

# Promjene metabolizma željeza u mozgu mužjaka Sprague Dawley štakora izloženih kroničnom stresu

---

**Putnik, Marina**

**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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:609460>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-06**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske  
dijagnostike**

**Marina Putnik**

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

**Završni rad**

**Osijek, 2018.**



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske  
dijagnostike**

**Marina Putnik**

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

**Završni rad**

**Osijek, 2018.**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Mentor rada: prof. dr. sc. Marija Heffer .

Rad ima 29 stranica i 8 slika.

## ZAHVALE:

Ovom prilikom želim zahvaliti svojoj mentorici, prof. dr. sc. Mariji Heffer, na stručnoj pomoći, savjetima i ogromnom strpljenju tijekom izrade završnog rada.

Zahvaljujem i asistentima Miloradu Zjaliću i Marti Balog na pruženoj pomoći i savjetima.

Veliko hvala mojoj obitelji i rodbini na pruženoj podršci tijekom studija.

Također zahvaljujem svojim prijateljima i kolegama na pruženoj podršci i prijateljstvu.

Od srca svima veliko hvala!

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Stres .....	1
1.2. Oksidacijski stres, promjene u metabolizmu željeza i starenje .....	3
1.3. Podloga osjetljivosti supstancija nigre na stres .....	5
1.4. Neurodegeneracija i promjene metabolizma željeza .....	6
2. HIPOTEZA .....	8
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	9
4. MATERIJALI I METODE .....	10
4.1. Ustroj studije.....	10
4.2. Materijali .....	10
4.3. Metode .....	11
4.3.1. Histološka bojanja.....	11
4.3.2. Imunohistokemijska bojanja .....	12
4.3.3. Statističke metode .....	13
5. REZULTATI.....	14
5.1. Nakupljanje željeza u stanicama SNR kod mužjaka izloženih kroničnom stresu .....	14
5.2. Imunohistokemijski prikaz transferinskog receptora u SNR.....	15
5.3. Nakupljanje pTAU u stanicama SNR životinja izloženih kroničnom stresu .....	16
5.4. Congo Red bojanje .....	18
6. RASPRAVA.....	20
7. ZAKLJUČAK .....	23
8. SAŽETAK.....	24
9. SUMMARY .....	25
10. LITERATURA.....	26
11. ŽIVOTOPIS .....	29

## POPIS KRATICA

A $\beta$	$\beta$ -amiloid
AD	Alzheimerova bolest (engl. <i>Alzheimer's disease</i> )
APP	amiloidni prekursorski protein (engl. <i>amyloid precursor protein</i> )
ATP	adenozin trifostaf
PBS	fosfatni pufer (engl. <i>Phosphate-Buffered Saline</i> )
pTAU	fosforilirani Tau protein (engl. <i>phosphorylated Tau protein</i> )
ROS	reaktivni kisikovi spojevi (engl. <i>Reactive Oxygen Species</i> )
SN	supstancija nigra (lat. <i>substantia nigra pars compacta</i> )
SNC	supstancija nigra kompaktni dio (lat. <i>substantia nigra pars compacta</i> )
SNR	supstancija nigra retikularni dio (lat. <i>substantia nigra pars reticulata</i> )
TBS	trometaminski pufer (engl. <i>Tris-Buffered Saline</i> )
TfR2	transferinski receptor 2
TfR1	transferinski receptor 1



# 1. UVOD

## 1.1. Stres

Stres se definira kao tjelesna ili mentalna napetost. Izazivaju ga stresori koji mogu promijeniti homeostazu u organizmu (1). Stresori mogu biti fiziološki, psihološki i okolišni, a sposobnost organizma da se „bori“ sa stresorima bitna je u održavanju zdravlja, a isto tako i u nastanku bolesti (2).

Ovisno o izloženosti organizma stresorima, stres možemo podijeliti na akutni i kronični. Akutni stres nastaje kratkotrajnim, svakodnevnim izlaganjima nekom stresoru te najčešće nije štetan za organizam (3). Akutni stresni odgovor štiti mozak i pomaže u obnavljanju i očuvanju homeostaze (4). No, u situacijama kroničnog stresa stresor je prisutan u duljem vremenskom intervalu, cijelo vrijeme utječe na organizam i može izazvati štetu (3). U slučaju da su akutni ili kronični stres proizveli samo adekvatan odgovor organizma na stresor kažemo da se radilo o eustresu, no ako je odgovor pretjeran – govorimo o distresu. Dakle, distres izaziva stalno izlaganje stresorima u kratkim vremenskim razmacima u kojima se organizam ne može u potpunosti oporaviti. Naprotiv, eustres je dobar za organizam, a ima za cilj preusmjeriti potrošnju energije prema organima koji imaju veće zahtjeve za energijom u stresnom odgovoru. Ciljni organi stresnog odgovora prema kojima se usmjerava energija su srce, mišićni sustav, jetra i mozak dok se energija oduzima reproduktivnom i imunološkom sustavu te procesima regeneracije. Ono što je kratkotrajno ekonomično, dugotrajno preopterećuje neke organe glukozom kao izvorom energije. Kod dugotrajnog izlaganja stresu dolazi do trajnih promjena koje pogađaju i organe koji su suprimirani stresnim odgovorom, ali i one prema kojima se energija usmjerava (4,5).

Posljedica dugotrajne supresije reproduktivnog sustava je ometanje oslobađanja reproduktivnih hormona zbog kojih dolazi do poremećaja ovulacije u menstrualnom ciklusu koji dovodi do problema pri začeću (5). Supresija imunološkog sustava povećava učestalost infekcija, razvoja alergija, imunodeficijencije i autoimunih bolesti (6). Kako ljudi stare, manje su sposobni aktivirati imunološki odgovor na stresore. Također im je potrebno duže vrijeme regeneracije npr. prilikom zacjeljivanja rana. Istraživanja su pokazala da kronični stres unapređuje stanično starenje i da skraćuje duljinu telomera (6). S druge strane, organi preopterećeni energijom, a poglavito jetra i mišići, nastoje se oduprijeti priljevu energije jer on dugoročno oštećuje stanice pa dolazi do razvoja inzulinske rezistencije. Inzulinska rezistencija je patološko stanje u kojem je poremećena sposobnost inzulinskog

odgovora. Uzroci inzulinske rezistencije su prirođeni, stečeni ili njihova kombinacija. Prirođenim čimbenicima pripada mutacija gena za transportere glukoze, signalne proteine i inzulinski receptor. U stečene čimbenike pripadaju neaktivnost, nezdrava prehrana, starenje, stres i utjecaj lijekova (7). Inzulinska rezistencija vodi u dijabetes tip 2 koji se razvija zbog nemogućnosti mišićnih i masnih stanica da iskorištavaju inzulin. Također, uzrokuje bolesti krvožilnog sustava s posljedicom srčanog i moždanog udara.

Stres bi mogao igrati ulogu i u neurodegeneraciji. Naime, mozak je također tkivo ovisno o inzulinu zahvaljujući sposobnosti glija stanica da nakupljaju glikogen. Specifična pojava inzulinske rezistencije u tkivu mozga naziva se dijabetes 3 i manifestira se kao Alzheimerova bolest (AD). U slučajevima hiperinzulinemije, inzulin se natječe s  $\beta$ -amiloid ( $A\beta$ ) za enzim koji kida inzulin i time onemogućava uklanjanje amiloidnih plakova iz mozga. Dijabetes tip 2 i smanjena tolerancija glukoze sami po sebi su rizik za AD jer dovode do stvaranja produkata glikolizacije čije receptore sadržavaju amiloidni plakovi. U konačnici inzulinska rezistencija nakon periferije zahvati i neurone središnjeg živčanog sustava koji smanjuju broj inzulinskih receptora i manifestiraju poremećaj metabolizma glukoze – odnosno dijabetes tip 3.

Odgovor na stres je spolno specifičan što znači da mušjaci i ženke djeluju različito na stresore kako psihološki, tako i biološki (8). Kognitivni odgovor na stres slijedi vremenski ovisan uzorak u kojem se mušjaci prilagođavaju akutnom stresu, dok izlaganje kroničnom stresu rezultira štetnim učincima na fiziološke sustave i slabijoj spoznaji (9). U situacijama izloženih stresu mušjaci smanjuju unos hrane i gube na težini, zbog toga nakupljaju manje željeza i reaktivnih kisikovih radikala te su manje opterećeni viškom energije tijekom kroničnog stresa. Također je kod mušjaka opažena veća učestalost pojave infektivnih bolesti, hipertenzije i agresivnog ponašanja. Nakon kroničnog stresa dolazi i do povećanja anksioznosti kod mušjaka (9). Pojedini uzorci bolesti mogu se pripisati učincima spolnih hormona čiji se učinak smanjuje starenjem (8). Odgovor na stres je i dobno specifičan. Budući da stari štakori, kao i ljudi, pokazuju slabljenje fiziološkog sustava, moglo bi se pretpostaviti da kronični stres više utječe na stare nego na mlade štakore. Mladi štakori pokazuju bolji adaptivni odgovor na kronični stres (9). Također, postoji razlika i u bihevioralnom odgovoru, u starijih štakora kroničan stres ne mijenja prostornu memoriju, poboljšava učinak kognitivnih zadataka i smanjuje anksioznost za razliku od mladih štakora kod kojih je povećana. Mladi štakori bolje prepoznaju objekte i imaju nešto višu koncentraciju testosterona (9).

## 1.2. Oksidacijski stres, promjene u metabolizmu željeza i starenje

Važan mehanizam djelovanja stresa jest proizvodnja reaktivnih kisikovih radikala (engl. *Reactive Oxygen Species- ROS*) koji reagiraju s biološkim molekulama. ROS nastaje zbog pojačanog metabolizma glukoze u stanicama (2). U stresu, posebno su jetra i mišići preopterećeni metaboliziranjem velike količine glukoze. Posljedice su nakupljanja glukoze, koja ne može biti metabolizirana, stvaranje ROS-a kao nusprodukta pretvorbe glukoze u adenzin trifosfat (ATP). Prekomjernim stvaranjem ROS-a dolazi do pomaka ravnoteže u oksidacijsko-redukcijskim reakcijama te samim time do metaboličkih promjena kojima se pokušava održati stalna proizvodnja ATP-a u stanicama (10). Poznato je da povećavanjem koncentracije ROS-a dolazi do oštećenja stanice. Povećane koncentracije ROS-a, kao i oksidacijskog stresa, mogu se povezati s različitim bolestima. ROS može oštetiti baze DNA, proteine i lipide uzrokujući razvoj karcinoma, aterosklerozu i koronarne bolesti (11). Također, oksidacijski stres ima bitnu ulogu u procesu starenja upravo zbog toga što uzrokuje oštećenja deoksiribonukleotidne kiseline (engl. *deoxyribonucleic acid, DNA*) (12). Odgovor na oštećenje DNA se razvija kako bi se olakšao popravak i produžilo preživljenje stanice nakon oštećenja. Međutim, ponavljana aktivacija odgovora na oštećenje utječe na normalnu homeostazu tkiva što dovodi do starenja ili smrti stanice (13). Trajni odgovor na oštećenje DNA može doprinijeti i nastanku sistemske upale koja je jedan od rizičnih čimbenika u nastanku neurodegenerativnih bolesti povezanih sa starenjem. Posljedice oštećenja DNA u mozgu su promijenjena funkcija neurona i transkripcijska represija. Kod relativno mladih neurona moguća je regeneracija dok kod starih nije. Oštećenje DNA nije još uvijek dovoljno dobro povezano s neurodegenerativnim bolestima popraćenim znatnim oksidativnim stresom (13).

Kao odgovor na stres dolazi i do poremećaja metabolizma željeza, odnosno dolazi do poremećaja u njegovom odlaganju. Ioni željeza sudjeluju u brojnim oksido-reduktivnim reakcijama, uključujući oksidativnu fosforilaciju – metabolički put razgradnje glukoze koji se intenzivno koristi u ciljnim stanicama stresnog odgovora. Mozak i jetra sadržavaju najveću koncentraciju željeza u organizmu. Željezo se u stanicama skladišti uz pomoć proteina feritina. Drugi važan protein u metabolizmu željeza je transferin. Transferin je glikoprotein plazme čija je glavna funkcija transport željeza do ciljnih stanica (14). Uz transportnu transferin ima i zaštitnu ulogu – svojim vezanjem slobodnih iona željeza sprječava stvaranje ROS-a i toksično djelovanje na stanicu (15,16). Primarno se sintetizira u hepatocitima, ali sintetizira se i u mozgu u oligodendrocitima. Transferin predaje željezo iz krvi na

transferinski receptor koji osigurava unos željeza u stanice. Razlikujemo dvije vrste transferinskih receptora: transferinski receptor 1 (TfR1) koji se nalazi na velikom broju stanica i transferinski receptor 2 (TfR2) koji je najviše izražen u jetri (14).

Poremećaji metabolizma željeza događaju se u raznim kroničnim bolestima, no za ovu je studiju posebno zanimljiv metabolički sindrom. Metabolički je sindrom skup poremećaja koji uključuju hiperlipidemiju, hipertenziju, pretilost i neadekvatan odgovor na inzulin. Bolesnici koji pate od ovog poremećaja imaju povećan rizik od dijabetesa tip 2, moždanog udara, bolesti srca i krvnih žila (17). Stres se smatra jednim od uzroka metaboličkog sindroma jer remeti hormonsku ravnotežu (17). Utječe na organizam izravno aktivacijom neuroendokrinog odgovora na stres, povišenje krvnog tlaka ili posredno kroz loše navike (18). Konačno, u metaboličkom sindromu dolazi i do preopterećenja željezom, zasićenost transferinom je u granicama normale ili blago povišena dok je obilježje razgradnje željeza povišena koncentracija serumskog feritina koja dovodi do hiperferitinemije (19). Preopterećenje željezom u hepatocitima jetre dovodi do razvoja jedne od posljedica metaboličkog sindroma - razvoja inzulinske rezistencije koja dovodi do dijabetesa tip 2. Dokazan je i povezanost između metaboličkog sindroma i mentalnih poremećaja, bolesnici koji pate od mentalnih poremećaja češće obolijevaju od metaboličkog sindroma (17).

Starenje se definira kao progresivni gubitak stanične regulacije zbog čega nastaju promjene u samoj organizaciji organizma (20). Jedna je od posljedica starenja smanjenje mogućnosti regeneracije koja je u prisutnosti stresnih faktora inaktivirana. Stres u kombinaciji sa smanjenom mogućnosti regeneracije dovodi do starenja jetre, mišića i mozga, ciljanih organa u stresu. Željezo, iako je nužno za preživljavanje stanice, izaziva oštećenje stanice. Željezo u slobodnom fero-obliku jest toksično jer potpomaže stvaranje ROS-a koji oštećuje makromolekule (21). Smanjenje funkcije organizma postupno se razvija godinama. Karakteristično je smanjenje vitalnog kapaciteta pluća, slabiji rad srca, smanjenje mentalnih funkcija i razvoj demencije. Željezo se unutar mozga najviše nakuplja u bazalnim ganglijima, a tijekom starenja povećava mu se ukupna koncentracija u području supstancije nigre (SN) (22). Također, oksidacijsko oštećenje staničnih proteina, gubitak homeostaze kalcija i agregacija proteina dovode do formiranja amiloidnog depozita koji se akumulira tijekom starenja (23). Sve te patofiziološke promjene podloga su za razvoj neurodegenerativnih bolesti. To potvrđuju razna provedena istraživanja koja su pokazala da se demencija ljudi udvostručuje nakon 60. godine života.

### 1.3. Podloga osjetljivosti supstancija nigre na stres

Supstancija nigra (SN) je jezgra u srednjem mozgu i dio je bazalnih ganglija. Sastoji se od dva funkcionalno različita dijela: *SN pars compacta* (SNC) i *SN pars reticulata* (SNR). Neuronu SNC gusto su zbijeni za razliku od neurona SNR. Većina neurona SNC ima za neurotransmiter dopamin, dok se neuroni SNR služe neurotransmiterom GABA.

Dopamin je široko rasprostranjen u mozgu, nadzire pokrete i regulira hormonski odgovor. Dopaminergički neuroni izražavaju visoku razinu pigmenta neuromelanina koji se nakuplja starenjem kao dio fiziološkog procesa (24). Neuromelanin se sastoji od proteina melanina, lipida i metalnih iona. Uloga mu je vezanje željeza i zaštita od oksidacijskog stresa. Nastaje kroz reakcijski niz koji započinje oksidacijom dopamina u citosolu do dopamin-kinona. Zatim reakcija ide u smjeru nastajanja eumelanina ili feomelanina koji se na kraju pretvaraju u neuromelanin. Ovim se metaboličkim putevima uklanja i višak dopamina čija akumulacija potiče smrt neurona pa neuromelanin služi za spašavanje stanice. Neuromelanin je netopljiv pigment koji neuronskom smrti doprinosi u izvanstanični prostor SN u kojem se zadržava i postaje izvor kroničnih upala. Upale mogu biti fagocitirane i uništene od strane mikroglia, ali često izazivaju dodatni citotoksični odgovor jer na mjestu upale dolazi do lučenja citokina i posljedične destrukcije neurona (24). Kako je željezo potrebno u enzimskim reakcijama uklanjanja dopamina i nastajanja neuromelanina – ravnoteža između željeza, dopamina i neuromelanina je ključna za održavanje homeostaze stanice (24). Osim svoje specifične uloge u metaboličkom putu nastanka neuromelanina, željezo u mozgu služi za sintezu mijelina, neurotransmitera i mitohondrijsku respiraciju pa neravnoteža željeza dugoročno pogađa i druge dijelove mozga. Za razliku od drugih organa, mehanizam preuzimanja, skladištenja i korištenja željeza specifičan je za svaki tip stanice unutar mozga (25). Tako primjerice, oligodendrociti imaju najveće količine feritina pa se ova vrsta stanica može prepoznati histološkim bojanjima za prikaz željeza. Pretjerano nakupljanje željeza pospješuje oksidacijska oštećenja proteina što dovodi do taloženja proteina i razvoja neurodegenerativnih bolesti (26). Skladištenju željeza su posebno skloni dopaminergički neuroni pa su oni posebno osjetljivi na stresom izazvanu neurodegeneraciju. Poremećeni omjeri koncentracija željeza i transferina u različitim dijelovima mozga moguća su podloga neurodegenerativnim bolestima kakav je Alzheimerova bolest (engl. *Alzheimer disease*, AD) (14). Mada je fenomen nakupljanja željeza u neurodegenerativnim bolestima dobro poznat, do sada nije direktno povezan s kroničnim stresom.

#### 1.4. Neurodegeneracija i promjene metabolizma željeza

Mozak doseže svoju najveću masu u dobi oko 20 godina, a zatim ju polako gubi tijekom života. Strukturne i kemijske promjene u mozgu su normalne, ali gubitak neurona nije (4). AD i druge demencije karakterizira progresivni gubitak pamćenja koji dovodi do demencije i smrti (28). Najčešća je smrt neurona u hipokampusu i moždanoj kori. Simptomi bolesti su vremenska i prostorna dezorijentiranost, slaba koncentracija i otežana komunikacija (4). Dvije karakteristične patologije potrebne za dijagnozu AD su izvanstanične naslage  $\beta$  amiloidnih plakova i neurofibrilni snopovi koji se sastoje od tau proteina (29).

Cijepanjem transmembranskog amiloid prekursorskog proteina (engl. *amyloid precursor protein*, APP)  $\beta$ - ili  $\alpha$ - te  $\gamma$  sekretazom nastaju peptidi različite duljine. Jedan od njih je  $A\beta$  peptid koji je većinom dug 40 aminokiselina. Fiziološki  $A\beta$  je posrednik urođene imunosti i ima ulogu u neuroplastičnosti, olakšava ili inhibira sinaptičku aktivnost (30).  $A\beta$  ima afinitet za vezanje metalnih iona pa se smatra odgovornim za nakupljanje željeza u mozgu. S obzirom da  $A\beta$  nastaje fiziološki, njegova se toksična uloga može povezati s nakupljanjem željeza. Izvanstanične nakupine  $A\beta$  nalaze se u mozgu gdje formiraju oligomere,  $\beta$ -ploče i agregiraju u manje nakupine – senilne plakove (31). Nakupljanje senilnih plakova dovodi do izvanstaničnog taloženja te do stvaranja unutarstaničnih neurofibrilarnih snopova (32). Ova pojava rezultira poremećajima proizvodnje energije i disfunkcije neurona. Do poremećaja u mozgu dolazi i prilikom problema u metabolizmu APP-a tj. prilikom agregacije, odlaganja i nemogućnosti uklanjanja  $A\beta$ -a. APP povećava otpornost na neuronske oksidativne i metaboličke napore (33). Izbacuje željezo u izvanstanični prostor, stoga mu se koncentracija povećava s povećanim razinama unutarstaničnog željeza (14). U senilnim plakovima dolazi do nakupljanja željeza, transferina i feritina što nas dovodi do zaključka da nakupljanje doprinosi razvoju AD (34). Imunološki odgovor u neurodegenerativnim bolestima uključuje aktivaciju glija stanica, posebno mikroglia i astroglia. U fiziološkim uvjetima stanice mikroglia imaju funkciju fagocita. U AD, aktivirana stanica mikroglia luči veliki broj molekula (proupalne citokine, prostaglandine i ROS) koji pridonose kroničnom stresu i izazivaju smrt neurona (33).

AD je povezana s povećanjem količine željeza koje je posljedica poremećene homeostaze željeza. Jedan od glavnih razloga degeneracije aksona i neuronske smrti je preopterećenje željezom. Nakupljanje željeza izaziva stres neurona, odgovor može biti preživljenje ili smrt stanice (26). Željezo se akumulira u mitohondrijima, stoga smanjena

funkcija mitohondrija i poremećen transport elektrona nas dovode u vezu sa stvaranjem ROS-a i nastankom oštećenja stanica (35). Također, traume mozga i lezije prisutne u mozgu kod bolesnika koji pati od AD povezane su sa stvaranjem ROS-a (34).

Tau protein je fosfoprotein uključen u stabilizaciju mikrotubula (36). Mikrotubuli su uključeni u održavanje oblika stanice i služe u regulaciji prijenosa aksona (37). Tau protein se eksprimira u neuronima i oligodendrocitima. Fosforilacija je primarni mehanizam koji regulira vezanje tau proteina na mikrotubule. U normalnim uvjetima protein ostaje topljiv, ali u AD, hiperfosforilacijom tau proteina uništava se njegova normalna funkcija. Hiperfosforilacija je reakcija ravnoteže između katalitičke aktivnosti kinaza i fosfataza (33). Glavna abnormalnost je hiperfosforilacija koja dovodi do stvaranja neurofibrilarnih lezija i nemogućnost vezanja tau proteina za mikrotubule. Gubitak kapaciteta vezanja za mikrotubule potiče destabilizaciju citoskeleta što na kraju uzrokuje smrt neurona (33). Patologija tau proteina tj. njegov toksičan efekt nakupljanja karakteristika je velikog broja neurodegenerativnih bolesti (36).

Kronični stres i starenje su rizični čimbenici za razvoj neurodegeneracije, oksidacijski stres povećava proizvodnju amiloida, a isto tako proizvodnja amiloida povećava oksidacijsko oštećenje stanice (38). Oksidacijski procesi transformiraju neagregirane amiloide u agregirane i time postaju izvor stvaranja ROS-a i utječu na razvoj neurodegeneracije (34). Brojni stanični obrambeni mehanizmi služe za sprječavanje nagomilavanja ROS-a i zaštite organizma. Superoksid dizmutaza, katalaza i glutationperoksidaza utječu na uklanjanje ROS-a (23). Također, antioksidansi sprečavaju stvaranje ROS-a, uništavaju već postojeće i pružaju nam zaštitu od toksičnosti amiloida (34). S obzirom da je AD složen multifaktorski poremećaj, zahtijeva jednako složene postupke u liječenju. Rano otkrivanje bolesti, kombinirana terapija i zdrav život doprinose smanjenju patologije. Strategije u liječenju su usredotočene na rano otkrivanje strukturnih promjena mozga, biomarkera ( $A\beta$ , ukupni i fosforilirani tau protein), kombiniranoj terapiji u raznim fazama kognitivnog gubitka te na izbjegavanje loših navika i načina života koji može dovesti do dijabetesa, kao jednog od rizičnih faktora nastanka AD (33).

Ova studija se bavi ulogom kroničnog stresa u pojavi disbalansa u metabolizmu željeza i posljedičnoj pojavi neurodegeneracije.

## **2. HIPOTEZA**

Kronični stres, radi povećanja učinkovitosti oksidativne fosforilacije, uzrokuje nakupljanje željeza u neuronima što dovodi do endoplazmatskog stresa i nakupljanja precipitiranih proteina izvan i unutar stanice, a osobito u dopaminergičkim neuronima. Štakori starije dobi, izloženi kroničnom stresu, imat će više nakupljenog željeza, ali i precipitiranih proteina od štakora izloženih lažnom stresu kao i od mladih štakora.



### 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

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

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

## **4. MATERIJALI I METODE**

### **4.1. Ustroj studije**

Istraživanje je provedeno kao studija parova na Sprague Dawley štakorima uzgojenim u Vivariju Medicinskog fakulteta u Osijeku. Analizirali smo mlade životinje u dobi od 3,5 mjeseca prema starim životinjama u dobi od 12 mjeseci izloženi pravom kroničnom i lažnom stresu.

### **4.2. Materijali**

Studijom su obuhvaćeni mladi i stari mužjaci Sprague Dawley štakora izloženi pravom ili lažnom stresu. Studija je dio 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.) voditelja prof. dr. sc. Marije Heffer. Arhiva tkiva je napravljena od strane doktorandice Marte Balog koja ima certifikat za rad sa životinjama. Dopuštenje za dio studije koji je prikazan ovim završnim radom izdalo je Etičkog povjerenstva za istraživanje Medicinskog fakulteta Osijek (Klasa: 602-04/18-08/07; Broj: 2158-61-07-18-108; dana 6. lipnja 2018.). U studiju je uključeno 40 mužjaka Sprague Dawley štakora (4 skupine, 10 životinja po skupini) koje su u dobi od 3,5 mjeseci ili 12 mjeseci izložene lažnom ili pravom stresu u trajanju od 3 ciklusa po 10 dana sa stankom od 2 tjedna između svakog ponavljanja. Skupine su bile: 1. mlade životinje izložene lažnom stresu, 2. mlade životinje izložene pravom stresu, 3. stare životinje izložene lažnom stresu, 4. stare životinje izložene pravom stresu. Izabrani stresori bili su: zvukovi alarma tijekom dormantnog perioda (od 14 do 16 sati), prisilno plivanje u hladnoj vodi (3 min), boravak u hladnoj prostoriji, izlaganje svjetlu tijekom dormantnog razdoblja (od 14 do 16 sati), imobilizacija, boravak kaveza sa štakorima na laboratorijskoj tresalici 40 minuta, test tolerancije na glukozu, test tolerancije na inzulin te gladovanje prije testova tolerancije na inzulin (3 sata prije testa) i glukozu (14 do 16 sati prije testa). Izlaganje stresorima se po potrebi ponavljalo 2 puta u razdoblju od 10 dana. Na kontrolnoj je skupini proveden lažni stres koji podrazumijeva boravak u istom okolišu, no bez izlaganja stresorima. Ovim se postupcima izbjegava stresni utjecaj samog okoliša te utjecaj same manipulacije kojima su životinje izložene. Mlade su životinje žrtvovane sa 6, a stare sa 14,5 mjeseci. Životinje su žrtvovane 15 dana nakon posljednjeg ciklusa stresa, a uzorci su prikupljeni svježi i pohranjeni

na – 80 °C ili su fiksirani te pripremljeni za histološku analizu te je tako napravljena arhiva uzoraka na koju se nastavlja ova studija.

### **4.3. Metode**

40 uzorka tkiva mozga narezani su na kriostatu (Leica CM3050 S Wetzlar, Njemačka) u koronarnom smjeru na debljinu od 35 µm. Rezovi su navučeni na stakla za histološka bojenja ili su pohranjeni u de Olmos na - 18 °C u slučaju imohistokemijskih bojanja. Osušene rezove, navučene na stakla, bojani su metodom Perls-DAB modificiranom za dokazivanje željeza u mozgu. Susjedni rezovi su obojani histološkim bojanjem Kongo crvenom kojim se prikazuju plakovi amiloida. Imunohistokemijskom metodom, uz pomoć protutijela na transferin i tau protein te odgovarajućim sekundarnim protutijelima vizualiziranim diaminobenzidinom, prikazan je položaj transferinskog receptora i precipitati unutarstaničnih proteina. Histološki i imunohistokemijski preparati fotografirani su pod mikroskopom (Zeiss Axio MOT 2) s kamerom Olympus DP70 i zatim kvantificirati programom ImageJ FIJI.

#### **4.3.1. Histološka bojanja**

Za dokazivanje prisustnosti željeza u rezovima mozga koristimo modificiranu metodu Perls-DAB, a reakciju pojačavamo inkubiranjem u otopini diaminobenzida (DAB, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) priređenoj prema uputama proizvođača. Osušene rezove rehidriramo u destiliranoj vodi tijekom 10 minuta. Rehidrirane rezove inkubiramo 60 minuta uz lagano tresenje u Perlsovoj otopini koja sadrži 4 % kalijevog fericijanida, 10 % polivinilpirolidina te 0,2 M HCl. Isperemo rezove destiliranom vodom 3 x po dvije minute. Zatim rezove inkubiramo u metanolu s vodikovim peroksidom volumnog udjela 1 %, 75 minuta uz lagano tresenje. Nakon toga ih isperemo s vodom 3 x po dvije minute te razvijamo boju u otopini diaminobenzida 20 minuta. Otopinu DAB-a isperemo destiliranom vodom 3 x po dvije minute.

Za dokazivanje amiloida koristimo histološku boju Congo red prema protokolu iz Linda L. Vacca; Laboratory manual of Histochemistry. Lippincott Williams and Wilkins. 1985. Rezove su 3 puta isprani u PBS-u (*engl. Phosphate Buffered Saline*), a potom jednom u destiliranoj vodi 30 sekundi. Nakon toga rezove stavljamo u otopinu boje Congo red koja se priprema s 0,1 g boje u 100 ml 50 %-tnog etanola. Nakon bojanja, rezove 2 puta ispiremo u običnoj vodi i stavljamo u diferencijator koji je sadržavao 0,05 mol/L natrijevog hidroksida u 80 %-tnom etanolu. U diferencijatoru ispiremo kratko dok ne uočimo odbojavanje. Nakon

diferencijatora još tri puta ispiramo u destiliranoj vodi i potom navlačimo rezove na želatinizirana stakla. Rezovi su ostavljeni da se osuše na sobnoj temperaturi, a zatim ih prekrivamo pokrivalom i pokrovnim stakalcem.

#### **4.3.2. Imunohistokemijska bojanja**

Za imunohistokemijske analize koriste se rezovi tkiva mozga debljine 35  $\mu\text{m}$ . Uz pomoć protutijela na transferin i tau protein te odgovarajućim sekundarnim protutijelima vizualiziranim diaminobenzidom prikazujemo položaj transferinskog receptora i nakupljanje unutarstaničnih proteina.

Za prikazivanje transferinskog receptora koristila sam mišja protutijela (anti-Transferrin Receptor s 0.1% sodiumazid; Invitrogen, Waltham Massachusetts, USA) i sekundarna kozja protumišja (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. West Grove, PA, SAD). Rezovi za dokazivanje tau proteina inkubirani su 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). Preparati pohranjeni u de Olmos, ispirani su 3 x u 1 x PBS-u, a potom stavljeni u predtretman 1 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  dva puta po 20 minuta sa svrhom inaktiviranja endogenih peroksidaza. Uzorci su prebačeni u blokirajuću otopinu koja sadrži 1 % BSA (engl. *Bovine serum albumin*), s dodatkom 5 % kozjeg seruma. Nakon blokiranja nespecifičnih vezanja protutijela, rezovi se stavljeni u otopinu primarnog protutijela na transferin i na tau protein u omjeru 1:500 kojeg priređujemo razrjeđivanjem u bloking otopini. Inkubiramo preko noći na + 4 °C uz nježno tresenje. Rezovi su isprani u PBS-u tri puta po 10 minuta te su potom premješteni u otopinu sekundarnog protutijela razrijeđenog u otopini za blokiranje u omjeru 1:500. Uzorke inkubiramo na + 4 °C uz nježno tresenje tijekom 4 sata. Nakon toga rezovi su isprani 3 x po 10 minuta u PBS-u te stavljeni u otopinu tercijarnog kompleksa. Tercijarni kompleks sadržava avidin u omjeru 1:250 i biotin-HRP u omjeru 1:250. Tercijarni je kompleks inkubiran 2 sata na + 4 °C uz nježno tresenje, a potom ispranu PBS u 3x po 10 minuta i jednom u TBS-u (*Tris-HCl Buffered Saline*) 10 minuta. Vizualizacija je napravljena u DAB otopini u trajanju od 3 minute. Vremena razvijanja bila su jednaka za sve grupe rezova. Nakon toga obojane preparate navukla sam na predmetna stakalca i ostavila da se osuše na sobnoj temperature. Osušeni preparati pokriveni su pokrivalom Vectamount za imunohistokemijske preparate (Vector Laboratories, Burlingame, CA USA) i pokrovnim stakalcem.

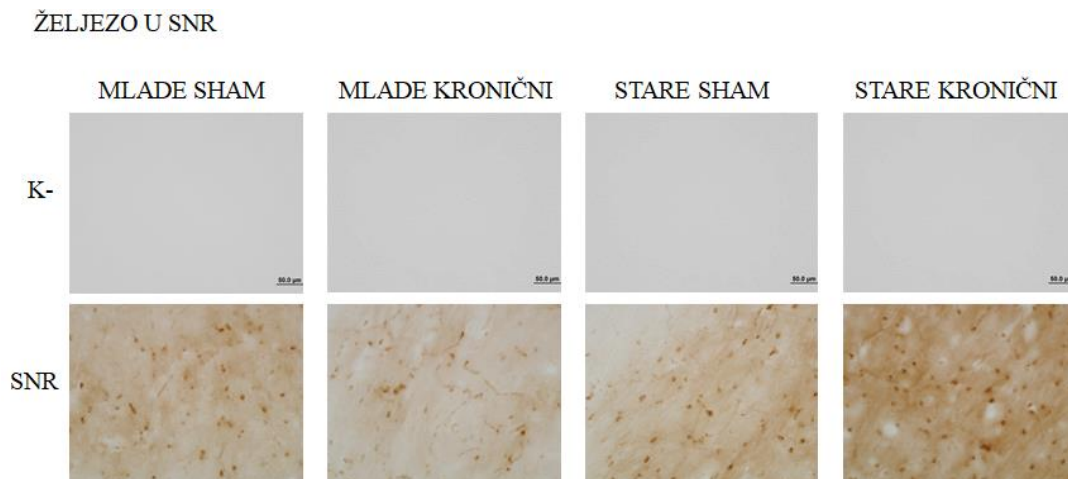
### 4.3.3. Statističke metode

Kategorijski su podatci predstavljeni apsolutnim i relativnim frekvencijama. Numerički su podatci 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 testirane su Studentovim t testom, a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Mann-Whitneyevim U testom. Sve P vrijednosti su dvostrane. Razina značajnosti je postavljena na  $p = 0,05$ . Za statističku je analizu korišten statistički program Statistica 12 (Quest Software Inc., Aliso Viejo, CA, SAD).

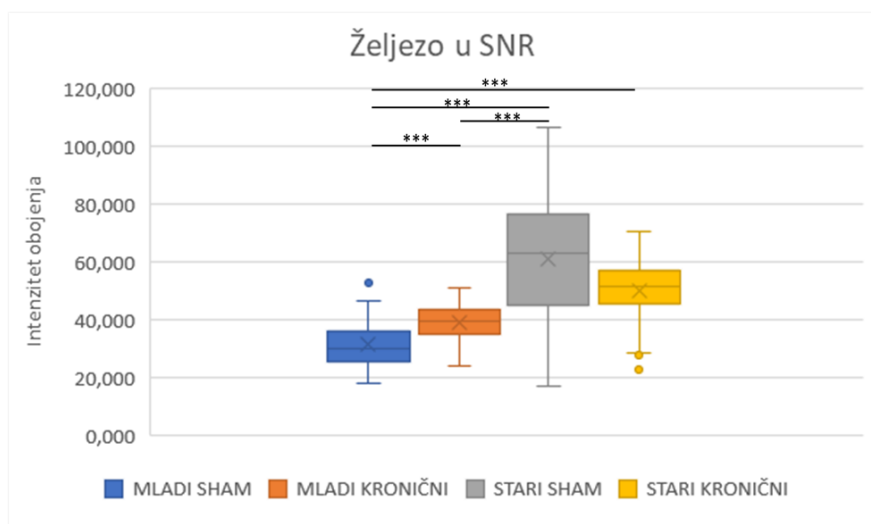
## 5. REZULTATI

### 5.1. Nakupljanje željeza u stanicama SNR kod mužjaka izloženih kroničnom stresu

Nakupljanje željeza u stanicama SNR ne slijedi normalnu distribuciju. Najviše željeza u stanicama SNR imaju stare kontrolne životinje izložene samo sham stresu, a najniže vrijednosti imaju mlade kontrolne životinje izložene sham stresu, (Slika 2). Općenito, obje starije skupine životinja imaju statistički značajno više željeza u odnosu na mlade kontrolne životinje ( $p < 0.001$ ). Kronični stres značajno podiže količinu željeza u stanicama SNR mladih životinja u odnosu na kontrole iste dobi ( $p < 0.001$ ). Kod starih životinja stres ne izaziva značajne promjene u količini nakupljenog željeza.



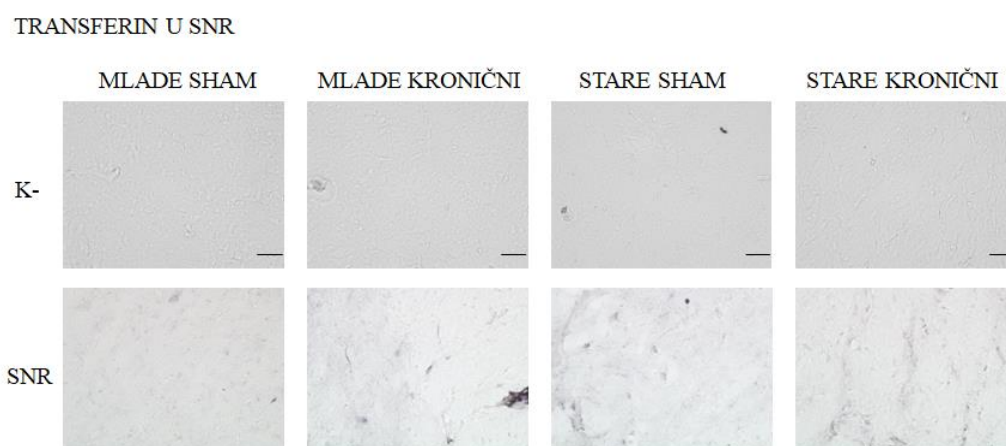
Slika 1. Prikaz rezultata histološkog bojanja Perls-DAB za dokazivanje prisutnosti željeza u SNR mladih i starih mužjaka izloženih kroničnom stresu. Povećanje 400 x, veličina skale 50 µm. Zeiss Axioskop 2 MOT, Jena, Germany s kamerom Olympus DP-70.



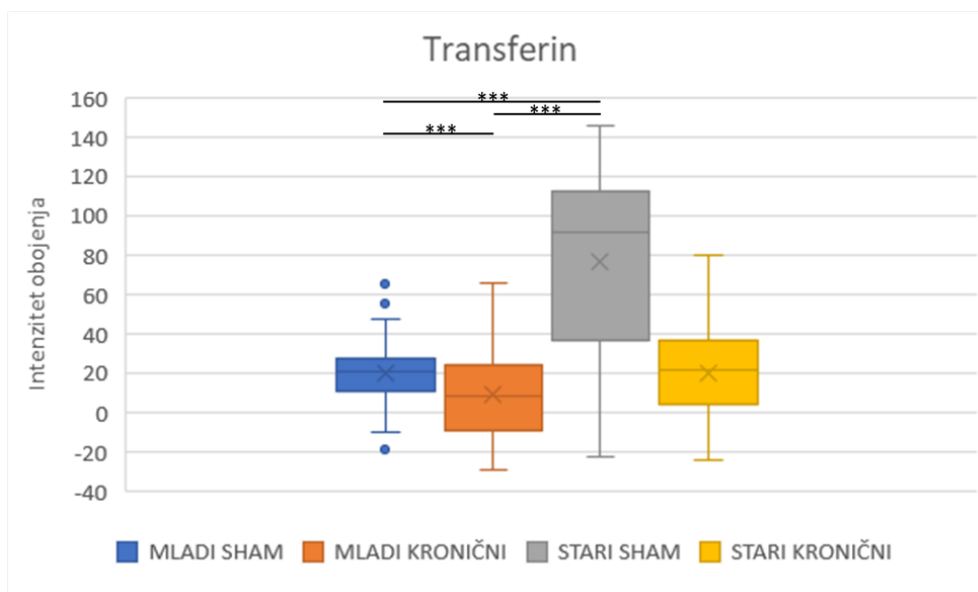
Slika 2. Razlika u nakupljanju željeza u SNR između 4 skupine životinja. Mann-Whitney U Test za nezavisne uzorke, \*statistička značajnost  $p < 0.05$ , \*\*statistička značajnost  $p < 0.005$ , \*\*\* statistička značajnost  $p < 0.001$

## 5.2. Imunohistokemijski prikaz transferinskog receptora u SNR

Ekspresija transferinskog receptora ne slijedi normalnu distribuciju. Najveću ekspresiju transferinskog receptora u SNR pokazuju stare kontrolne životinje, a najmanju mlade životinje izložene kroničnom stresu. Kronični stres spušta ekspresiju transferina i kod starih i kod mladih životinja ( $p < 0.001$ ). Kod starih životinja izloženih kroničnom stresu ekspresija transferinskog receptora nije značajna zbog velike standardne devijacije koja je tipična za starenje, (Slika 4).



Slika 3. Prikaz rezultata imunohistokemijskog bojanja na transferinski receptor u SNR mladih i starih mužjaka izloženih kroničnom stresu. Povećanje 400 x, veličina skale 50  $\mu\text{m}$ . Zeiss Axioskop 2 MOT, Jena, Germany s kamerom Olympus DP-70.

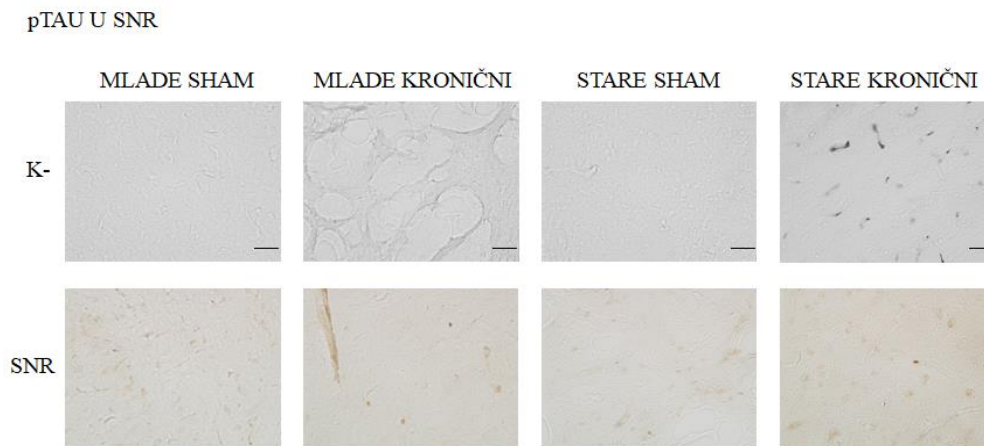


Slika 4. Razlika u ekspresiji transferina unutar SNR između 4 skupine životinja. Mann-Whitney U Test za nezavisne uzorke, \*statistička značajnost  $p < 0.05$ , \*\*statistička značajnost  $p < 0.005$ , \*\*\*statistička značajnost  $p < 0.001$ .

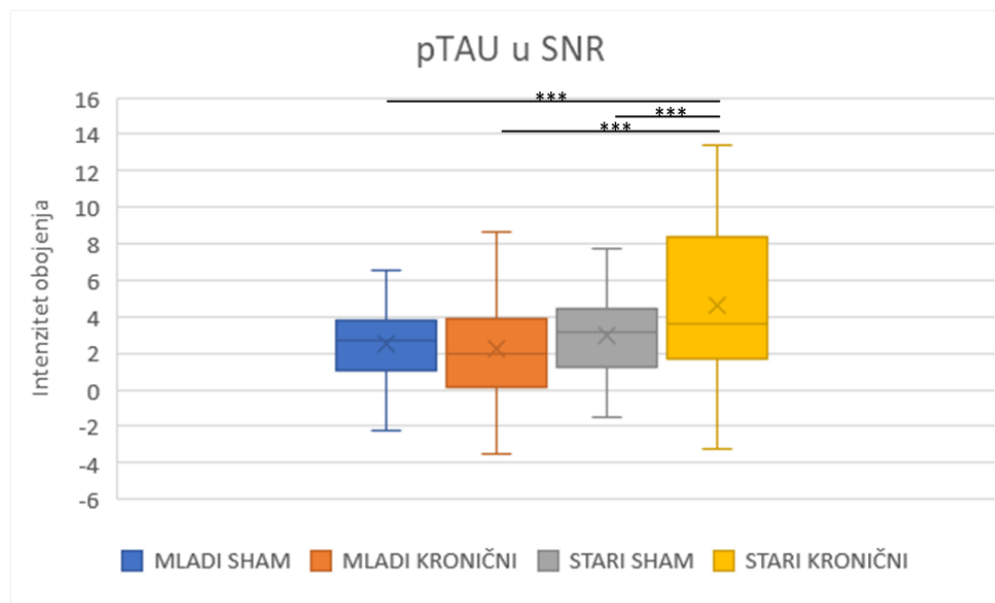
### 5.3. Nakupljanje pTAU u stanicama SNR životinja izloženih kroničnom stresu

Nakupljanje pTAU u stanicama SNR ne slijedi normalnu distribuciju. Najviše pTAU imaju stare životinje izložene kroničnom stresu, a najmanje mlade životinje izložene kroničnom stresu. Stare životinje izložene kroničnom stresu nakupljaju više tau agregata od starih životinja izloženih sham stresu i pokazuju statistički značajnu razliku ( $p < 0.001$ ). Stare životinje izložene kroničnom stresu ujedno imaju najveću standardnu devijaciju. Mlade životinje izložene sham stresu nakupljaju više tau agregata od mladih životinja izloženih kroničnom stresu. Kod mladih, stres ne izaziva značajno mjenjanje količine pTAU, ali kod starih dovodi do značajnog povećanja.





Slika 5. Rezultati imunohistokemijskog bojanja na tau protein u SNR mladih i starih mužjaka izloženih kroničnom stresu. Povećanje 400 x, veličina skale 50  $\mu$ m. Zeiss Axioskop 2 MOT, Jena, Germany s kamerom Olympus DP-70.

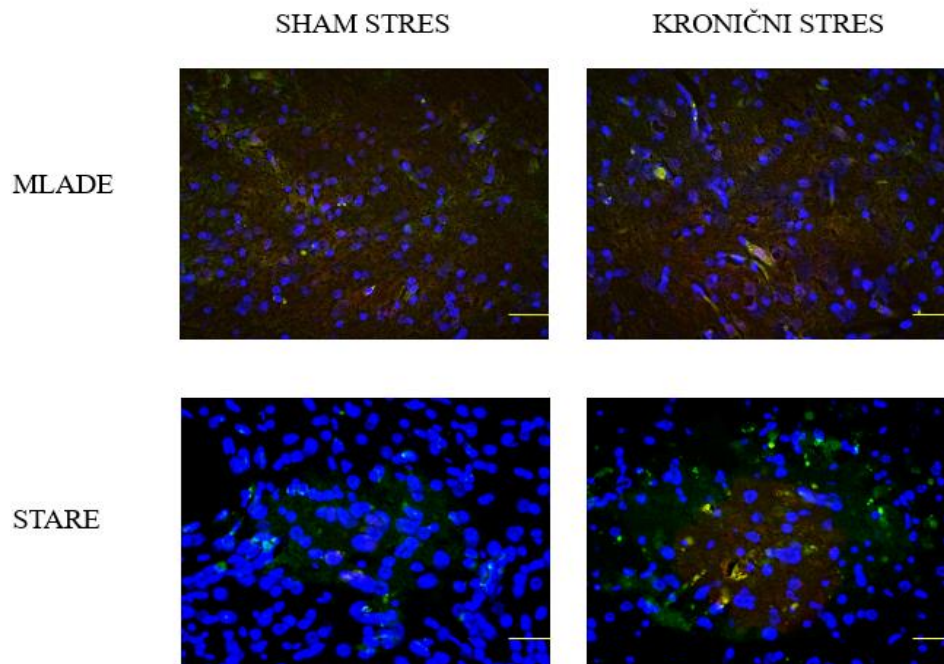


Slika 6. Razlika u nakupljanju tau proteina u SNR između 4 skupine životinja. Mann-Whitney U Test za nezavisne uzorke, \*statistička značajnost  $p < 0.05$ , \*\*statistička značajnost  $p < 0.005$ , \*\*\*statistička značajnost  $p < 0.001$ .

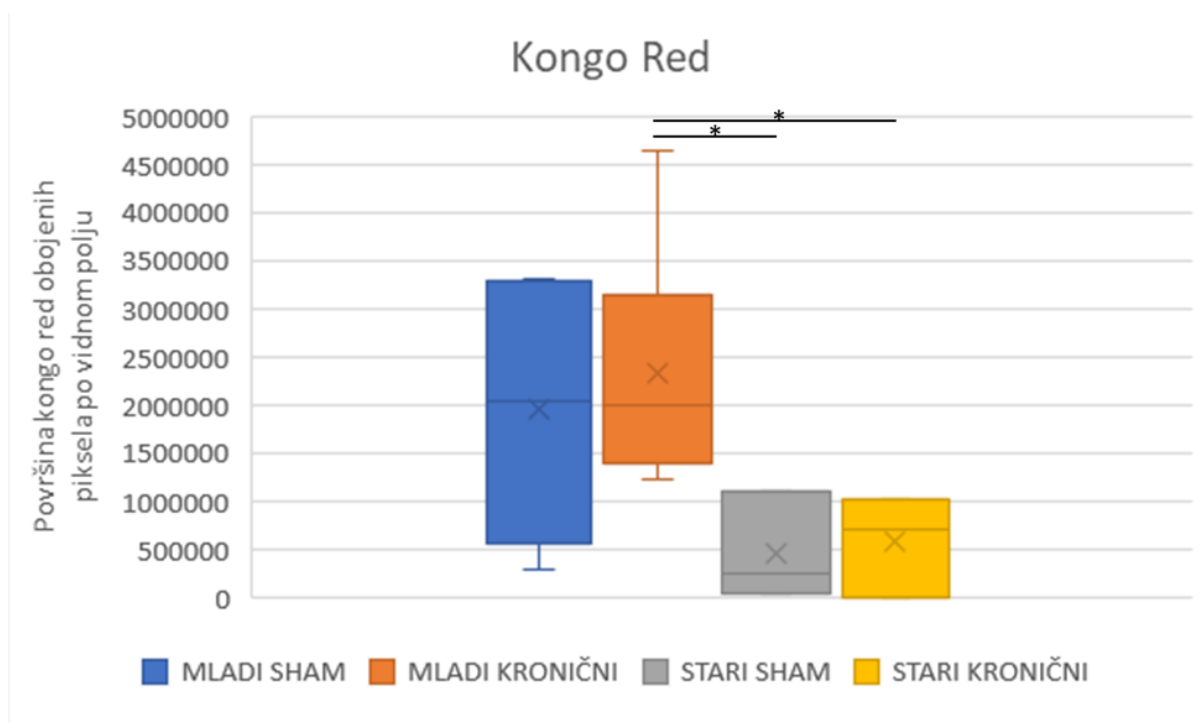
#### 5.4. Congo Red bojanje

Mlade životinje izložene sham stresu imaju značajno veće bojenje tipično za amiloid ( $p < 0.05$ ). Stare životinje izložene kroničnom stresu pokazuju statističku značajnu razliku u odnosu na mlade životinje izložene kroničnom stresu i nakupljaju značajno manje amiloida ( $p < 0.05$ ), (Slika 8).

##### CONGO RED



Slika 7. Prikaz rezultata histološkog bojanja Congo Red za prikazivanje amiloida u SNR mladih i starih mužjaka izloženih kroničnom stresu. Povećanje 400 x, veličina skale 50  $\mu\text{m}$ . Zeiss Axioskop 2 MOT, Jena, Germany s kamerom Olympus DP-70. Fotografirano kroz 4 filtera: DAPI, crvenim, zelenim i svjetlosnim. U kompozitima su korištena 3 filtera: DAPI, crveni i zeleni.



Slika 8. Razlika u Congo Red bojanju za prikazivanje senilnih plakova u SNR između 4 skupine životinja. Mann-Whitney U Test za nezavisne uzorke, \*statistička značajnost  $p < 0.05$ , \*\*statistička značajnost  $p < 0.005$ , \*\*\*statistička značajnost  $p < 0.001$ .

## 6. RASPRAVA

U ovom smo istraživanju ispitali utjecaj kroničnog stresa na promjene metabolizma željeza u mozgu mužjaka Sprague Dawley štakora. Modifikacijom histološkog bojanja Pearls-DAB na rezovima mozga procijenjena je količina željeza u SNR. Dosadašnja istraživanja su pokazala da kronični stres unaprjeđuje stanično starenje (6). Istraživanja distribucije željeza u mozgu pokazala su da stupanj iskorištenja željeza, prvenstveno u bazalnim ganglijima, raste s godinama te u određenim poremećajima. Također, proces starenja sam po sebi dovodi do povećanja količine željeza. Ovom studijom dokazali smo da kronični stres uzrokuje nakupljanje željeza u neuronima SNR kod mladih, ali ne kod starih životinja. Stari štakori pokazuju slabljenje fizioloških sustava pa bi se moglo pretpostaviti da kronični stres više utječe na njih (9). U ovoj smo studiji dokazali da stare životinje izložene kroničnom i sham stresu više nakupljaju željezo od mladih životinja izloženih kroničnom i sham stresu. Stare životinje pokazuju jako veliku standardnu devijaciju pa bi se moglo pretpostaviti da to znači kako ne stare sve životinje istom brzinom. Jedan od mogućih uzroka razlike u brzini starenja mogao bi biti položaj životinja u čoporu. Životinje koje su na vrhu same hijerarhije i koje uslijed toga imaju manji socijalni stres, imaju bolje uvjete za život pa stare sporije od onih životinja koje su na dnu socijalne hijerarhije. Tako alfa mužjaci, dominantni članovi čopora, imaju prednost pri hranjenju i razmnožavanju dok su omega mužjaci, najniži članovi hijerarhije, podređeni i doživljavaju stalne napade od alfa mužjaka, stoga oni najbrže stare. Kako su naše životinje koje pripadaju istoj skupine držane u grupama od po 4 životinje za pretpostaviti je da je došlo do stvaranja socijalne hijerarhije te da su neke životinje u njoj bile bolje pozicionirane.

Imunohistokemijskim bojanjem analizirana je ekspresija transferinskog receptora u jezgri SNR. Dokazali smo da stare životinje izložene kroničnom stresu eksprimiraju više transferina, koji služi za prijenos željeza, nego mlade životinje izložene kroničnom stresu. Stoga stare životinje izložene kroničnom stresu imaju veći kapacitet za nakupljanje željeza jer im je ono potrebno za oksidativne procese. Jedan od procesa u kojem su potrebni ioni željeza je oksidativna fosforilacija – završni metabolički put razgradnje glukoze koja se koristi u svim stanicama, ali je posebno bitan za one koje imaju veliku metaboličku aktivnost kao što su mozak i mišići, te osobito kod odgovora na stresne situacije (14). Ovi rezultati idu i u prilog tome da je kod mladih životinja veća mogućnost regeneracije. Također ih možemo povezati i s nastankom metaboličkog sindroma u kojem dolazi do nakupljanja željeza, blagog povišenja u ekspresiji transferina i povećanja koncentracije feritina (19). Park i sur. su zaključili kako je

smanjena zasićenost transferina povezana s povećanim rizikom nastanka poremećaja u metabolizmu glukoze i razvoja inzulinske rezistencije (40). Porast transferinskog receptora na membrani ima za posljedicu unosa slobodnog željeza koje stanici daju veći kapacitet oksidacije, ali i dovodi do porasta oksidacijskog stresa. Oksidacijski stres ima za posljedicu razvoj jednog od uzroka nastanka metabličkog sindroma, a to je razvitak inzulinske rezistencije (17,19,40). Stare životinje izložene sham stresu imaju veliku standardnu devijaciju koju, kao i kod željeza, objašnjava položaj životinja u čoporu. Stare životinje izložene sham stresu imaju najviše vrijednosti transferina i najviše nakupljenog željeza što nas dovodi do zaključka da ekspresija transferina odražava količinu nakupljenog željeza. Kod mladih životinja izloženih kroničnom stresu ekspresija transferina pada u odnosu na mlade životinje izložene sham stresu dok zalihe željeza rastu u odnosu na mlade sham životinje. Razlog tomu su neki dodatni mehanizmi (brže prilagođavanje stresnim situacijama) kod mladih životinja izloženih kroničnom stresu koji čuvaju zalihe željeza usprkos snižavanju transferina.

Imunohistokemijskim bojanjem na pTAU procijenjeno je nakupljanje neurofibrilarnih snopova. Opsežne studije Braak-a i Braak-a govore da je čak i mali broj neurofibrilarnih lezija, koje nastaju hiperfosforilacijom, patološki i da predstavljaju rane stadije u AD (26,28). Najviše pTAU se nalazi u stanicama starih životinja izloženih kroničnom stresu pa prema tome stare životinje imaju veći rizik od nakupljanja ovog tipa patoloških promjena. Toksičan efekt nakupljanja pTAU u kombinaciji s procesom starenja čini rizični čimbenik u nastanku velikog broja neurodegenerativnih bolesti (36). Količina pTAU nije proporcionalna s količinom željeza u stanicama jer životinje koje imaju najviše vrijednosti željeza u stanicama SNR nemaju najviše vrijednosti pTAU. Zbog toga se smatra da je stres čimbenik koji dovodi do povećanja količine pTAU epitopa.

Količina amiloida procijenjena je uporabom histološke boje Congo Red na rezovima mozga 4 skupine životinja. Istraživanja pokazuju da oksidacijski stres povećava proizvodnju amiloida, a isto tako poznato je i da proizvodnja amiloida povećava oksidacijsko oštećenje stanice (38). Također, oksidacijski procesi transformiraju neagregirane amiloide u agregirane, time postaju izvor stvaranja ROS-a i utječu na razvoj neurodegenerativnih bolesti (34). Iako smo ovom studijom dokazali da mlade životinje nakupljaju više amiloida od starih, stanice SNR nisu sklone nakupljanju amiloida. Jezgra je autofluorescentna zbog svoje dopaminergičke prirode pa je autofluorescencija najveća u skupinama mladih životinja. Pretpostavlja se da mlade životinje imaju najveći metabolizam monoamina tj. da se radi o autofluorescenciji

monoamina, a ne o plakovima. Aktivnost monoamin oksidaze B se povećava u mozgu pacijenata s AD. Također, prekomjerna ekspresija monoamin oksidaze B utječe na pojačano stvaranje A $\beta$  što povezujemo s nastankom neurodegeneracije (39). U mozgu pacijenata s AD nalazimo izvanstanične plakove odnosno nakupine A $\beta$ . Ramos-Rodriguez i sur. su proučavali vaskularne promjene uzrokovane nekim od rizičnih čimbenika u nastanku metaboličkog sindroma te došli do zaključka kako dolazi do nakupljanja  $\beta$ -amiloida koji pogoršava patologiju AD (41). Kako bi poboljšali istraživanje i dokazali količinu amiloida u jezgri SNR potrebno je napraviti imunohistokemijsko bojanje. U našem slučaju, istraživanje bi trebalo proširiti i na područje hipokampusa. Područje hipokampusa i njegova funkcija u procesima memorije višestruko je istražena. Jedno je od prvih mjesta zahvaćeno neurodegenerativnom bolesti, AD, pa bi bilo zanimljivo utvrditi koje su posljedice stresa na neurone na područje hipokampusa.

Uzimajući u obzir rezultate radova, kao i rezultate ovoga istraživanja, može se zaključiti da starenje i stres uzrokuju promjene u metabolizmu željeza u mozgu mužjaka Sprague Dawley štakora. Prvenstveno dolazi do nakupljanja željeza u neuronima SNR kod starijih skupina životinja koje dovodi do oštećenja i smrti stanica i povezuje se s nastankom AD. Također se i nakupljanje pTAU smatra jednim od uzročnika AD. U našem istraživanju količina pTAU nije proporcionalna s količinom željeza u stanicama SNR što nas dovodi do zaključka da je stres jedan od mehanizama koji podiže razinu pTAU epitopa. Autoflorescencija jezgre je najveća u skupini mladih životinja zbog povećanog metabolizma monoamina, a ne zbog amiloidnih plakova jer stanice SNR nisu sklone nakupljanju amiloida.

## **7. ZAKLJUČAK**

Provedeno istraživanje i dobiveni rezultati dovode do sljedećih zaključaka:

1. Starenje uzrokuje nakupljanje željeza i pTAU u neuronima SNR Sprague Dawley štakora.
2. Kronični stres uzrokuje nakupljanje željeza u neuronima SNR kod mlade skupine životinja.
3. Ekspresija transferina odražava količinu nakupljenog željeza.

## 8. SAŽETAK

**Uvod:** Povećanje količine željeza u neuronima povezano je s oksidativnim oštećenjem, nakupljanjem amiloida i neurodegeneracijom. Poremećaj metabolizma željeza pojavljuje se u Alzheimerovoj bolesti koja je dovedena u vezu s kroničnim stresom.

**Ciljevi:** Napraviti imunokemijska i histološka bojanja na željezo i amiloid iz tkiva mozga mladih i starih mužjaka Sprague Dawleyte i utvrditi moguću povezanost kroničnog stresa, poremećaja metabolizma željeza i neurodegeneracije.

**Materijali i metode:** Studijom su obuhvaćeni mladi i stari mužjaci Sprague Dawley štakora izloženi pravom ili lažnom stresu. U studiju je uključeno 40 mužjaka Sprague Dawley štakora (4 skupine, 10 životinja po skupini) koje su u dobi od 3,5 mjeseci ili 14,5 mjeseci izložene lažnom ili pravom stresu. Izabrani stresori bili su: zvukovi alarma tijekom noći, prisilno plivanje štakora u hladnoj vodi, boravak štakora u hladnoj prostoriji i izlaganje svjetlu tijekom noći. Životinje su žrtvovane 15 dana nakon posljednjeg ciklusa stresa, a uzorci su prikupljeni i pohranjeni na - 80 °C ili u obliku fiksiranog tkiva pripremljenog za histološku analizu te je tako napravljena arhiva uzoraka.

**Rezultati:** Najviše željeza i transferina u stanicama supstancije nigre (SN) imaju stare životinje izložene sham stresu, a najniže vrijednosti imaju mladesham životinje. Najviše pTAU imaju stare životinje izložene kroničnom stresu, a najmanje mlade. Mlade životinje nakupljaju više amiloida od starijih.

**Zaključak:** Starenje uzrokuje nakupljanje željeza i pTAU u neuronima SN. Kronični stres uzrokuje nakupljanje željeza u neuronima SN kod mlade skupine životinja. Ekspresija transferina odražava količinu nakupljenog željeza.

**Ključne riječi:** kronični stres; transferin; željezo.



## 9. SUMMARY

**Introduction:** The increase of the amount of iron in neurons is connected to oxidative damage, amyloid accumulation, and neurodegeneration. Iron metabolism disorder occurs in Alzheimer's disease which is associated with chronic stress.

**Objectives:** To construct immunochemical and histological coloring on iron and amyloid from brain tissue of young and old Sprague Dawley males in order to determine the possible association of chronic stress, iron metabolism disorders, and neurodegeneration.

**Materials and Methods:** The study included young and old Sprague Dawley male rats exposed to real or fake stress. The study included 40 Sprague Dawley male rats (4 groups, 10 animals per group) that were exposed to fake or real stress at 3.5 months or 14.5 months. The selected stressors were: nighttime alarm sounds, forced swimming in cold water, staying in a cold room, and exposure to light during the night. Animals were sacrificed 15 days after the last stress cycle. The sample archive was made of collected samples that were stored at  $-80^{\circ}$  C or in the form of fixed tissue prepared for histological analysis.

**Results:** Most iron and transferrin was found in the substantia nigra (SN) cells of old animals exposed to sham stress, while the lowest values occurred in young sham animals. The most pTAUs were found in old animals exposed to chronic stress, and the least in young. Young animals accumulate more amyloid than the older ones.

**Conclusion:** Aging causes iron accumulation in neurons of SN. Chronic stress causes the accumulation of iron in neurons of SN in the young animal group. The expression of transferrin reflects the amount of accumulated iron.

**Key words:** chronic stress; transferrin; iron.

## 10. LITERATURA

1. Hudek-Knežević J, Kardum I. Stres i tjelesno zdravlje. 1. izd. Jastrebarsko: Naklada Slap; 2006.
2. Jafari M, Salehi M, Zardooz H, Rostamkhani F. Response of liver antioxidant defense system to acute and chronic physical and psychological stresses in male rats. EXCLI Journal. 2014; 13:161-167.
3. Chrousos GP. Stress and disorders of the stress system. Nature Reviews Endocrinology. 2009; 5:374-381.
4. Carey J, Arniello L, McComb M. The society for neuroscience. 4. izd. Whashington, USA: Meadows Design Office Incorporated; 2002.
5. What is the mechanism of stress and how does it affect reproduction. Dostupno na : <https://biozhena.wordpress.com/2012/05/28/what-is-the-mechanism-of-stress-and-how-does-it-affect-reproduction-an-update/>. Datum pristupa: 21.8.2018.
6. Morey NJ, Boggero IA, Scott AB, Segerstrom SC. Current directions in stress and human immune function. Journal List HHS Author Manuscripts. 2016; 5:13-17.
7. Smirčić-Duvnjak L. Patofiziologija metaboličkog sindroma. Medicus. 2004; 2:15-25.
8. Verma R, Balhara YPS, Gupta CS. Gender differences in stress response: Role of development and biological determinants. Ind Psychiatry J. 2011; 20(1):4-10.
9. Luine VN, Beck KD, Bowman RE, Frankfurt M, MacLusky NJ. Chronic stress and neural function: accounting for sex and age. Journal of Neuroendocrinology. 2007; 19:743-751.
10. Albu JB, Heilbronn LK, Kelley DE, Smith SR, Azuma K, Yoshida S, i sur. Metabolic Changes Following a 1-Year Diet and Exercise Intervention in Patients With Type 2 Diabetes. Diabetes. 2010; 59:627-633.
11. Čvorišec D, Čepeluk I. Štrausova Medicinska biokemija. 3.izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2009.
12. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature. 2000; 408:239-247.
13. Haigis CM, Yankner BA. Molecular Cell review - The aging stress response. Cell press. 2010; 335-338.
14. Belovari T, Kibel A, Kostović-Knežević LJ. Transferin u zdravlju i bolesti. Medicinski vijesnik. 2006; 38:21-24.
15. Vincento JB. The binding and transport of alternative metals by transferrin. Biochemica et Biophysica Acta. 2012; 1820:362-378.

16. Harris WR. Anion binding properties of the transferrins. Implications for function. *Biochemica et Biophysica Acta*. 2012; 1820:348-361.
17. Dikanović M. Sažetak sa skupa - Metabolički sindrom. *Hrana u zdravlju i bolesti: znanstveno stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku*. 2015:4
18. Janczura M, Bochenek G, Nowobilski, Dropinski J, Laskowict B, Stanisiz A, i sur. The relationship od metabolic syndrome with stress, coronary heart disease and pulmonary function. *PloS One*. 2015; 10(8):e0133750
19. Datz C, Felder TK, Niederseer D, Aigner E. Iron homeostasis in the metabolic syndrome. *Eur J Clin Invest*. 2013; 43(2):215-224.
20. *Biologija starenja*. Dostupno na adresi: <https://www.scribd.com/document/223264019/337288-Biologija-starenja>. Datum pristupa: 17.8.2018.
21. Gorchach M, Ben-Shacham D, Riederer P, Youdim MBH. Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases? *Journal of Neurochemistry*. 1994; 3:793-807
22. Squier TC. Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Experimental Gerontology*. 2001; 36:1539-1550.
23. Squier TC. Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Experimental Gerontology*. 2001; 36:1539-1550.
24. Zucca FA, Segura-Aguilar J, Ferrarri E, Munoz P, Paris I, Sarna T, i sur. Interactions of iron, dopamine and neuromelanin pathways in brain aging and parkinson disease. *Progress in Neurobiology*. 2017; 155:96-119.
25. Singh N, Halder S, Horback K, Sharma D, Wong J, Suda S, i sur. Brain iron homeostasis: From molecular mechanism to clinical significance and therapeutics opportunities. *Antioxidants and redox signaling*. 2014; 8:1325-1335.
26. Čvorišec D, Čepeluk I. Štrausova Medicinska biokemija. 3.izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2009.
27. Carey J, Arniello L, McComb M. *The society for neuroscience*. 4. izd. Whashington, USA: Meadows Design Office Incorporated; 2002.
28. Spillantini MG, Goedert M. Tau protein pathology in neurodegenerative disease. *Trends Neurosci*. 1998; 21:428-433
29. Murphy P, Levine H. Alzheimer disease and the  $\beta$ -Amyloid peptide. *Journal List- HHS autor Manuscripts*. 2010; 19():311.
30. Struble RG, Ala T, Patrylo PR, Brewer GJ, Yan XX. Is brain amyloid production a cause or a result of dementia the Alzheimer's type? *Journal of Alzheimer's Disease*. 2010; 393-399.

31. Jarrett JT, Berge EP, Lusby PT Jr. The carboxy terminus of the  $\beta$ -amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer disease. *Biochemistry*. 1993; 32:4693-4697.
32. Emmerzaal TL, Kiliaan AJ, Gustafson DR. 2003-2013: A Decade of Body Mass Index, Alzheimer's Disease, and Dementia. *J Alzheimer's Disease*. 2015; 43:739-755
33. Folch J, Petrov D, Etcheto M, Abad S, Sanchez-Lopez E, Garcia L, i sur. Current research therapeutic strategies for Alzheimer's disease treatment. *Neural Plasticity*. 2015; 1-15.
34. Christen Y. Oxidative stress and Alzheimer disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2000; 71(2):621S-629S.
35. Gozzelino R, Arosio P. Iron homeostasis in health and disease. *Int J Mol Sci*. 2016; 17(1):130.
36. Grazia Spillantini M, Goedert M. Tau protein pathology in neurodegenerative disease. *Trends Neurosci*. 1998; 21:428-433.
37. Emmerzaal TL, Kiliaan AJ, Gustafson DR. 2003-2013: A Decade of Body Mass Index, Alzheimer's Disease, and Dementia. *J Alzheimer's Disease*. 2015; 43:739-755.
38. Smith AM, Hirai K, Hsiao K, Perry G, Harris PL, Siedlak SL, i sur. Amyloid- $\beta$  deposition in Alzheimer transgenic mice is associated with oxidative stress. *Journal of Neurochemistry*. 1998; 17:2212-2215.
39. Schedin-Weiss S, Inoue M, Hromadkova L, Teranishi Y, Wiehager B, Bogdanovic N, i sur. Monoamine oxidase B is elevated in Alzheimer disease neurons, is associated with  $\gamma$ -secretase and regulation neuronal amyloid  $\beta$ -peptide levels. *Alzheimers Res Ther*. 2017;9:57.
40. Park RJ, Moon, JD. Low transferrin saturation is associated with impaired fasting glucose and insulin resistance in the South Korean adults: the 2010 Korean national health and nutrition examination survey. *Diabet Med*. 2015; 32:673-678.
41. Ramos-Rodriguez JJ, Ortiz-Barajas O, Gamero-Carasco C, de la Rosa PR, Infante-Garcia C i sur. Prediabetes induced vascular alteration shows a cerebral central pathology in APP swe/PS1dE9 mice. *Psychoneuroendocrinology*. 2014; 48:123-135.

## 11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime:

Marina Putnik

Datum i mjesto rođenja:

5. rujna 1996., Osijek

Obrazovanje:

2015. – 2018. Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu u Osijeku

2011. – 2015. Prirodoslovno-matematička gimnazija u Osijeku

2003. – 2011. Osnovna škola Dalj u Dalju