

Promjene metabolizma željeza u mozgu ženki Sprague Dawley štakora izloženih kroničnom stresu

Jurić, Mia

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:571544>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska
dijagnostika**

Mia Jurić

**PROMJENE METABOLIZMA ŽELJEZA
U MOZGU ŽENKI SPRAGUE DAWLEY
ŠTAKORA IZLOŽENIH KRONIČNOM
STRESU**

Završni rad

Osijek, 2018.

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska
dijagnostika**

Mia Jurić

**PROMJENE METABOLIZMA ŽELJEZA
U MOZGU ŽENKI SPRAGUE DAWLEY
ŠTAKORA IZLOŽENIH KRONIČNOM
STRESU**

Završni rad

Osijek, 2018.

Rad je ostvaren u: Medicinski fakultet Osijek

Mentor rada: prof.dr.sc Marija Heffer

Rad ima 32 lista i 8 slika

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Kronični stres.....	1
1.2. Procesi nakupljanja željeza.....	1
1.2.1. Uloga željeza.....	1
1.2.2. Oksidativni stres.....	2
1.2.3. Neuromelanin.....	3
1.2.4. Beta amyloid.....	3
1.2.5. Tau protein.....	4
1.3. Neurodegeneracija.....	4
1.3.1. Alzheimerova bolest.....	5
2. HIPOTEZA	6
3. CILJEVI.....	7
4. MATERIJAL I METODE	8
4.1. Ustroj studije	8
4.2. Materijali.....	8
4.3. Metode.....	9
4.3.1. Histološka bojanja.....	9
4.3.2. Imunohistokemijska bojanja.....	10
4.4. Statističke metode.....	11
5. REZULTATI.....	12
5.1 Nakupljanje željeza u stanicama <i>substancije nigre pars retikulata</i> ženki izloženih kroničnom stresu.....	12
5.2 Imunohistokemijski prikaz transferinskog receptora u SNR-u.....	13
5.3 Nakupljanje pTAU u stanicama SNR-a ženki izloženih kroničnom stresu.....	14
5.4 Nakupljanje amiloida u stanicama SNR-a ženki izloženih kroničnom stresu.....	15
6. RASPRAVA.....	18
7. ZAKLJUČAK	21
8. SAŽETAK	22
9. SUMMARY	23
10. LITERATURA	24
11. ŽIVOTOPIS.....	27

POPIS KRATICA

ATP	adenozin tri fostat
AD	Alzheimerova boleš
APP	amiloid prekursorski protein (engl. <i>amyloid precursor protein</i>)
A β	β amiloid
Fe	željezo
NM	neuromelanin
MAO-B	monoamin oksidaza B (engl. <i>monoamine oxidase B</i>)
PBS	fosfatni pufer (engl. <i>Phosphate buffered saline</i>)
ROS	reaktivne kisikove vrste (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
SN	supstancija nigra
SNR	supstancija nigra retikularni dio (lat. <i>supstancija nigra pars retikulata</i>)
TBS	tris pufer (engl. <i>Tris-HCl Buffered Saline</i>)

1.UVOD

1.1 Kronični stres

Kronični stres je sistemski odgovor organizma na ponavljajuće izlaganje različitim stresorima u dužem vremenskom periodu. Stresor, odnosno stresni podražaj, može biti bilo koji podražaj koji je prijetnja normalnim aktivnostima organizma. Organizam posjeduje mehanizme da se odupre negativnim učincima vanjskih podražaja i vrati organizam u stanje ravnoteže (1). Akutni stres nastaje od podražaja koji su kratkotrajni no visokog inteziteta, za razliku od kroničnog stresa čiji događaji su dugotrajni, ali ih ne karakterizira visok intenzitet (1). Akutni stres može biti okidač napadajima astme ili panike, migrenama, probavnim smetnjama. Kronični stres može uzrokovati hipertenziju, poremećaje spavanja, metaboličke poremećaje pretilosti, dijabetesa tip II i aterosklerozu. Okidač je i psihičkim problemima poput anksioznosti i depresije (2). Kod kroničnog stresa nastaju trajne promjene u funkciji stanice i dolazi do poremećaja homeostatskih sustava. Stres kojeg organizam uspije kompenzirati još se naziva *eustres* i ne smatra se štetnim za organizam, čak nasuprot – smatra se važnim za normalno kondicioniranje raznih fizioloških mehanizama. Naprotiv, stres koji prekorači kompenzatorne homeostatske mehanizme i dovede do trajne štete zove se *distres* i obično govorimo o njemu kao o podlozi kroničnih bolesti.

Stres, općenito, preusmjerava potrošnju energije prema onim tkivima koja su aktivna u stresnom odgovoru. U odgovoru na kronični stres prvo se nastoji povećati učinkovitost oksidativne fosforilacije kao glavnog puta dobivanja energije u obliku adenozin tri fosfata (ATP), stoga su poremećaju posebno izloženi metabolički putevi za dobivanje energije. Oksidativna fosforilacija se odvija u unutrašnjosti mitohondrija gdje dolazi do prijenosa elektrona kroz niz povezanih oksidacijsko-redukcijskih reakcija što stvara energiju za sintezu ATP-a (3). Enzimi ovog puta koriste ione željeza unutar prostetičkih skupina hema i sustava Fe-sumpor koje sudjeluju u procesu prebacivanja elektrona.

1.2 Procesi nakupljanja željeza

1.2.1 Uloga željeza

Željezo (Fe) je esencijalno za normalno funkcioniranje stanice. Sudjeluje u oksidativno redukcijskim reakcijama, kao tranzicijski metal može primiti i donirati elektron (4). Osim u oksidativnoj fosforilaciji, bitna je uloga Fe u sintezi deoksiribonukleinske kiseline te za skladištenje, transport i dostavu kiska u obliku kofaktora hema u hemoglobinu i mioglobinu (5). Mozak i jetra sadržavaju najveću koncentraciju Fe u organizmu (5).

Biološko starenje je proces koji dovodi do progresivnog gubljenja staničnih funkcija te je rizičan faktor za nastanak različitih bolesti i neurodegeneraciji (6). Unutar mozga Fe pokazuje neravnomjernu raspodjelu nakupljanja, najviše se nakuplja u bazalnim ganglijama *supstancije nigre* (SN) (7). Tijekom starenja zapaženo je da dolazi do linearnog povećanja ukupne koncentracije Fe na području SN (8). Iako je Fe nužno za preživljavanje stanica, ono izaziva i oštećenje stanica. Fe u slobodnom feri-obliku (Fe^{3+}) je netopivo, a u slobodnom fero-obliku (Fe^{2+}) toksično jer pospješuje stvaranje slobodnih radikala (9). Pretjerano nakupljanje Fe pospješuje oštećenja proteina uzrokovano oksidacijskim stresom što dovodi do taloženja proteina i posljedično razvoja neurodegenerativnih bolesti (10).

Funkcija transferina je prijenos i dostava Fe ciljnim stanicama i tkivima. Transferin reverzibilno veže Fe i omogućuje prijenos Fe do transferinskih receptora. Sustav transferin i transferinski receptor sudjeluju u održavanju homeostaze Fe. Transferinski receptori osiguravaju unos Fe u stanice te istovremeno štite od prekomjernoga nakupljanja. Transferin ima zaštitnu ulogu, veže Fe i održava niske koncentracije slobodnih iona Fe u tjelesnim tekućinama te na taj način sprječava nastanak ROS-a i oksidativnog oštećenja (9).

Feritin skladišti višak slobodnog Fe unutar stanica i zadržava ga u netoksičnom obliku. Koncentracije feritina se postupno povećavaju s godinama, a najviše ga sadržavaju oligodendrociti. Skladištenju Fe su posebno skloni dopaminergički neuroni, stoga su posebno osjetljivi na stresom izazvanu neurodegeneraciju (7).

1.2.2. Oksidativni stres

U normalnim fiziološkim uvjetima metalni ioni su vezani na proteine, transportne ili skladišne ili one kojima osiguravaju prostetičku skupinu dok slobodni stvaraju reaktivne kisikove radikale koji oštećuju stanicu (8). Homeostaza Fe je ključna za održavanje normalne moždane funkcije jer narušena homeostaza i višak Fe izazivaju toksične efekte na mozgu poticanjem oksidativnog stresa i stvaranjem slobodnih radikala (8). Slobodni radikali su iznimno reaktivne kemijske vrste koji teže stabilizaciji pa reagiraju s drugim atomima i molekulama u okolini i na taj način započinju lančanu reakciju daljnjeg stvaranja radikala. Reaktivni kisikovi spojevi, odnosno radikali superoksidnog aniona, hidroksilni radikal i perhidroksilni radikal su najreaktivniji slobodni radikali koji uzrokuju najveće oštećenje na molekulama i posljedično stanicama. Mogu oštetiti baze u DNA, lipide i proteine te na taj način uzrokovati aterosklerozu, koronarne bolesti i razvoj karcinoma (3). Oštećenjem makromolekula pospješuju proces starenja (11). Brojni stanični obrambeni mehanizmi

postoje da spriječe nagomilavanje reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS) i zaštite organizam, no kada ROS produkti nadvladaju staničnu sposobnost da ih uklanja i popravi oštećenje, nastaje oksidativni stres (6). Antioksidansi su spojevi koji sprječavaju nastanak ili uklanjaju ROS (10). Enzimi koji djeluju kao antioksidansi su npr. glutation-peroksidaza, katalaza i superoksid dismutaza. Vitamini C i E, kao i transferin također djeluju antioksidativno (10). Zbog biokemijskog sastava neurona mozak je vrlo osjetljiv na oštećenja reaktivnim kisikovim spojevima, a ima i slabu antioksidativnu zaštitu (12). Kronični stres kroz duži niz godina dovodi do povećane ranjivosti neurona i neurodegeneracije (13).

1.2.3 Neuromelanin

U mozgu je Fe neophodno za sintezu i metabolizam neurotransmitora (5). Kako akumulacija dopamina može inducirati toksične efekte, višak dopamina se može ukloniti pretvarajući ga u stabilnu komponentu neuromelanin (NM) koji služi da zarobi Fe i osigura zaštitu od oksidativnog stresa. Pigment NM je prisutan u različitim neuronima središnjeg živčanog sustava, a posebno obilan u dopaminergičkim neuronima supstancije nigre gdje se nakuplja kao dio fiziološkog starenja. Ključna je ravnoteža između Fe, dopamina i NM-a za održavanje homeostaze stanice. NM može imati zaštitnu ili degenerativnu ulogu ovisno o količini vezanog Fe. Stvarajući stabilni kompleks sa Fe blokira toksične efekte. S druge strane, NM otpušten od strane umrlih neurona aktivira mikrogliju koja otpušta proupalne molekule, ROS i reaktivne dušikove spojeve koji izazivaju neuronsku smrt (5). Funkcija mikroglije je potrebna za normalno funkcioniranje središnjeg živčanog sustava, no prekomjerno aktivirana uz prekomjerno proizvodnju citokina i proupalnih medijatora postaje toksična za okolno neuronsko tkivo (12). Neuronskom smrti izlazi u izvanstanični prostor netopljivi pigment NM koji ponovno aktivira mikrogliju i nastavlja kontinuirani ciklus destrukcije i smrti neurona (5,12). Fe se normalno nakuplja uz granule NM-a, no kod pacijenata s Parkinsonovom bolešću nakupljanje Fe je zapaženo u mnogo većoj mjeri (4).

1.2.4. Beta amiloid

Posmrtno istraživanje mozga kod pacijenata s Alzheimerovom bolešću pokazalo je izvanstanične plakove i unutarstanične lezije neurofibrila. Izvanstanični plakovi su nakupine amiloid proteina što je posljedica mutacija ili krivog procesiranja amiloid prekursor proteina (engl. *amyloid precursor protein*, APP). Plakovi u najvećoj mjeri sadržavaju β amiloid (A β), fragment široko rasprostranjenog proteina APP (14). Oksidativni procesi dovode do

transformacije neagregiranog A β u agregirani A β (15). A β ima visok afinitet za vezanje metalnih iona, stoga je djelomično odgovoran za nakupljanje Fe u mozgu (16). Kako A β nastaje u normalnim fiziološkim uvjetima, toksična uloga se može pripisati kompleksu sa Fe (16). U prisutnosti slobodnih radikala, agregirani A β je izvor daljnjeg stvaranja slobodnih radikala (15). APP protein je bitan za prevenciju akumulacije Fe unutar neurona jer izbacuje Fe u izvanstanični prostor, stoga se i ekspresija APP proteina povećava s povećanim razinama unutarstaničnog Fe. A β , odnosno senilni plakovi, djeluju kao okidač za aktivaciju mikroglije (12). Agregirani nefunkcionalni proteini mogu stvarati stres endoplazmatskog retikuluma (engl. *unfolded protein response*, UPS) što je zajednička karakteristika brojim neurodegenerativnim bolestima (8).

1.2.5. Tau protein

Lezije neurofibrila su građene od mikrotubula u aglomeraciji s hiperfosforiliranim tau proteinom (14). Tau protein je fosfoprotein ključan za sklapanje i stabilizaciju mikrotubula (14). Tau proteini uspostavljaju vezu između mikrotubula i citoskeletnih proteina te na taj način grade neuronsku mrežu mikrotubula i sudjeluju u održavanju oblika stanice (17). Glavna abnormalnost tau proteina je hiperfosforilacija ili abnormalna fosforilacija što dovodi do neurofibrilarne lezije i procesa koji uzrokuju nakupljanje tau proteina (14,17). Neurofibrilarne lezije, odnosno neurofibrilarni snopovi, se sastoje od parova zavijenih filamenata i povezanih ravnih filamenata (14). Količina neurofibrilarnih snopova korelira s jačinom demencije (18). Hiperfosforilacija tau proteina sprječava njegovo vezanje na mikrotubule koji time postaju nestabilni, struktura im se raspada i hiperfosforilirani tau se sam sklapa u neurofibrilarne snopove (19,20). Toksičan efekt nakupljanja tau proteina zapažen je kod mnogih neurodegenerativnih bolesti. Smatra se da napredovanjem bolesti nakupine tau proteina imaju mogućnost putovati od neurona do neurona tako da budu preuzete od strane okolnih neurona (13,21,22). Vjeruje se da nakupljanje Fe pospješuje agregaciju tau proteina i stvaranje neurofibrilarnih lezija (13).

1.3 Neurodegeneracija

Narušena homeostaza metala, pogotovo Fe, opažena je u brojnim neurodegenerativnim bolestima (13). Nakupljanje Fe izaziva stres neurona koji odgovara na stres staničnim preživljenjem ili staničnom smrti, odnosno neurodegeneracijom. Ometanjem mitohondrijske funkcije ubrzava progresiju neurodegenerativnih bolesti (13).

1.3.1 Alzheimerova bolest

Alzheimerova bolest (AD) je progresivna neurodegenerativna bolest i najučestaliji oblik demencije (23). Najveći rizični čimbenik za nastanak ove bolesti je starost što se pripisuje efektima koji su nastali utjecajem slobodnih radikala te se akumulirali tijekom godina (23,15). Dijabetes, pretilost, hipertenzija i pušenje su također čimbenici koji povećavaju rizik za razvoj demencije (24). AD se češće pojavljuje kod žena, a prevalencija osobito raste nakon 65. godine (25). Bolest narušava normalne metaboličke puteve u neuronima te dovodi do smrti neurona. Klinički se očituje gubitkom pamćenja, promjenama u ponašanju i poteškoćama u obavljanju svakodnevnih aktivnosti (23). Potencijalni značaj estrogena je vidljiv u razdoblju nakon menopauze kad su mu niske vrijednosti, a povećana je osjetljivost žena na neurodegenerativne bolesti (26). Stoga se smatra da gubitak estrogena tijekom menopauze doprinosi razvoju bolesti (25). Estrogen sudjeluje u razvoju i funkciji središnjeg živčanog sustava te ima važnu neuroprotektivnu ulogu. Sprječava širok raspon toksičnih učinaka, posebno toksični učinak $A\beta$, tako što štiti od njegovog nakupljanja (26). Najvažnija tkivna promjena su senilni plakovi i pojava neurofibrilarnih snopova kojima prethodi oksidativni stres (23,27). Neurofibrilarni snopovi tipično sadržavaju tau protein dok senilni plakovi sadržavaju $A\beta$, u senilnim plakovima se još nalaze Fe, transferin i feritin (15). Bolest je povezana s povećanjem količine Fe što je posljedica poremećene homeostaze Fe (23). Distribucija Fe odgovara distribuciji senilnih plakova i neurofibrilarnih snopova. Fe povezano s ovim lezijama pridonosi daljnjim oksidativnim procesima (15).

Još je nedovoljno poznata uloga stresa u neurodegenerativnim procesima. Posebno su zahtjevne studije stresa na starijim životinjama. Pokusi se radije izvode na mladim životinjama koje imaju manji rizik za razvoj Alzheimerovog tipa patologije. Također, većina studija radi se na životinjama muškog spola pa nedostaju studije na životinjama ženskog spola.

2. HIPOTEZA

Kronični stres, radi povećanja učinkovitosti oksidativne fosforilacije, uzrokuje nakupljanje Fe u neuronima što dovodi do endoplazmatskog stresa i nakupljanja precipitiranih proteina izvan i unutar stanice, osobito u dopaminergičkim neuronima te osobito kod starijih ženki.

3. CILJEVI

Cilj istraživanja je napraviti imunokemijska i histološka bojenja na Fe i amiloid iz arhive rezova tkiva mozgov mladih i starih ženki Sprague Dawley štakora koji su izloženi pravom i lažnom kroničnom stresu te utvrditi moguću povezanost kroničnog stresa, poremećaja metabolizma Fe i neurodegeneracije.

1. Uporabom modifikacije histološkog bojenja Pearls-DAB na rezovima mozga procijeniti sadržaj Fe u dopaminergičkim jezgrama mozga.
2. Uporabom imunohistokemijske metode prikazivanja transferina kvantificirati količinu ovog transportnog proteina za Fe u ciljnim regijama mozga.
3. Uporabom histološke boje *Congo* crvene procijeniti količinu amiloida na rezovima mozga u četirima skupinama životinja.
4. Uporabom imunohistokemijske metode u kojoj se koristi primarno protutijelo na tau protein procijeniti količinu unutarstaničnih precipitata hiperfosforilirane forme mikrotubula u četirima skupinama životinja.

4. MATERIJALI I METODE

4.1 Ustroj studije

Istraživanje je ustrojeno kao studija parova. Dvije su grupe životinja, mlade i stare. Mlade životinje su u pokus ušle s navršениh 3,5 mjeseca, a stare s 12 mjeseci. U studiji parova analiziramo životinje koje su pokus započele u starosti od 3,5 mjeseci podijeljene u grupe životinja: izloženih pravom stresu ili lažnom 'sham' stresu te životinje koje su u dobi od 12 mjeseci izložene pravom i lažnom stresu.

4.2 Materijali

U studiji je korišteno moždano tkivo mladih i starih ženki štakora Sprague Dawley izloženih pravom i lažnom kroničnom stresu. Tkiva su prikupljena u sklopu HRZZ projekta *Patofiziološke posljedice promjene sastava lipidnih splavi* odobrenog od strane Etičkog povjerenstva za istraživanje Medicinskog fakulteta Osijek te Ministarstva poljoprivrede Uprave za veterinarstvo i sigurnost hrane (Klasa:602-04/16-08/15; Broj: 2158-61-07-16-143; dana 16. prosinca 2016.) voditeljice prof.dr.sc. Marije Heffer. Dio studije prikazan u ovom završnom radu odobrilo je Etičko povjerenstvo za istraživanje Medicinskog fakulteta Osijek pod brojem 2158-61-07-18-103. Ukupno je korišteno 40 ženki štakora Sprague Dawley podijeljenih u 4 skupine: 1. mlade životinje izložene lažnom stresu, 2. mlade životinje izložene pravom stresu, 3. stare životinje izložene lažnom stresu, 4. stare životinje izložene pravom stresu. Ukupno je 4 skupine životinja s po 10 životinja u svakoj skupini. Životinje su odvojene u dvije dobne skupine, skupina mladih životinja koja je pokus započela u dobi od 3,5 mjeseca i skupina starijih životinja koje su u pokus ušle s navršениh 12 mjeseci. Mlade životinje su žrtvovane s navršениh 6 mjeseci, a starije s navršениh 14,5 po završetku studije. U pokusu koji je trajao 10 tjedana izvedeno je izlaganje kroničnom stresu u tri ponavljanja od 10 dana sa stankom dva tjedna između svakog ponavljanja. Kako bi se izbjegao specifičan odgovor na stres, korišteni su stresori koji utječu na sve organske sustave te su tijekom protokola svaki dan kombinirana dva različita stresora istodobno. Stresori koji su korišteni u protokolu su: 1. izlaganje svjetlu tijekom perioda mirovanja (od 14.00 do 16.00 sati), 2. boravak kaveza sa štakorima na laboratorijskoj tresilici u trajanju 40 minuta, 3. izlaganje zvukovima alarma mobilnog uređaja tijekom perioda mirovanja (od 14.00 do 16.00 sati), 4. prisilno plivanje u hladnoj vodi (12-14°C) u trajanju 3 minute, 5. imobilizacija u metalnim tuljcima, 6. izlaganje hladnoći (4-8°C) tijekom 1h, 7. test tolerancije na glukozu, 8. test tolerancije na inzulin, 9. gladovanje prije testova tolerancije na inzulin (3h prije testa) i na glukozu (14.00 do 16.00 sati prije testa). U kontrolnoj je skupini izveden lažni stres koji je

uključivao istovjetan okoliš kao i u ispitivanoj skupini samo bez stresora. Nakon žrtvovanja životinja uzorci namijenjeni imunohistokemijskoj analizi su prvo fiksirani u 4% paraformaldehidom u trajanju od 48 sati na temperaturi +4°C. Uzorci su potom krioprotektirani na +4°C u 10%-tnoj, potom 20%-tnoj i 30%-tnoj otopini saharoze u PBS-u (engl. *Phosphate buffered saline*) u trajanju potrebnom da tkivo potone na dno epruvete. Zatim su uzorci do daljnje obrade pohranjeni u hladnjaku na temperaturi -80°C.

4.3 Metode

40 uzoraka mozga fiksiranih i krioprotektiranih rezani su na kriostatu (Leica CM3050 S Wetzlar, Njemačka) u koronarnom smjeru na debljinu od 35µm. Preparati su nakon rezanja pohranjeni u de Olmos na -18°C do daljnje obrade. Za dokazivanje željeza u mozgu korištena je modificirana boja Perls-DAB (DAB, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Za Perls-DAB bojenje rezovi su navučeni na želatinizirana stakla te osušeni preko noći na sobnoj temperaturi. Susjedni rezovi su bojani histološkim bojenjem *Kongo* crvenom bojom kojom se prikazuju plakovi amiloida. Imunohistokemijskom metodom, uz pomoć protutijela na transferin i tau protein, te odgovarajućim sekundarnim protutijelima vizualiziranim diaminobenzidinom, prikazani su položaj transferinskog receptora i precipitati unutarstaničnih proteina. Histološki i imunohistokemijski preparati fotografirani su mikroskopom (Zeiss Axio MOT 2) s kamerom Olympus DP70 i zatim kvantificirati programom ImageJ FIJI (win64).

4.3.1 Histološka bojanja

Za dokazivanje prisustnosti Fe u rezovima mozga koristili smo modificiranu metodu Perls-DAB, a reakciju pojačali inkubiranjem u otopini diaminobenzidina priređenoj po uputama proizvođača. Osušene rezove smo rehidrirali u destiliranoj vodi tijekom 10 minuta. Potom smo rehidrirane rezove inkubirali 60 minuta na tresilici u Perlsovoj otopini koja je sadržavala 4% kalijevoeg fericijanida, 10% polivinilpirolidina te 0,2M HCl. Isprali smo rezove destiliranom vodom 3x po dvije minute. Zatim smo rezove inkubirali u metanolu s vodikovim peroksidom volumnog udijela 1%, 75 minuta postavljene na tresilicu. Slijedilo je ispiranje vodom 3x po dvije minute te razvijanje boje u otopini diaminobenzidina 20 minuta. Otopinu DAB-a smo isprali destiliranom vodom 3x po dvije minute.

Za dokazivanje amiloida koristili smo histološko bojenje *Congo Red* prema protokolu iz Linda L. Vacca; Laboratory manual of Histochemistry. Rezovi su tri puta isprani u PBS-u, potom jednom 30 sekundi u destiliranoj vodi. Zatim su rezovi stavljeni u otopinu boje *Congo*

Red koja je pripremljena kako slijedi 0,1g *Congo Red* boje u 100 ml 50%-tnog etanola. Nakon bojenja, rezove dva puta ispiramo u običnoj vodi i stavljamo u razvijač koji je sadržavao 0,2g natrijevog hidroksida u 100ml 80%-tnog etanola. Rezove držimo u razvijaču dok ne uočimo odbojavanje. Nakon razvijača još tri puta ispiramo u destiliranoj vodi i potom navlačimo rezove na želatinizirana stakla. Rezovi su ostavljeni da se osuše na sobnoj temperaturi, a potom su prekriveni Vectamount pokrivalom za imunohistokemijske preparate (Vector, Laboratories, Burlingame, CA USA) i pokrovnim stakalcem.

4.3.2 Imunohistokemijska bojanja

Položaj transferinskog receptora i nakupljanje unutarstaničnih proteina prikazali smo protutijelima na transferin i tau protein, te odgovarajućim sekundarnim protutijelima koja su vizualizirana diaminobenzidinom.

Za prikazivanje transferina korištena su mišja protutijela (anti-Transferrin Receptor s 0.1% sodium azid; Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA) i sekundarna kozja protu mišja (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. West Grove, PA, SAD). Zasebni rezovi za dokazivanje tau proteina su inkubirani u primarnom protutijelu (Anti-Tau (4-repeat isoform RD4) clone 7D12.1, MAB 361-millipor, Millipore, Temecula, CA, SAD) i sekundarnom (Biotin-SP-conjugated AffiniPure Goat Anti-mouse IgG, Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. West Grove, PA, SAD). Preparate pohranjene u de Olmos-u smo ispirali tri puta u 1xPBS-u, a potom su stavljeni u predtretman s 1% H₂O₂ u PBS-u dva puta sa svrhom blokiranja endogenih peroksidaza. Uzorke smo prebacili u blokirajuću otopinu koja je sadržavala 1% BSA (engl. *Bovine serum albumin*) i 5% kozjeg seruma u PBS-u. Nakon blokiranja nespecifičnih vezanja protutijela rezove smo stavili u otopinu primarnog protutijela na transferin, a susjedne rezove u anti-tau u razrjeđenju 1:500 kojeg smo priredili u otopini za blokiranje nespecifičnog vezanja. Inkubirali smo preko noći na tresilici na +4°C. Rezove smo isprali u PBS-u tri puta po 10 minuta, a potom premjestili u otopinu sekundarnog protutijela razrijeđenog u otopini za blokiranje u omjeru 1:500. Uzorke smo inkubirali na +4°C na tresilici tijekom četiri sata. Potom su rezovi isprani tri puta po 10 minuta u PBS-u te premješteni u otopinu tercijarnog kompleksa. Tercijarni kompleks sadržava avidin u razrjeđenju 1:250 i biotin-HRP (*enzyme horseradish peroxidase*) u istom razrjeđenju. Tercijarni kompleks se inkubira dva sata na +4°C na treskalici, a potom ispiru u PBS-u tri puta po 10 minuta i jednom u TBS-u (*Tris-HCl Buffered Saline*) 10 minuta. Vizualizacija je napravljena u DAB otopini u trajanju od tri minute. Vremena razvijanja i temperature su bili jednaki za sve grupe rezova. Potom su obojeni preparati navučeni na predmetna stakalca i

ostavljeni da se osuše na sobnoj temperature. Osušeni preparati su prekriveni Vectamount pokrivalom za imunohistokemijske preparate (Vector Laboratories, Burlingame, CA USA) i pokrovnim stakalcem.

4.4 Statističke metode

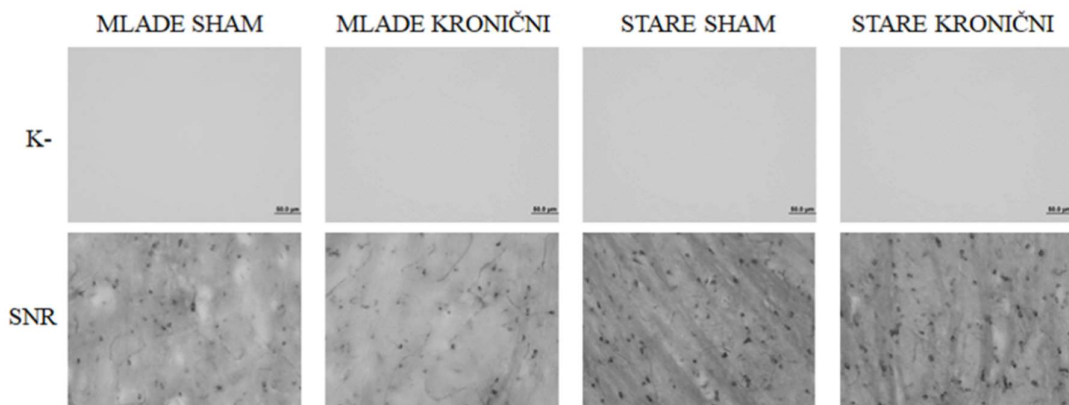
Kategorijski podatci su predstavljeni apsolutnim i relativnim frekvencijama. Numerički podatci su opisani aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom u slučaju raspodjela koje slijede normalnu, a u ostalim slučajevima medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između dviju nezavisnih skupina su testirane Studentovim t testom, a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Mann-Whitneyevim U testom. Sve P vrijednostisu dvostrane. Razina značajnosti je postavljena na $p= 0,05$ Za statističku analizu korišten je statistički program Statistica 12 (Quest Software Inc., Aliso Viejo, CA, SAD).

5. REZULTATI

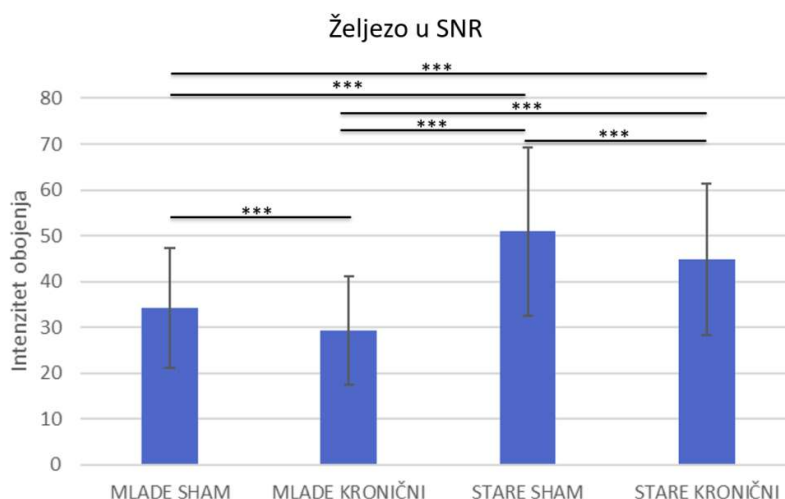
5.1 Nakupljanje Fe u stanicama *supstancije nigre pars retikulata* ženki izloženih kroničnom stresu

Starenje diže razine Fe pa i životinje izložene sham stresu i životinje izložene kroničnom stresu imaju više vrijednosti Fe od mladih skupina u stanicama *supstancije nigre pars retikulata* (SNR). U starijoj skupini životinje izložene kroničnom stresu imaju značajno manje nakupljenog Fe nego životinje izložene sham stresu ($p < 0,001$). U mlađoj skupini životinje izložene kroničnom stresu pokazuju statistički značajno manje nakupljanje Fe od životinja izloženih sham stresu ($p < 0,001$) (Slika 2). Dakle, treba naglasiti kako kronični stres i kod mladih i kod starih životinja smanjuje količine Fe u odnosu na odgovarajuće životinje izložene lažnom stresu.

ŽELJEZO U SNR



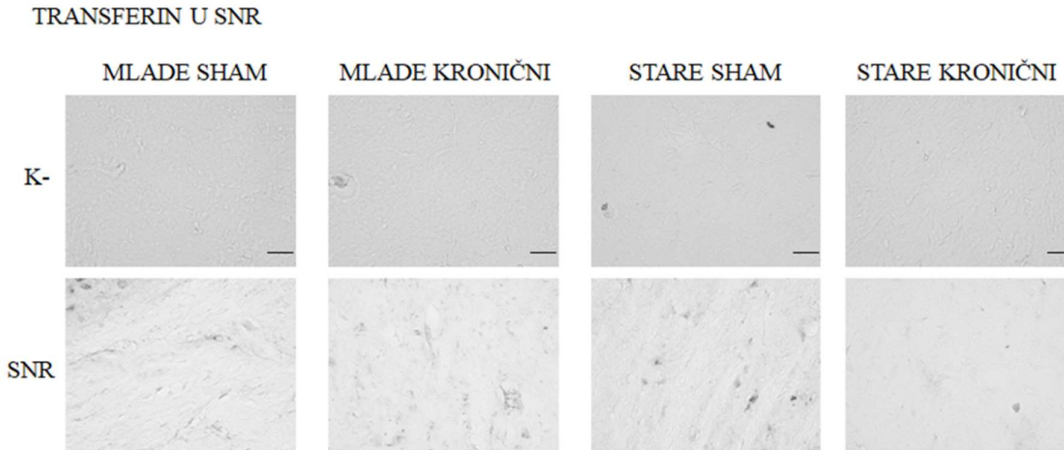
Slika 1. Prikaz rezultata histološkog bojenja Perls DAB za dokazivanje prisutnosti Fe u SNR-u mladih i starih ženki izloženih kroničnom stresu. Povećanje 400x, veličina skale 50μm.



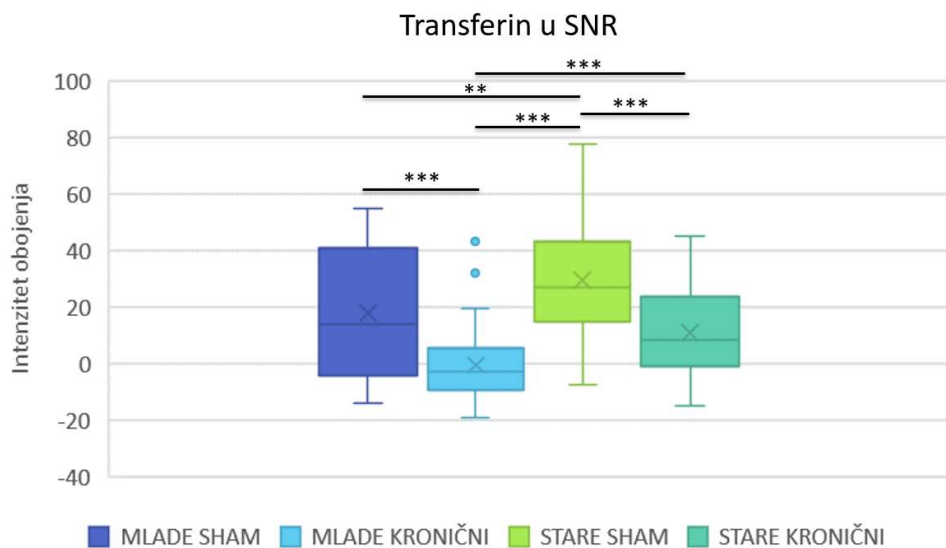
Slika 2. Prikaz rezultata histološkog bojenja Perls DAB za dokazivanje prisutnosti Fe u SNR-u mladih i starih ženki izloženih kroničnom stresu. T test za nezavisne uzorke, * statistička značajnost $p < 0,05$; ** statistička značajnost $p < 0,005$; *** statistička značajnost $p < 0,001$

5.2 Imunohistokemijski prikaz transferinskog receptora u SNR-u

Stare sham životinje, po intenzitetu obojenja, imaju najveću ekspresiju transferinskog receptora na membranama stanica u SNR-u. Nakon njih slijede mlade sham životinje. Stare životinje izložene kroničnom stresu pokazuju statistički značajno manji intenzitet obojenja nego stare životinje izložene sham stresu ($p < 0,001$) (Slika 4). Mada kronični stres generalno snižava ekspresiju transferina, treba naglasiti kako stara skupina izložena kroničnom stresu ima više transferina od mlade skupine izložene kroničnom stresu ($p < 0,001$). Naši rezultati pokazuju da starenje samo po sebi diže ekspresiju transferinskog receptora. U skupini mladih životinja postoji statistički značajna razlika u ekspresiji transferina, mlade životinje izložene kroničnom stresu ekspimiraju manje nego životinje izložene sham stresu ($p < 0,001$).



Slika 3. Prikaz imunohistokemijskog bojenja na transferinski receptor u strukturi SNR-a, Povećanje 400x, veličina skale 50 μ m.



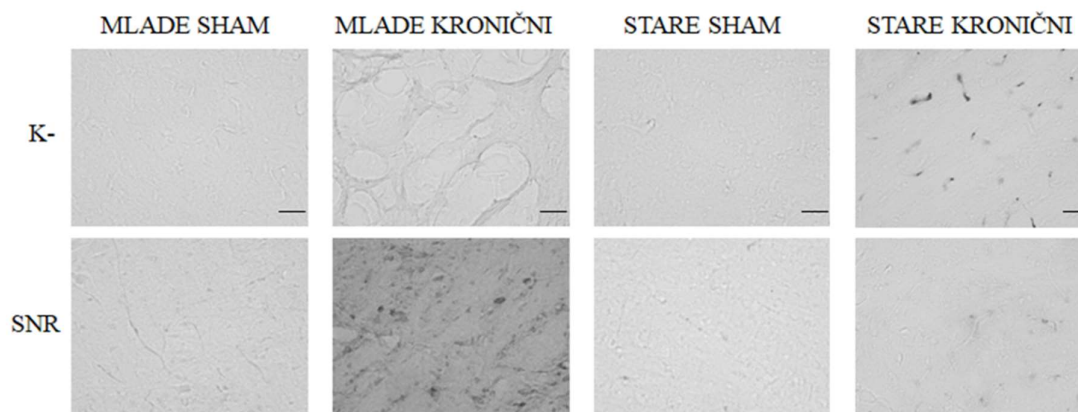
Slika 4. Prikaz imunohistokemijskog bojenja na transferinski receptor u strukturi SNR-a, retikularni dio. Mann-Whitney U test. * statistička značajnost $p < 0,05$; ** statistička značajnost $p < 0,005$; *** statistička značajnost $p < 0,001$

5.3 Nakupljanje pTAU u stanicama SNR-a ženki izloženih kroničnom stresu

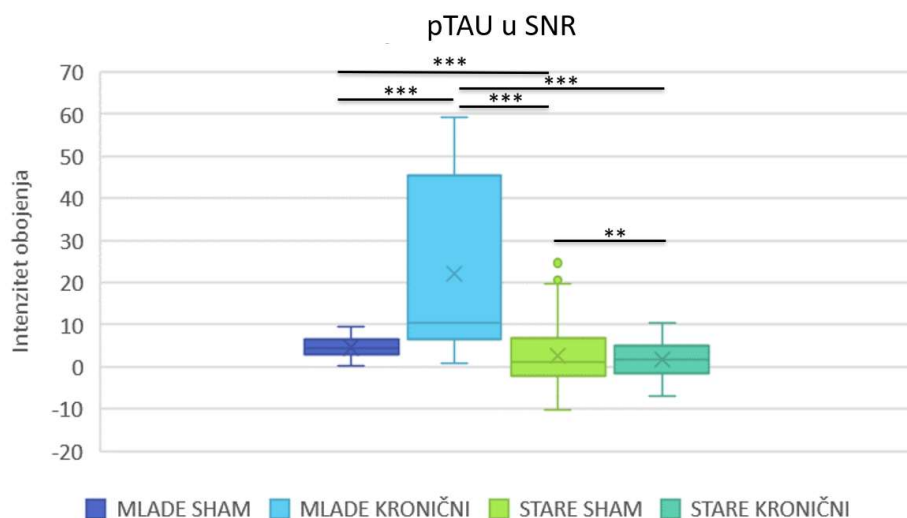
Stanice jezgre SNR-a nisu sklone nakupljanju pTAU i količine se jako male u svim skupinama. Mlade životinje nakupljaju više tau agregata za razliku od starih skupina. Mlade životinje izložene kroničnom stresu nakupljaju najviše tau agregata u odnosu na svoju

kontrolnu skupinu te se čini da mlade životinje imaju čak veći rizik za nakupljanje pTAU od starih životinja. Kod starijih životinja, životinje izložene kroničnom stresu nakupljaju manje pTAU od životinja izloženih sham stresu i pokazuju statistički značajnu razliku ($p < 0,005$) (Slika 6).

pTAU u SNR



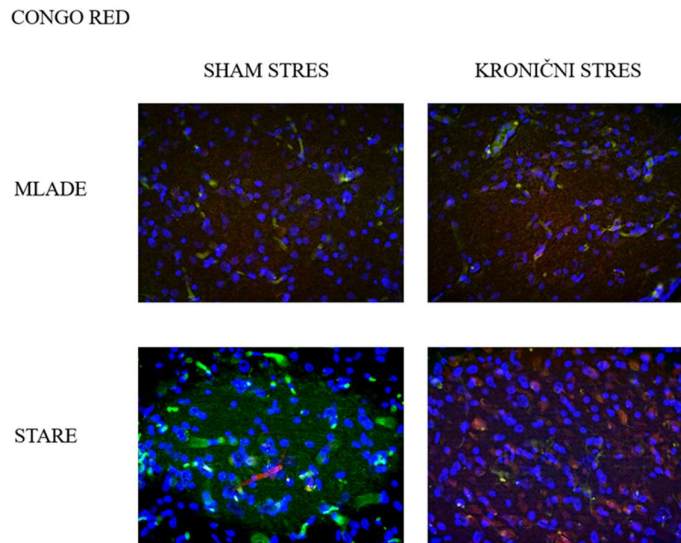
Slika 5. Prikaz imunohistokemijskog bojenja na pTAU u strukturi SNR-a. Povećanje 400x, veličina skale 50 μ m.



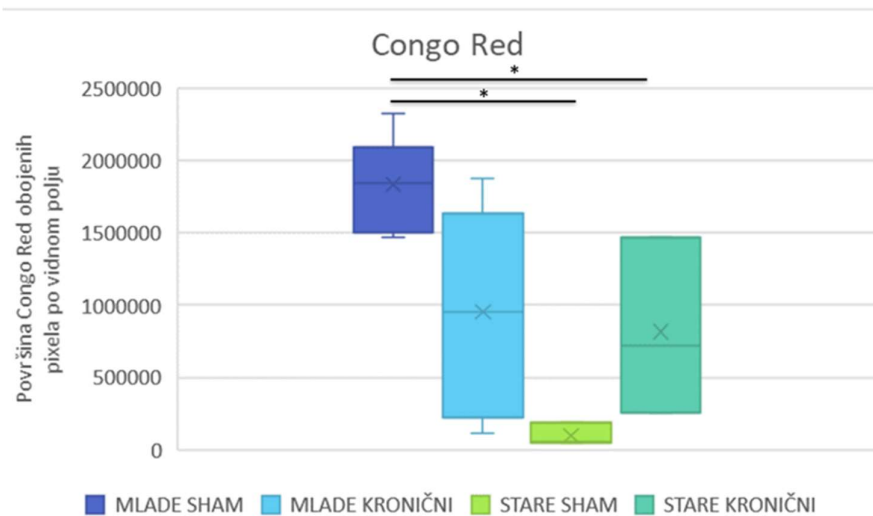
Slika 6. Prikaz imunohistokemijskog bojenja na pTAU u strukturi SNR-a. Mann-Whitney U test. * statistička značajnost $p < 0,05$; ** statistička značajnost $p < 0,005$; *** statistička značajnost $p < 0,001$

5.4 Nakupljanje amiloida u stanicama SNR-a ženki izloženih kroničnom stresu

Stanice jezgre SNR-a nisu sklone nakupljanju amiloida. Jezgra je autofluorescentna radi svoje dopaminergičke prirode pa je autofluorescencija najviša u mladim sham, vjerojatno zato što ove životinje imaju najveći metabolizam monamina (Slika 8) Kako bi ovo dokazali, potrebno je napraviti imunohistokemijsko bojenje na A β da bi mogli specifično procijeniti količinu amiloida u ovoj jezgri.



Slika 7. Prikaz histološkog bojenja *Congo Red* za dokazivanje prisustnosti amiloida u SNR-u mladih i starih ženki izloženih kroničnom stresu. Povećanje 400x, veličina skale 50 μ m. Prikaz rezultata histološkog bojanja *Congo Red* za prikazivanje amiloida. Fotografirano kroz 4 filtera, DAPI, crvenim, zelenim i svjetlosnim. U kompozitima su korištena 3 filtera: DAPI, crveni i zeleni.



Slika 8. Prikaz histološkog bojenja *Congo Red* za dokazivanje prisustnosti amiloida u SNR-u mladih i starih ženki izloženih kroničnom stresu. Mann-Whitney U test. * statistička značajnost $p < 0,05$; ** statistička značajnost $p < 0,005$; *** statistička značajnost $p < 0,001$

6. RASPRAVA

U ovome je istraživanju ispitivan utjecaj kroničnog stresa na promjene metabolizma Fe u mozgu kod ženki Sprague Dawley štakora. Histološkim bojenjem Pearls-DAB na rezovima mozga, procijenjena je količina Fe u SNR regiji u četirima skupinama životinja. Značajna spoznaja je da starenje kod životinja povećava nakupljanje Fe u mozgu. S druge strane, kroničan stres snižava razinu Fe i kod mladih i kod starijih skupina. Ranije studije o distribuciji Fe zaključile su da se količina nakupljenog Fe povećava s godinama i to pretežno u dopaminergičkim neuronima (7). Dakle, dobiveni rezultati su u skladu s dosadašnjim istraživanjima.

Imunohistokemijom na transferinski receptor procijenili smo količinu ekspresije transferina u stanicama SNR-a. Isti obrazac za sve četiri skupine, kao kod nakupljanja Fe, primjećujemo i kod ekspresije transferinskog receptora. Transferin uz transferinski receptor služe za unos slobodnog željeza unutar stanice. Starenje podiže razinu ekspresije transferinskog receptora, stoga stanice imaju veći kapacitet za nakupljanje Fe koje im je potrebno za oksidativne procese. Kroničan stres spušta razinu ekspresije transferinskog receptora pa tako stanice imaju manji kapacitet za nakupljanje Fe. Ekspresija transferinskog receptora je proporcionalna nakupljanju Fe. Što je veća, to je više nakupljenog Fe u stanici. Prijašnja istraživanja su pokazala povezanost AD-a s povećanjem količine Fe u stanici, no to možemo pripisati starenju koji je najveći rizični čimbenik za nastanak bolesti. Fe koje se nakuplja kroz proces starenja dovodi do oksidativnog oštećenja. Od prije je poznato da je neurodegeneracija kod pacijenata s AD-om povezana s oksidativnim oštećenjem (29). Oksidativni stres je jedan od čimbenika za razvoj inzulinske rezistencije. Nemogućnost mišićnih i masnih stanica da iskorištavaju inzulin dovodi do razvoja dijabetesa tipa 2. Kod AD-a prezentira se specifična pojava inzulinske rezistencije u tkivu mozga, a dijabetes tipa 2 je sam po sebi rizik za nastanak AD-a. Pojava dijabetesa mozga, vjerojatno izazvana oksidativnim stresom i nastankom inzulinske rezistencije u mozgu, nazvana je dijabetes tipa 3. Mnoga istraživanja potvrđuju povezanost neurodegenerativnih bolesti s nakupljanjem Fe pa je jedan od glavnih uzroka neuronske smrti preopterećenje Fe i oksidativni stres do kojega Fe dovodi. Za sada neurodegeneracija nije direktno povezana s kroničnim stresom. Pretpostavka je da bi trebalo izlagati životinje stresorima kroz duži vremenski period kako bi se prepoznao utjecaj stresa i nadvladao sam utjecaj starenja.

Imunohistokemijskim bojenjem na pTAU procijenjena je količina hiperfosforiliranih mikrotubulima pridruženih proteina u četirima skupinama životinja izloženih kroničnom

stresu. Kod mnogih neurodegenerativnih bolesti je zapaženo nakupljanje pTAU i agregacija pTAU unutar neurona. Narušen metabolizam TAU proteina pospješuje degeneraciju živčanih stanica kroz razne mehanizme koji mogu uključivati mutacije pTAU proteina ili povećanu osjetljivost stanica. Kako je sastavni dio mikrotubula, abnormalna fosforilacija tau proteina sprječava normalan transport tvari između aksona (17). U našem istraživanju pokazali smo kako stanice jezgre SNR-a nisu sklone nakupljanju pTAU i količine su jako male u sve 4 skupine. Mlade životinje imaju veći rizik za nakupljanje pTAU od starijih životinja kod kojih stres čak spušta razinu nakupljanja pTAU. Najviše pTAU imaju životinje kod kojih je Fe najniži, dakle količina Fe i pojava pTAU nisu povezani i Fe ne predviđa pojavu pTAU proteina, barem ne na epitopu kojeg smo prikazali protutijelom korištenim u našoj studiji. Ovo ne isključuje mogućnost da je došlo do fosforilacije nekih drugih epitopa na TAU protein koje ne prepoznaje naše protutijelo.

Kongo crvenim bojenjem za prikazivanje amiloida procijenili smo količinu nakupljenih amiloida, odnosno senilnih plakova u SNR-u životinja nakon izlaganja kroničnom stresu. Senilni plakovi u mozgu pacijenata s AD-om su nakupine A β . Prijašnja istraživanja su pokazala da oksidativni stres uzrokuje nakupljanje A β te suprotno, kao i obrnuto - da nakupljanje A β uzrokuje oksidativni stres (28). Baš kao i u slučaju pTAU, u našem istraživanju nismo dokazali kako starenje ili stres dovode do povećanja broja senilnih plakova. Iz naših rezultata bi se moglo zaključiti kako stanice SNR-a nisu sklone nakupljati amiloid, već da je jezgra SNR autofluorescentna zbog svoje dopaminergičke prirode. Mlade sham životinje pokazuju najveću autofluorescenciju ove regije moguće zbog najvećeg metabolizma monoamina. Prema istraživanju Weiss S. i sur. u mozgu pacijenata s AD-om uz amiloidne plakove primjećene su i povećane aktivnosti monoamin oksidaze B (MAO-B, engl. *monoamine oxidase B*) i to čak prije pojave prvih simptoma. A β nastaje proteolitičkim procesima od APP-a djelovanjem γ - sekretaze. γ - sekretaza je bitan enzim u patogenezi AD-a jer ima sposobnost spriječiti neurotoksične utjecaje A β . Istraživanje je dokazalo povezanost MAO-B i γ - sekretaze te pretpostavilo da MAO-B regulira produkciju A β u neuronima putem γ - sekretaze. Na taj način su povezali MAO-B i AD, no mehanizam kojim MAO-B utječe na patogenezu AD-a još nije poznat (30). S obzirom da histološko bojenje samo po sebi nije dovoljno osjetljivo bilo bi potrebno napraviti imunohistokemijsko bojenje da bi mogli ekgzaktno procijeniti količinu amiloida.

Hipoteza da kronični stres uzrokuje nakupljanje Fe u neuronima što dovodi do endoplazmatskog stresa i nakupljanja precipitiranih proteina izvan i unutar stanice, a osobito

u dopaminergičkim neuronima te osobito kod starijih ženki je oborena. Patogeneza AD-a je heterogena i postoji mnogo čimbenika koji mogu utjecati na nastanak bolesti. Sadašnja literatura daje nekoliko pretpostavki za povezanost AD-a s narušenom homeostazom Fe; mogućnost da mozak u AD-u tijekom starenja nakuplja više Fe, da se Fe neprikladno transportira ili neprikladno otpušta (31). Dakle, narušena homeostaza Fe je ključna u patologiji AD-a. Smatra se da stres ima ulogu u neurodegenerativnim procesima, no mehanizam je još nedovoljno poznat.

7. ZAKLJUČAK

1. Starenje uzrokuje nakupljanje Fe u neuronima strukture SNR-a ženki štakora dok kronični stres snižava te razine.
2. Ekspresija transferinskog receptora je proporcionalna nakupljanju Fe u neuronima strukture SNR.
3. Kronični stres uzrokuje nakupljanje pTAU, no rizik postoji samo kod mlađih ženki štakora.

8. SAŽETAK

Uvod: U ovom je istraživanju ispitivan utjecaj kroničnog stresa na promjene metabolizma Fe. Narušena homeostaza Fe i povećana količina Fe opažena je u brojnim neurodegenerativnim bolestima. Višak Fe koji se nakuplja stvara oksidativno oštećenje i uzorkuje nakupljanje amiloida i neurodegeneraciju.

Ciljevi: Napraviti imunokemijska i histološka bojanja na Fe i amiloid iz tkiva mozgova mladih i starih ženki Sprague Dawley štakora te utvrditi moguću povezanost kroničnog stresa, poremećaja metabolizma Fe i neurodegeneracije.

Materijali i metode: Korišteno je 40 ženki štakora Sprague Dawley podijeljenih u 4-ima skupinama: 1. mlade životinje izložene lažnom stresu, 2. mlade životinje izložene pravom stresu, 3. stare životinje izložene lažnom stresu, 4. stare životinje izložene pravom stresu. Istraživanje je ustrojeno kao studija parova. Za dokazivanje prisutnosti Fe u rezovima mozga koristili smo modificiranu metodu Perls-DAB. Imunohistokemijskom metodom, uz pomoć protutijela na transferin i tau protein, te odgovarajućim sekundarnim protutijelima vizualiziranim diaminobenzidinom, prikazali smo položaj transferinskog receptora i precipitate unutarstaničnih proteina. Amiloide smo vizualizirali histološkim bojenjem *Congo Red*.

Rezultati: Ključna saznanja su da starenje kod životinja povećava nakupljanje Fe u mozgu, s druge strane kroničan stres snižava razinu Fe i kod mladih i kod starijih skupina. Ekspresija transferinskog receptora prati isti obrazac kao i nakupljanje Fe. Stanice jezgre SNR-a nisu sklone nakupljanju pTAU. Baš kao u slučaju pTAU, nismo dokazali kako starenje ili stres dovode do povećanja broja senilnih plakova.

Zaključak: Hipoteza nije potvrđena, kroničan stres nije uzrokovao nakupljanje Fe u neuronima SNR-a kod mladih ni kod starijih ženki štakora.

Ključne riječi: mozak; SNR regija; stres; željezo

9. SUMMARY

Introduction: This study investigated the influence of chronic stress on changes in Fe metabolism. Disturbed homeostasis Fe and increased amount of Fe were observed in many neurodegenerative diseases. The accumulated excess of Fe causes oxidative damage, amyloid accumulation and neurodegeneration.

Goals: To make immunochemical and histological coloring on Fe and amyloid from the brain tissue of young and old Sprague Dawley rats, and to determine the possible association of chronic stress, metabolic disorders of Fe and neurodegeneration.

Materials and Methods: 40 females of Sprague Dawley rats were divided into 4 groups: 1. young animals exposed to fake stress, 2. young animals exposed to chronic stress, 3. old animals exposed to fake stress, 4. old animals exposed to the chronic stress. The research is structured as a study of pairs. In order to prove the presence of Fe in brain sections we used the modified Perls-DAB method. By the immunohistochemical method, with the help of antibodies to transferrin and tau protein, and the corresponding secondary antibodies visualized with diaminobenzidine, we showed the position of the transferrin receptor and intracellular proteins precipitates. We visualized the amyloid with the histological coloring of Congo Red.

Results: The key findings are that aging in animals increases the accumulation of Fe in the brain, on the other hand, chronic stress lowers the level of Fe, both in young and older groups. Expression of the transferrin receptor follows the same pattern as the accumulation of Fe. SNR nucleus cells are not prone to accumulation of pTAU. Just as with pTAU, we did not prove that aging or stress leads to an increase in the number of senile plaques.

Conclusion: The hypothesis was not confirmed, chronic stress did not cause the accumulation of Fe in SNR neurons in neither young nor older female rats.

Keywords: brain; SNR region; stress; iron

10. LITERATURA

1. Hudek-Knežević JA, Kardum IG, Stres i tjelesno zdravlje, 1. Izd. Zagreb: Naklada Slap; 2006;13-32
2. Chrousos GP. Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol.* 2009Feb;5(7):374–81.
3. Murray RO, Beder DA, Botham KA, Kennelly PE, Rodwell VI, Weil P. Harperova ilustrirana biokemija, 28. Izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.
4. Good PF, Olanow C, Perl DP. Neuromelanin-containing neurons of the substantia nigra accumulate iron and aluminum in Parkinsons disease: a LAMMA study. *Brain Res.* 1992;593(2):343–6.
5. Zucca FA, Segura-Aguilar J, Ferrari E, Muñoz P, Paris I, Sulzer D, et al. Interactions of iron, dopamine and neuromelanin pathways in brain aging and Parkinsons disease. *Prog Neurobiol.* 2017;155:96–119.
6. Squier TC. Oxidative stress and protein agregation during biological aging. *Exp Gerontol.* 2001;36:1539-1550.
7. Gerlach M, Ben-Shacham D, Riederer P, Youdim MBH. Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases? *J Neurochem.* 1994;3:793-807.
8. Ward RJ, Zucca FA, Duyn JH, Crichton RR, Zecca L. The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol.* 2014;13(10):1045–60.
9. Belovari T, Kibel A, Kostović-Knežević LJ. Transferin u zdravlju i bolesti. *Medicinski vijesnik.* 2006;38:21-24.
10. Čvorišec D, Čepeluk I. Štrausova Medicinska biokemija. 3. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2009.
11. Haigis MC, Yankner BA. The Aging Stress Response. *Molecular Cell.* 2010;40(2):333–44.
12. Jovanović Z, Mehanizmi neurodegeneracije kod Alchajmerove bolesti, *Med Pregl.* 2012;65:301-307
13. Liu Y, Connor JR. Iron and ER stress in neurodegenerative disease. *Biometals.* 2012Dec;25(4):837–45.
14. Spillantini MG, Goedert M. Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* 1998;21(10):428–33.
15. Christen Y. Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr.* 2000Jan;71(2).
16. Singh N, Haldar S, Tripathi AK, Horback K, Wong J, Sharma D, et al. Brain Iron Homeostasis: From Molecular Mechanisms To Clinical Significance and Therapeutic Opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* 2014Oct;20(8):1324–63.

17. Buée L, Bussièrè T, Buée-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative. *Brain Res Brain Res Rev.* 2000;33(1):95–130.
18. Michael-Titus A, Revest P, Shortland P. *The nervous system: basic science and clinical conditions.* Edinburgh: Churchill Livingstone; 2010.
19. Amyloid Plaques and Neurofibrillary Tangles. Bright Focus Foundation. Dostupno na: <https://www.brightfocus.org/alzheimers/infographic/amyloid-plaques-and-neurofibrillary-tangles>. Datum pristupa: 28.09.2018
20. Sontheimer H. Aging, Dementia, and Alzheimer Disease. *Diseases of the Nervous System.* 2015;:99–131.
21. Massachusetts General Hospital. "How Alzheimer's-associated protein tangles spread through brain: Rare, pathologic version of tau protein can pass directly from neuron to neuron." *ScienceDaily.* Dostupno na: <https://www.sciencedaily.com/releases/2015/10/151026132148.htm>. Datum pristupa: 29.08.2018
22. Jesus Ávila. *Jornal of Alzheimer's Disease.* Dostupno na adresu: <https://www.j-alz.com/editors-blog/posts/extracellular-tau-spreading>. Datum pristupa: 29.08.2018
23. Rastija A. Alzheimerova bolest. Dostupno na adresi: <http://digre.pmf.unizg.hr/4739/1/SEMINARSKI%20RAD-%20Alzheimerova%20bolest.pdf>. Datum pristupa: 29.08.218.
24. Reitz C, Brayne C, Mayeux R. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.* 2011Aug;7(3):137–52.
25. Paganini-Hill A, Henderson VW. Estrogen Deficiency and Risk of Alzheimers Disease in Women. *Am J Epidemiol.* 1994Jan;140(3):256–61.
26. Genazzani AR, Pluchino N, Luisi S, Luisi M. Estrogen, cognition and female ageing. *Hum Reprod Update.* 2006;13(2):175–87.
27. Cash A, Smith M, Perry G. Oxidative Stress Mechanisms and Potential Therapeutic Modalities in Alzheimer Disease. *Medicinal Chemistry Reviews - Online.* 2004Jan;1(1):19–23.
28. Smith DG, Cappai R, Barnham KJ. The redox chemistry of the Alzheimers disease amyloid β peptide. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1768(8):1976–90.
29. Sayre LM, Perry G, Smith MA. Oxidative Stress and Neurotoxicity. *Chem Res Toxicol.* 2008;21(1):172–88
30. Schedin-Weiss S, Inoue M, Hromadkova L, Teranishi Y, Yamamoto NG, Wichager B, et al. Monoamine oxidase B is elevated in Alzheimer disease neurons, is associated with γ -secretase and regulates neuronal amyloid β -peptide levels. *Alzheimers Res Ther.* 2017;9(1):57

31. Peters DG, Connor JR, Meadowcroft MD. The relationship between iron dyshomeostasis and amyloidogenesis in Alzheimers disease: Two sides of the same coin. *Neurobiol. Dis.*2015;81:49–65.

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Mia Jurić

Datum i mjesto rođenja: 07.11.1996. Vinkovci, 32100, Republika Hrvatska

Adresa: Ulica Josipa Kozarca 60, Vinkovci 32100

Obrazovanje:

2015.- preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike, Medicinski fakultet Osijek

2011.-2015. Opća gimnazija Matije Antuna Reljkovića, Vinkovci

2003.-2011. Osnovna škola Ivana Mažuranića, Vinkovci