricular and paraventricular hypothalamic nuclei, while they were present in the tegmentum area at all ages. In the striatum, we counted the number of neurons positive for nNOS in both hemispheres in three fields of 280 000 μm² at level of Bregma 1.0. We found age-related differences in the results, but statistical analysis was not possible due to the small sample size. We also measured the cross-sectional area of the hippocampus at Bregma -1.5, but statistical analysis of the differences was not possible due to the small sample size. In addition, we measured the thickness of the cerebral cortex in the primary somatosensory cortex at Bregma -1.5. We found that cortical thickness decreases with age, but due to the small sample size we cannot confirm this with certainty. To obtain more reliable results, we would need to include a larger number of samples for both strains and both sexes and examine all brain regions. The fact that we have confirmed the presence of amyloid plaques in the brains suggests that naturally aged mouse models could potentially be used to study Alzheimer's disease and cognitive disorders in animals in the future. However, further research is needed to explore the limitations of these models, such as the high variability of these animals, the differences in pathology between animals and humans, the differences between species and the influence of environmental factors.

9 LITERATURA

1. Gitler AD, Dhillon P, Shorter J. Neurodegenerative disease: models, mechanisms, and a new hope. *Dis Model Mech*. 2017; 10(5):499-502. doi:10.1242/dmm.030205
2. Erkkinen MG, Kim MO, Geschwind MD. Clinical Neurology and Epidemiology of the Major Neurodegenerative Diseases. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2018; 10(4):a033118. doi: 10.1101/cshperspect.a033118
3. Katsuno M, Sahashi K, Iguchi Y, Hashizume A. Preclinical progression of neurodegenerative diseases. *Nagoya J Med Sci*. 2018; 80(3): 289-298. doi:10.18999/nagjms.80.3.289
4. Dugger BN, Dickson DW. Pathology of Neurodegenerative Diseases. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2017; 9(7): a028035. doi: 10.1101/cshperspect.a028035
5. dos Santos Picanco LC, Ozela PF, de Fatima de Brito Brito M, Pinheiro AA, Padilha EC, Braga FS, et al. Alzheimer's Disease: A Review from the Pathophysiology to Diagnosis, New Perspectives for Pharmacological Treatment. Current Medicinal Chemistry 2018; 25(26): 3141–3159. doi:10.2174/0929867323666161213101126
6. Tewari D, Sah AN, Bawari S, Nabavi SF, Dehpour AR, Shirooie S, Braidy N, Fiebich BL, Vacca RA, Nabavi SM. Role of Nitric Oxide in Neurodegeneration: Function, Regulation, and Inhibition. Curr Neuropharmacol. 2021; 19(2): 114-126. doi: 10.2174/1570159X18666200429001549.
7. Prpar Mihevc S, Majdič G. Canine Cognitive Dysfunction and Alzheimer's Disease - Two Facets of the Same Disease? Front Neurosci. 2019; 13: 604. doi: 10.3389/fnins.2019.00604
8. Dewey CW, Davies ES, Xie H, Wakshlag JJ. Canine Cognitive Dysfunction: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2019; 49(3): 477-499. doi: 10.1016/j.cvsm.2019.01.013.
9. Sordo L, Gunn-Moore DA. Cognitive Dysfunction in Cats: Update on Neuropathological and Behavioural Changes Plus Clinical Management. Vet Rec. 2021; 188(1): e3. doi: 10.1002/vetr.3.
10. Sordo L, Martini AC, Houston EF, Head E, Gunn-Moore D. Neuropathology of Aging in Cats and its Similarities to Human Alzheimer's Disease. Front Aging. 2021; 2: 684607. doi: 10.3389/fragi.2021.684607.
11. Ahlemeyer B, Halupczok S, Rodenberg-Frank E, Valerius KP, Baumgart-Vogt E. Endogenous Murine Amyloid-β Peptide Assembles into Aggregates in the Aged C57BL/6J Mouse Suggesting These Animals as a Model to Study Pathogenesis of Amyloid-β Plaque Formation. J Alzheimers Dis. 2018; 61(4): 1425-1450. doi: 10.3233/JAD-170923.
12. Taylor EN, Huang N, Wisco J, Wang Y, Morgan KG, Hamilton JA. The brains of aged mice are characterized by altered tissue diffusion properties and cerebral microbleeds. J Transl Med. 2020; 18(1): 277. doi: 10.1186/s12967-020-02441-6.
13. Chusyd DE, Ackermans NL, Austad SN, Hof PR, Mielke MM, Sherwood CC, Allison DB. Aging: What We Can Learn From Elephants. Front Aging. 2021; 2: 726714. doi: 10.3389/fragi.2021.726714.
14. Clark JS, Kayed R, Abate G, Uberti D, Kinnon P, Piccirella S. Post-translational Modifications of the p53 Protein and the Impact in Alzheimer's Disease: A Review of the Literature. Front Aging Neurosci. 2022; 14:835288. doi: 10.3389/fnagi.2022.835288.

15. Chen ZY, Zhang Y. Animal models of Alzheimer's disease: Applications, evaluation, and perspectives. Zool Res. 2022; 43(6): 1026-1040. doi: 10.24272/j.issn.2095-8137.2022.289.
16. Neha, Sodhi RK, Jaggi AS, Singh N. Animal models of dementia and cognitive dysfunction. Life Sci. 2014; 109 (2): 73-86. doi: 10.1016/j.lfs.2014.05.017.
17. Meunier J, Borjini N, Gillis C, Villard V, Maurice T. Brain toxicity and inflammation induced in vivo in mice by the amyloid-β forty-two inducer aftin-4, a roscovitine derivative. J Alzheimers Dis. 2015; 44(2): 507-24. doi: 10.3233/JAD-140711.
18. Barak M, Fedorova V, Pospisilova V, Raska J, Vochyanova S, Sedmik J, Hribkova H, Klimova H, Vanova T, Bohaciakova D. Human iPSC-Derived Neural Models for Studying Alzheimer's Disease: from Neural Stem Cells to Cerebral Organoids. Stem Cell Rev Rep. 2022; 18(2): 792-820. doi: 10.1007/s12015-021-10254-3.
19. Franklin KBJ, Paxinos G, Schmieder RG. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. 2nd ed. San Diego, Calif.; London: Academic; 2001.
20. Lok K, Zhao H, Shen H, Wang Z, Gao X, Zhao W, Yin M. Characterization of the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease in senescence accelerated background. Neurosci Lett. 2013; 557 Pt B: 84-9. doi: 10.1016/j.neulet.2013.10.051.
21. Tomiga Y, Ito A, Sudo M, Ando S, Maruyama A, Nakashima S, Kawanaka K, Uehara Y, Kiyonaga A, Tanaka H, Higaki Y. Effects of environmental enrichment in aged mice on anxiety-like behaviors and neuronal nitric oxide synthase expression in the brain. Biochem Biophys Res Commun. 2016; 476(4): 635-640. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.06.010.
22. Iova OM, Marin GE, Lazar I, Stanescu I, Dogaru G, Nicula CA, Bulboacă AE. Nitric Oxide/Nitric Oxide Synthase System in the Pathogenesis of Neurodegenerative Disorders-An Overview. Antioxidants (Basel). 2023; 12(3): 753. doi: 10.3390/antiox12030753.
23. Lessard-Beaudoin M, Laroche M, Demers MJ, Grenier G, Graham RK. Characterization of age-associated changes in peripheral organ and brain region weights in C57BL/6 mice. Exp Gerontol. 2015; 63: 27-34. doi: 10.1016/j.exger.2015.01.003.