

Učinak antagonista receptora glukagonu sličnog peptida-1 na biokemijske promjene u mozgu štakora

Kolarić, Đesika

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:401820>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-11**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Đesika Kolarić

**Učinak antagonista receptora glukagonu sličnog
peptida-1 na biokemijske promjene u mozgu
štakora**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Farmakologija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Jelene Osmanović Barilar i suvoditeljstvom izv. prof. dr. sc. Lidije Bach-Rojecky.

Za dedu.

Veliko hvala dragim mentoricama doc. dr. sc. Jeleni Osmanović Barilar i izv. prof. dr. sc. Lidiji Bach-Rojecky na neizmjernom trudu i volji kojima su me vodile kroz zajednički rad.

Hvala na uloženom vremenu i prenesenom znanju, a posebno hvala na ogromnom razumijevanju, susretljivosti i ljudskosti.

Zahvaljujem se i svim ostalim djelatnicima Zavoda i laboratorija za molekularnu neurofarmakologiju na pomoći u izradi ovoga rada: Jan, Ana B, Ana K, Josip, Nevenka i Božica hvala za uskakanje, smijeh i svo znanje.

Mojim roditeljima neopisivo hvala za krila i uputama za kormilarenje. Burazu hvala za život i još puno više.

Bakama hvala za podršku i ljubav.

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	GLP-1 uloga i signalizacija na periferiji.....	1
1.2.	GLP-1 signalizacija u mozgu	3
1.3.	Exendin 9-39 (Ex-9).....	4
1.4.	Terapijski potencijal GLP-1 agonista u Alzheimerovoj bolesti	5
2.	OBRAZLOŽENJE TEME.....	7
3.	MATERIJALI I METODE.....	8
3.1.	Materijali	8
3.1.1.	Životinje	8
3.1.2.	Protutijela i reagensi	8
3.2.	Metode.....	8
3.2.1.	Intracerebroventrikularna primjena Ex-9 i žrtvovanje.....	8
3.2.2.	Pohrana bioloških uzoraka.....	9
3.2.3.	Homogenizacija tkiva	9
3.2.4.	Mjerenje koncentracije proteina	10
3.2.5.	Western blot.....	10
3.2.6.	Statistička obrada i vizualizacija rezultata.....	12
4.	REZULTATI	13
4.1.	Akutni učinak icv Eksendina 9 na ekspresiju c-fos u hipotalamusu i hipokampusu mozga štakora 13	
4.2.	Akutni učinak icv Eksendina 9 na ekspresiju inzulinskog receptora u hipotalamusu i hipokampusu mozga štakora	14
4.3.	Akutni učinak icv Eksendina 9 na ekspresiju sekundarnih glasnika GLP-1R signalizacijskog puta u hipotalamusu i hipokampusu štakora.....	15
4.3.1.	Akutni učinak icv Eksendina 9 na ekspresiju pERK i tERK u hipotalamusu i hipokampusu štakora	15
4.3.2.	Akutni učinak icv Eksendina 9 na ekspresiju p70S6k u hipotalamusu i hipokampusu mozga štakora.....	16
4.3.3.	Akutni učinak icv Eksendina 9 na ekspresiju PDK1 u hipotalamusu i hipokampusu mozga štakora	17
4.4.	Matrice korelacija promjene ekspresije proteina od interesa u hipokampusu i hipotalamusu	18
4.5.	FAMD analiza promjene ekspresije svih proteina u hipokampusu i hipotalamusu	20
4.6.	3D prikaz promjene ekspresije c-fosa, IR-a i pERK-a, ovisno o dozi.....	22
5.	RASPRAVA.....	24
6.	ZAKLJUČAK.....	29
7.	LITERATURA	30

8. SAŽETAK/SUMMARY	36
SUMMARY	37
PRILOZI	

1. UVOD

Glukagonu sličan peptid-1 (eng. *glucagon-like peptide-1*, GLP-1), peptidni je hormon koji se primarno luči u distalnom dijelu tankog crijeva, otkuda odlazi u krvotok. Postoje dokazi da intracerebroventrikularna (icv) primjena GLP-1 hormona ili njegovih analoga smanjuje apoptozu, a potiče proliferaciju i diferencijaciju neurona te povećanje sinaptičke plastičnosti, uz smanjenje kognitivnog deficita. Takvo je djelovanje potencijalno značajno za terapiju neurodegenerativnih bolesti poput Alzheimerove ili Parkinsonove bolesti (Gejl i sur., 2016.; Simsir i sur., 2018). Iako se mnogo zna o signalizacijskom putu GLP-1 receptora (eng. *GLP-1 receptor*, GLP-1R) u β stanicama gušterače, signalizacija GLP-1R u dijelovima mozga još uvijek nije u potpunosti istražena. Točan pozadinski mehanizam učinka agonista i antagonista GLP-1R nije jasan pa upravo stoga istraživanje učinka različitih doza na ekspresiju proteina u pojedinim regijama mozga ima veliki značaj u razumijevanju molekularnih karakteristika antagonista. Ta saznanja bitna su i za pravilni dizajn daljnjih pretkliničkih i kliničkih ispitivanja terapijskog potencijala agonista (Simsir i sur., 2018).

1.1. GLP-1 uloga i signalizacija na periferiji

GLP-1 se luči dvofazno, neposredno nakon ulaska hrane u duodenum (5-15 minuta nakon ingestije) te 30-60 minuta nakon ingestije. Nakon lučenja, u cirkulaciji živi kratko jer ga već nakon 2-3 minute razgrađuju dipeptidil peptidaza IV (DPP IV) i metaloendopeptidaza (Deacon, 2004). Djeluje višestruko - između ostalog smanjuje inzulinsku rezistenciju, regulira apetit i gastričko pražnjenje, povećava rast beta stanica gušterače, potiče ulazak glukoze u stanice jetre, mišića i masnog tkiva, pokazuje protektivne kardiovaskularne učinke te utječe na pamćenje i učenje (Pabreja i sur., 2014). GLP-1 također sprečava nastanak hiperglikemije djelujući s jedne strane na povećanje lučenja inzulina, a s druge strane smanjuje sintezu glukagona (Tramutola i sur., 2017).

Receptori za GLP-1 široko su rasprostranjeni u tijelu pa ne čude brojne fiziološke uloge GLP-1 hormona. Posebno su zanimljive kompleksnost i različitost signalizacijskih puteva receptora, ovisno o tkivu i okolini u kojoj se nalaze (Smith i sur., 2019). Zbog rasprostranjenosti GLP-1R po organizmu (gušterača, pluća, srce, bubrezi, želudac, crijeva, hipofiza, vagus, brojne regije mozga), očekivano je da će u različitim tkivima djelovati putem različitih signalizacijskih

puteva, ovisno o ligandu. GLP-1R razlikuju se po izvanstaničnoj regiji i trans-membranskom dijelu i upravo im to omogućuje prepoznavanje i najmanjih razlika u ligandima, prema čemu potom ispoljavaju različite učinke. Najbolje proučeni su signalizacijski putevi GLP-1 u β stanicama gušterače (Pabreja i sur., 2014; Smith i sur., 2019).

Kao što je prethodno rečeno, signalizacija svih GLP-1R još uvijek nije u potpunosti istražena, no za sada nam je poznato da su svi spregnuti s G proteinima. Nakon vezanja agonista na GLP-1R, katalitičke podjedinice G proteina ($G\alpha$ i $G\beta\gamma$) odvajaju se i posreduju daljnje, dvojako djelovanje. $G\alpha$ podjedinica dalje aktivira adenilat ciklazu (AC) koja prevodi ATP (adenozin trifosfat) u ciklički AMP (cAMP, ciklički adenozin monofosfat). cAMP će aktivirati PKA (protein kinazu A) ili Epac2 (Epac2 je gvaninski nukleotidni faktor). I PKA i Epac2 imaju ključnu ulogu u poticanju influksa kalcijevih iona u stanicu (Hölscher, 2010; Tramutola i sur., 2017). Budući da su kalcijevi ioni posebno bitni u neuronima za egzocitozu vezikula koje sadrže inzulin, upravo se ovaj mehanizam smatra dominantno odgovornim za smanjenje inzulinske rezistencije u hipokampusu (HPC) i hipotalamusu (HPT) djelovanjem GLP-1 agonista (Smith i sur., 2019). I PKA i Epac2 također dijele daljnji put aktivacije Rap1 skupine GTP-aza, koje signal prenose dalje prema Raf/MEK/ERK kinazama. Zadnji korak signalizacijskog puta je aktivacija MAPK (mitogenom aktivirana protein kinaza), koja preko transkripcijskih faktora modulira ekspresiju gena u svrhu neuroprotekcije. $G\beta\gamma$ podjedinica G proteina pak nakon aktivacije GLP-1R pokreće put aktivacije Akt/PKB (protein kinaza B) i PKC (protein kinaza C), koji posredovanjem CREB (eng. *cAMP-response element binding protein*) i MAPK također moduliraju transkripciju gena. Zajednički kumulativni učinak oba puta je poticanje preživljavanja, diferencijacije i proliferacije te inhibicija apoptoze stanica. U hipokampusu i hipotalamusu takvo djelovanje smanjuje gubitak neurona uslijed neurodegenerativnih bolesti (Hölscher, 2010; Tramutola i sur., 2017).

Postoje dokazi da GLP-1 putem GLP-1R neke svoje učinke, posebno na razini genoma, postižu transaktivacijom drugih receptora. Primjerice, transaktivacijom receptora epidermalnog faktora rasta, inhibira otvaranje kalijevih kanala, što depolarizira stanicu i aktivira fosfatidilinozitol 3-kinazu (PI3K). Tim je putem dodatno inhibirana apoptoza stanica (Smith i sur., 2019). Iako nije sasvim jasno dolazi li do transaktivacije IR-a (inzulinskog receptora) ili je neki drugi mehanizam u pozadini, pokazalo se da inhibicija IR-a na periferiji smanjuje protektivno djelovanje GLP-1 (Caporarello i sur., 2017).

U istraživanjima ovisnosti odgovora GLP-1R o ligandu i tkivu, najčešće se promatraju promjene u sintezi cAMP-a, aktivaciji ERK ½ (eng. *extracellular signal-regulated kinases*) i povećanju unutarstaničnog kalcija. Dok su navedene razlike dobro poznate na perifernim tkivima i posebno u stanicama gušterače, malo se zna o tome kako se mijenja signalizacija GLP-1R u regijama mozga ovisno o ligandu (Smith i sur., 2019).

1.2. GLP-1 signalizacija u mozgu

GLP-1 u mozak dopijeva na dva načina: ili će nakon periferne sinteze prijeći krvno-moždanu barijeru, ili će se sintetizirati u samom mozgu. Njegovi su receptori nađeni u hipotalamusu, talamusu, hipokampusu, kori, jezgri moždanog debla i solitarnom traktu. Dok ih neuroni i dendriti eksprimiraju stalno, glija će ih eksprimirati samo u stanju upale (Talbot, 2014; Tramutola i sur., 2017).

Kao što je napomenuto, više je pretkliničkih i nekoliko kliničkih studija pokazalo značajnu inhibiciju apoptoze, poticanje proliferacije i diferencijacije neurona te povećanje sinaptičke plastičnosti uz smanjenje kognitivnog deficita, nakon intracerebroventrikularne (icv) primjene samog GLP-1 ili njegovih analoga (Gejl i sur., 2016). Predloženi mehanizam u pozadini je aktivacija GLP-1R koja interferira sa signalizacijskim putem IR-a tako da aktivira PDK1 (eng. *3-Phosphoinositide-Dependent protein Kinase-1*), inače ključan za aktivaciju Akt i posljedičnu inhibiciju GSK3 (eng. *glycogen synthase kinase 3*). Inhibicija GSK3 bitna je u patofiziologiji Alzheimerove bolesti, jer smanjuje nastajanje A β plakova i hiperfosforilaciju tau proteina. (Park, 2011; Simsir i sur., 2018). Dodatno, PDK1 je protein iz PI3k/Akt signalizacijskog puta kojeg aktivira i GLP-1R i postoje dokazi o njegovoj ulozi u apoptozi neurona (Williams i sur., 2000). I p70 kinaza ribosomalnog proteina S6 (p70S6k) je dio signalizacijskog puta PI3k/Akt kao i PDK1, no može se aktivirati i preko mTOR-a (eng. *the mammalian target of rapamycin*), a njenom se aktivacijom također potiče apoptoza neurona (Lin i sur., 2003). Poznato je da u različitim regijama mozga GLP-1R djeluje putem različitih signalizacijskih puteva. Tako u hipotalamusu i hipokampusu dominantno djeluje preko G α podjedinice – raste koncentracija cAMP-a i u konačnici se povećava influks kalcijevih iona u neurone, potiče proliferacija i sprečava apoptoza uslijed aktivacije MAPK (Smith i sur., 2019). Dosadašnja istraživanja upućuju i na ulogu signalizacije GLP-1 putem cAMP-PKA-CREB signalizacijskog puta kao dominantno odgovornog za rast i obnovu neurona, no spominje se i važnost aktivacije drugih

sekundarnih glasnika – Akt, AMPK (eng. *5' adenosine monophosphate-activated protein kinase*), ERK (Gault, 2018). Upravo omjer pERK u odnosu na ukupni tERK (fosforilirani i nefosforilirani, eng. *total ERK*), govori o tome je li specifični izvanstanični signal, potaknuo apoptozu ili autofagiju i stanično preživljavanje. Veći omjer pERK/tERK vodi stanicu u apoptozu, dok niži omjer potiče autofagiju (Liu i sur., 2015).

Kompletna slika uloge GLP-1R u neuroprotekciji ipak još uvijek nije jasna, stoga sve veći broj istraživanja nastoji što je detaljnije moguće opisati koji su točno stanični i molekularni mehanizmi u pozadini. Jedan od mogućih pristupa toj problematici je ispitivanje učinka antagonista GLP1-R.

1.3. Exendin 9-39 (Ex-9)

Exendin 9-39 (Ex-9) je protein već dulje vrijeme poznat i korišten u istraživanjima kao specifični kompetitivni antagonist GLP-1R. Podrijetlo mu nije iz sisavaca već iz otrova guštera *Heloderma suspectum*, a njegova skraćena verzija je homologna ljudskom GLP-1(7-36) amidu u 56% strukture. Među prvim je korištenim analogima GLP-1 peptida, a tada je poslužio u prekliničkom ispitivanju njegovog učinka na sitost nakon intracerebroventrikularne primjene kod štakora. Kasnije je korišten i za ispitivanja učinka na postprandijalno lučenje inzulina i osjetljivost stanica na inzulin kod životinja nakon intravenske primjene, a tek početkom stoljeća počeo se koristiti i u kliničkim ispitivanjima na ljudima (Schirra, 1998).

Exendin 9-39 u kliničkim studijama provedenim na ljudima pokazao je smanjenje inzulintropnog djelovanja intravenski primijenjenog GLP-1 peptida, ovisno o dozi. Međutim, rezultati većine istraživanja upućuju na ključnu ulogu doze antagonista koja se koristi. Ovisno o tkivu, postoje dokazi da Ex-9 na periferiji može djelovati agonistički ili antagonistički, dok njegovo djelovanje u središnjem živčanom sustavu i dijelovima mozga još nije u potpunosti istraženo i definirano (Sathananthan i sur. 2013). Kao što je već napomenuto, točan pozadinski biokemijski mehanizam takvog učinka antagonista nije jasan. Poznavanje biokemijskih promjena koje uzrokuju različite doze antagonista značajno bi doprinijelo dobrom dizajnu daljnjih prekliničkih i kliničkih ispitivanja i razumijevanju terapijskog potencijala agonista.

1.4. Terapijski potencijal GLP-1 agonista u Alzheimerovoj bolesti

Ideja o terapiji Alzheimerove bolesti agonistima GLP-1 receptora rodila se nakon otkrića povezanosti lokalne inzulinske rezistencije u regijama mozga odgovornim za pamćenje. Ubrzo zatim, u eksperimentalnim modelima Alzheimerove bolesti primijećeno je da je kognitivno propadanje uslijed nakupljanja A β plakova sporije i slabije izraženo kod životinja kojima je primijenjen agonist GLP-1R (Mossello i sur., 2011). Šećerna bolest tip 2 (ŠBT2) ili *diabetes mellitus* tip 2 (DMT2) danas se smatra jednim od važnih faktora rizika za razvoj demencije, uključujući vaskularnu demenciju i Alzheimerovu bolest. Dugo se pretpostavljalo da vaskularna oštećenja koja nastaju uslijed napredovanja DMT2 postepeno dovode do odumiranja neurona i posljedičnog propadanja kognicije te da je to jedina veza između DMT2 i demencije (Gejl i sur., 2016). Međutim, rezultati kohortne studije iz 2009. pokazali su da osobe s preddijabetesom ili nedijagnosticiranom DMT2 koje još nisu razvile kardiovaskularne komorbiditete također imaju visoku prevalenciju razvoja Alzheimerove bolesti. Takvi rezultati ukazali su po prvi puta na direktnu povezanost neregulirane glukoze u krvi i razvoja neurodegenerativnih bolesti te pokrenuli pitanje biokemijske pozadine takvog ishoda (Xu i sur., 2009).

U poglavlju 1.1. opisano je višestruko djelovanje GLP-1 hormona na regulaciju razine glukoze u krvi te su navedeni glavni mehanizmi u pozadini (smanjenje inzulinske rezistencije, povećanje rasta β stanica gušterače, poticanje ulaska glukoze u stanice jetre, mišića i masnog tkiva). Upravo zahvaljujući takvom djelovanju, GLP-1 agonisti danas se vrlo učinkovito koriste u terapiji DMT2 (Hinnen, 2017). Međutim, nakon saznanja o direktnoj vezi razine glukoze u krvi i razvoja Alzheimerove bolesti, sve je popularnija ideja o primjeni GLP-1 agonista u njejoj terapiji i prevenciji (Gejl i sur., 2016). Ta je ideja otada potkrijepljena dokazima o neuroprotektivnom djelovanju GLP-1 agonista i činjenicom da aktivacija GLP-1 receptora u mozgu životinja pozitivno utječe na procese učenja i pamćenja, o čemu je također već bilo riječi u prijašnjem tekstu (During i sur., 2003). Kada su se istraživanja počela provoditi na životinjskim modelima Alzheimerove bolesti, pokazalo se da primjena analoga GLP-1 usporava ili čak u potpunosti sprječava propadanje kognicije (Hansen i sur., 2015).

Posebnu prekretnicu predstavljali su rezultati prekliničkog ispitivanja liraglutida, agonista GLP-1R registriranog za liječenje DMT2, na neurodegenerativne promjene u mozgu životinjskog modela Alzheimerove bolesti. Naime, pokazalo se da intraperitonealna primjena

liraglutida kod tih životinja nije djelovala samo preventivno u smislu neurodegenerativnih simptoma, već je potaknula i sinaptogenezu i tako povratila aktivnost dijela neurona i sinapsi čija je funkcija bila izgubljena uslijed neurodegenerativnih promjena. Na temelju tih dokaza, 2013. je pokrenuta klinička studija koja ispituje utjecaj liraglutida na progresiju bolesti i njenih simptoma (McClellan i Hölscher, 2013).

Iako za sada nijedna provedena klinička studija nije ponudila dovoljno čvrste rezultate koji bi jednoznačno demonstrirali učinkovitost agonista GLP-1R u terapiji Alzheimerove bolesti, niti postoje službene smjernice za njihovo uvođenje u terapijski protokol iste, rezultati iz pretklinike sve su uvjerljiviji. Od svih agonista GLP-1R registriranih u Republici Hrvatskoj, najviše rezultata iz pretklinike je dostupno za eksenatid i liraglutid. Za oba je u nekoliko opsežnih studija primijećeno da poboljšavaju kogniciju, smanjuju nakupljanje A β plakova i smanjuju fosforilaciju serotonina na supstratu inzulinskog receptora (IRS, navedena fosforilacija jedan je od indikatora smanjene inzulinske signalizacije) (Bomfim i sur., 2012; Chen i sur., 2012; Kelly i sur., 2015; Long-Smith i sur., 2013; Xu i sur., 2015). Dodatno, eksenatid smanjuje fosforilaciju i nakupljanje tau proteina, sprječava smrt neurona te povećava inzulinsku signalizaciju u neuronima. Liraglutid pak potiče neurogenezu i sinaptogenezu te pozitivno utječe na obnovu memorije (www.alzdiscovery.org).

Trenutno je aktualno više od 200 kliničkih studija različitih GLP-1 agonista, no samo desetak ih ispituje njihov učinak u Alzheimerovoj bolesti. Jedan od razloga za tako mali broj aktivnih kliničkih studija je pitanje učinkovitih doza i pravilnog dizajna studija – koliko dugo će trajati, koji pacijenti će se uključivati i koji će biti isključujući faktori (www.alzdiscovery.org). Upravo u tome i leži važnost podataka koje dobivamo iz pretklinike, a samim time i važnost ovoga rada.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Budući da je terapija Alzheimerove bolesti za sada primarno simptomatska te još uvijek nemamo dovoljno učinkovitu terapiju za usporavanje ili zaustavljanje progresije bolesti, pronalazak djelatnih tvari koje će smanjiti kognitivno propadanje već je godinama visoko na prioritetnoj listi. Posljednjih desetak godina se kao potencijalno rješenje nameću analozi GLP-1 hormona i agonisti GLP-1R za čije neuroprotektivno djelovanje postoji sve veći broj dokaza. Međutim, dok je signalizacijski put GLP-1R u β stanicama gušterače dobro poznat i detaljno istražen, malo se zna o signalizaciji tog receptora u mozgu. Jedan od pristupa istraživanju biokemijskih puteva GLP-1R u mozgu je ispitivanje učinka različitih doza agonista ili antagonista. Osim informacije o točnom biokemijskom mehanizmu, takav pristup nam daje uvid i u molekularne karakteristike liganda, što je ključno za dobar dizajn prekliničkih i kliničkih studija.

Cilj ovog rada je ispitati akutni učinak različitih doza intracerebroventrikularno primijenjenog antagonista GLP1-R eksendina 9 (Ex9) na biokemijske promjene i metaboličku aktivnost neurona u hipotalamusu i hipokampusu štakora. Dobiveni rezultati doprinose razumijevanju biokemijskih procesa koji dovode do smanjenja neuroprotektivnog djelovanja GLP-1 proteina uslijed antagonističkog djelovanja njegovog analoga.

U tu svrhu na uzorcima tkiva hipotalamusa i hipokampusa štakora Western blot metodom su analizirane promjene u ekspresiji c-fos proteina, inzulinskog receptora (IR-a) i sekundarnih glasnika signalizacijskog puta GLP-1R (pERK, tERK, p70S6k, PDK1), 20 minuta nakon intracerebroventrikularne primjene različitih doza Ex9.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Životinje

Pokusi su provedeni na muškim Wistar štakorima starosti 3 mjeseca, tjelesne mase 350-380 g, koji su uzgojeni na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu (HR-POK-007). Sva *in vivo* istraživanja strogo su slijedila smjernice Zakona o zaštiti životinja (NN 135/06), Zakona o izmjenama i dopunama Zakona o zaštiti životinja (NN 37/13) i Pravilnika o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/13). Za obavljanje pokusa u sklopu projekta kojeg je i ovaj znanstveni rad dio, dobivena je dozvola Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Klasa 641-01/19-04/01; Urbroj 380-59-10106-19-111/49). Sa životinjama su isključivo rukovali djelatnici Zavoda osposobljeni za rad na životinjama.

3.1.2. Protutijela i reagensi

U istraživanju su korištena primarna protutijela c-fos (Abcam, Engleska), IR (Merck Millipore, SAD), ERK (Cell-signaling, SAD), p-ERK (Cell-signaling, SAD), p70S6K (Cell-signaling, SAD), aktin (Sigma Aldrich, Njemačka), PDK1 (Cell-signaling, SAD).

U istraživanju su korištena sekundarna protutijela na IgG miša (anti-Ms) i IgG zeca (anti-Rb), povezana s HRP (eng. *horseradish peroxidase*) (Cell-Signaling, SAD).

3.2. Metode

3.2.1. Intracerebroventrikularna primjena Ex-9 i žrtvovanje

GLP-1 antagonista Ex-9 primjenjuje se u mozak intracerebroventrikularno (icv). Štakori su anestetizirani ketaminom (60 mg/kg) i ksilazinom (5-10 mg/kg) i podvrgnuti kratkom kirurškom postupku. Na vrhu glave ošiša se dlaka i napravi rez kože i potkožnog tkiva. Pomoću električne bušilice (NSK Ultimate XL, Hoffman Estates, IL, SAD) napravi se otvor promjera 1 mm u parijetalnoj kosti s lijeve i desne strane, na udaljenosti 1,5-2 mm dijagonalno od križanja sagitalnog i koronarnog šava prema ranije opisanom postupku (Noble i sur., 1967). Životinje se

podijele u 4 grupe (N = 9 životinja po grupi), s obzirom na dozu Ex-9 primijenjenog icv – kontrola (otapalo), 60 µg/kg Ex-9, 85 µg/kg Ex-9 i 125 µg/kg Ex-9. Tanka mikroinjekcijska igla uvodi se na dubinu od 4 mm. Nakon što je igla postavljena u lijevu i desnu moždanu komoru polako se daje Ex-9 otopljen u fiziološkoj otopini u dozi od 60 µg/kg, 85 µg/kg ili 125 µg/kg u ukupnom volumenu od 4 µL. Kontrolnoj skupini životinja na isti se način u općoj anesteziji administrira samo otapalo. Dvadeset minuta nakon primjene otapala, odnosno Ex-9, životinje su podvrgnute dubokoj općoj anesteziji (tiopentalom 60 mg/kg i diazepamom 6 mg/kg) te su svakoj izvađeni likvor i krv. Životinje su potom ili žrtvovane dekapitacijom (6 životinja iz svake grupe) ili podvrgnute perfuziji perfuziji s 4% paraformaldehidom (PFA) otopljenim u fosfatnom puferu (2 g KCl, 11,3 g Na₂HPO₄, 90 g NaCl, 2 g KH₂PO₄ do 1L dH₂O; 3 životinje po grupi). Tkivo životinja koje su žrtvovane dekapitacijom, predviđeno je za western blot analizu.

3.2.2. Pohrana bioloških uzoraka

Nakon 10 min centrifugiranja krvi na 3000 okretaja/min, plazma zaostala u supernatantu i likvor su spremljeni na -80 °C. Mozak izvađen iz dekapitiranih životinja čije je tkivo namijenjeno za western blot analizu, prvo je razdijeljen na hemisfere, a zatim su izdvojene anatomske regije (HPT i HPC) koje se zamrznu u tekućem dušiku i pohrane na -80°C.

3.2.3. Homogenizacija tkiva

Za potrebe western blot analize prvo je potrebno izolirati proteine iz hipotalamusa i hipokampus mozga životinja koje nisu podvrgnute perfuziji. Tkivo najprije stavimo u otopinu pufera za lizu stanica (HPT 250 µL i HPC 300 µL). Otopina pufera se sastoji od:

- otopine 1 M trisa (tris(hidroksimetil)aminometan), pH 8,0, 1 M NaCl, 0,005 M EDTA, 1M DTT, 0,01 M Na-vanadat
- proteaze inhibitora (1:100, Sigma Aldrich, Njemačka)
- fosfataza inhibitora (1 tableta na 10 mL pufera, Roche, Švicarska).

Nakon dodatka pufera, tkivo se na ledu homogenizira korištenjem sonikatora (Microson Ultrasonic Cell Disruptor XL, Manassas, SAD). Homogenizirani uzorci se centrifugiraju 10 minuta na 12 500 g i 4 °C (Heraeus Biofuge Fresco, Hanau, Njemačka). Dobiveni supernatanti se alikvotiraju u triplikatu (i za HPT i za HPC) te pohranjuju na -80 °C do daljnje analize.

3.2.4. Mjerenje koncentracije proteina

Metodom po Lowryju mjeri se koncentracija proteina u uzorcima staničnog lizata HPT I HPC (za svaku životinju u zasebnoj epruveti). Cijeli se postupak provodi na sobnoj temperaturi. U 10 μ L staničnog lizata dodamo 2 mL unaprijed pripremljenog reagensa bakrova sulfata (pomiješamo 49 mL 2% otopine Na_2CO_3 u 0,1 M NaOH i 1 mL otopine koja se sastoji od jednakih dijelova 1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ i 2% NaK-tartarata). Dobivenu otopinu reagensa i lizata ostavimo 10 min na sobnoj temperaturi, a zatim dodamo 0,2 mL Folinova reagensa po epruveti (Folinov reagens se dobiva miješanjem H_2O i Folin-Ciocalteu u omjeru 2:1). Dobivenu smjesu ostavimo 30 min na sobnoj temperaturi. Nastalu plavu boju mjerimo pri valnoj duljini od 750 nm. Kao slijepa proba koristi se 10 μ L 0,1 N HCl, a kao standard otopina albumina goveđeg seruma koncentracije 10 mg/mL. Koncentracija proteina u uzorcima izračuna se u odnosu na standard.

3.2.5. Western blot

Priprema gelova:

Najprije se pripremi donji, 9%-tni SDS-poliakrilamidni gel (SDS – natrijev dodecil sulfat, eng. *sodium dodecyl sulphate*) za razdvajanje. Gel se priprema u čašici na magnetskoj miješalici, a za 2 gela potrebno je (redom): 4,3 mL ddH₂O, 2,5 mL trisa pH 8, 8, 3 mL 30% akrilamid/bisakrilamida, 120 μ L 10% APS-a (amonijev persulfat) i 6,6 μ L TEMED-a (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin). Dobivenu se smjesa nanese između stakalca za elektroforezu i dopuni vodom te pusti da stoji na sobnoj temperaturi. Za to vrijeme pripremi se gornji gel, za sabijanje proteina. Također se radi u čašici na magnetskoj miješalici, a za dva gela potrebno je (redom): 3,05 mL ddH₂O, 1,25 mL trisa pH 6,8, 0,65 mL 30% akrilamid/bisakrilamida, 70 μ L 10% APS-a i 5 μ L TEMED-a. Kada se donji gel stvrdne, ukloni se voda iznad njega te na donji gel doda pripremljenu otopinu za gornji gel i kalup za jažice. Nakon što se skruti i gornji gel, ukloni se kalup te se krene s nanošenjem uzoraka na gel.

Priprema uzoraka:

Uzorci se pripremaju miješanjem jednake količine proteina (dobivene metodom opisanom u 4.2.3.) i pufera za nanošenje na gel (eng. *loading buffer*, LB). LB se sastoji od *sample* pufera (2

mL glicerola, 6 mL 10% SDS, 2,5 mL 1 M trisa pH 6,7, 2-4 mg bromfenol plavila) i 10% β -merkaptoetanol. Uzorci tkiva (homogenati) se najprije promiješaju na mješalici, a nakon dodatka LB kratko centrifugiraju (1 min, 13 000 okretaja/min). U sljedećem koraku, proteine se denaturira kuhanjem uzoraka 10 min na 95°C. Nakon kuhanja, uzorci se ponovno kratko centrifugiraju (1 min, 13 000 okretaja/min) jer je za nanošenje na gel potreban supernatant.

Nanošenje uzoraka, elektroforeza i transfer:

U prvu jažicu svakog gela nanosi se 2 μ L proteinskog markera (Precision Plus Protein™ Standards, All Blue, Bio-Rad, SAD), a u svaku sljedeću po jedan uzorak (25 μ g proteina za HPC i 20 μ g proteina za HPT). Proteinski standard zapravo je standard molekularnih težina (10-250 kDa) koji omogućava da se nakon transfera odredi položaj proteina od interesa na membrani. Nakon nanošenja uzoraka provodi se elektroforeza na 150 V i 400 mA (Bio-Rad PowerPac Basic, Hercules, SAD), u posebnom mediju – u puferu za razdvajanje (eng. *running buffer*), koji se sastoji od 10 g SDS-a u 100 mL H₂O, 30 g trisa i 115,2 g glicina otopljenih u 1 L H₂O. Elektroforeza se provodi 70 min. Po završetku proteini se transferiraju na nitroceluloznu membranu, uz 100 V i 400 mA, kroz 60 min i u posebnom mediju – u puferu za prijenos (eng. *transfer buffer*) koji se sastoji od 200 mL hladnog metanola, 700 mL dH₂O i 100 mL smjese 105 g glicina i 22,32 g trisa.

Inkubacija s primarnim i sekundarnim protutijelima, detekcija proteina:

Membrane se nakon transfera kratko reverzibilno oboje s Ponceau bojom (0,1% Ponceau S u 5% octenoj kiselini) kako bi se provjerilo jesu li se proteini uspješno prenijeli s gela na membranu, a zatim se isperu s puferom za ispiranje (LSWB, eng. *low-salt washing buffer* = 1,211 g trisa i 8,766 g NaCl u 1L H₂O, pH 7,5). Membrane se zatim blokiraju s 5%-tnim nemasnim mlijekom (1 g nemasnog mlijeka u prahu, 20 mL LSBW i 100 μ L Tween 20) 60 min na sobnoj temperaturi, kako bi se spriječila nespecifična vezanja. Nakon blokiranja, ukloni se višak mlijeka i doda priređena otopina protutijela (svako protutijelo otopljeno u otopini za blokiranje u određenoj koncentraciji: c-fos, IR, ERK, p-ERK, p706Sk – 1:1000) i ostavi se inkubirati na 4°C preko noći. Idućeg dana, membrane se ispiru 3 puta po 5 min s LSBW-om i inkubiraju na sobnoj temperaturi 60 min s odgovarajućim otopinama sekundarnih protutijela (anti-Ms ili anti-Rb u otopini za blokiranje u omjeru 1:2000). Nakon sat vremena, membrane se ponovno isperu 3 puta po 5 min u LSBW-u i na kraju inkubiraju s kemiluminiscentnim detekcijskim kitom. Kemiluminiscentni reagens dobije se miješanjem istih volumena (100 μ L po membrani) otopine vodikovog peroksida i luminola (Supersignal West Femto, ThermoFisher, SAD). Signali se snime pomoću MicroChemi kamere (DNR Bio-Imaging Systems MicroChemi, Izrael). Nakon spremanja slika, membrane se ponovno ispiru 3 puta po

5 min u LSBW-u te potom inkubiraju s primarnim protutijelom na β -aktin (1:2000) na sobnoj temperaturi 120 min. Daljnji koraci za snimanje signala β -aktina jednaki su kao i kod snimanja signala željenog proteina, a opisani iznad. Mjerenje signala β -aktina služi kao kontrola postupka jer se dobiveni rezultati za svaki protein izraze kao relativni omjer intenziteta željenog proteina i aktina.

3.2.6. Statistička obrada i vizualizacija rezultata

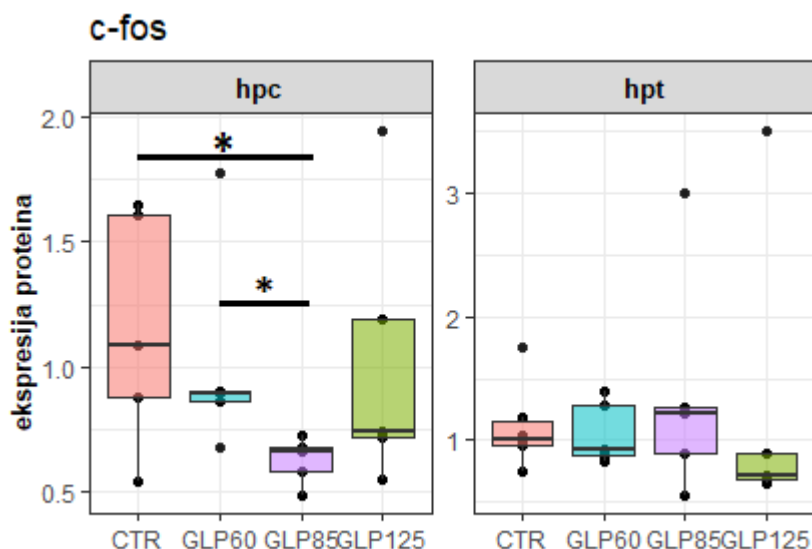
Korelacijske matrice temeljene na Pearsonovom korelacijskom koeficijentu izrađene su pomoću paketa corrplot (www.cran.r-project.org). Daljnja eksplorativna analiza provedena je pomoću faktorske analize za mješovite tipove podataka (FAMD, eng. *factor analysis of mixed data*) koja omogućava provođenje postupka smanjenja dimenzije istovremeno na podacima kvantitativnog i kategoričkog tipa korištenjem funkcije FAMD u paketu FactoMineR (www.factominer.free.fr). Prostorni odnosi podataka dobivenih postupkom smanjenja broja dimenzija prikazani su biplotom s prvom dimenzijom prikazanom na x-osi, a drugom na y-osi (www.rpkgs.datanovia.com). Dodatno, dobiveni podaci analizirani su usporedbom grupa životinja pomoću Wilcoxonovog neparametrijskog testa. Svi podaci vizualizirani su pomoću paketa ggplot2 (www.cran.r-project.org). Sve analize i vizualizacije provedene su pomoću softvera R i python pandas biblioteke unutar Google Colab okruženja.

Statistička analiza provedena je neparametrijskim Kruskal-Wallis i Wilcoxon testom pomoću softvera GraphPad Prism 8. Rezultati su prikazani kao box plot s prikazanim medijanom i svim pojedinačno prikazanim vrijednostima u obliku točaka. Razina značajnosti označena je kao * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4. REZULTATI

4.1. Akutni učinak icv Eksendina 9 na ekspresiju *c-fos* u hipotalamusu i hipokampusu mozga štakora

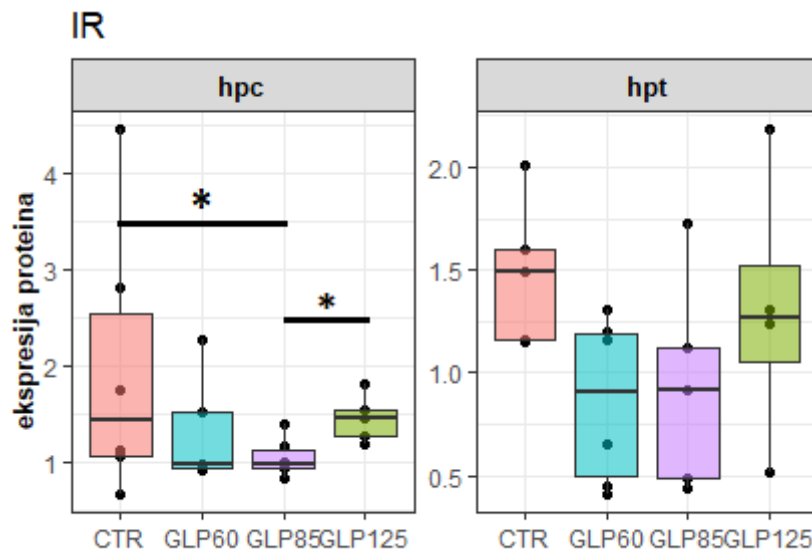
Protoonkogen *c-fos* jedan je od neposrednih ranih gena (eng. *immediate early gene*, IEG). Budući da je njegova ekspresija prolazna i brzo se mijenja kao odgovor na različite stimulanse, koristi se kao marker neuronske aktivnosti. Protoonkogeni iz IEG skupine uglavnom kodiraju za transkripcijske faktore, uključujući i *c-fos* protein, koji onda dalje reguliraju ekspresiju gena (Herrera i sur., 1996.; Wilson i sur., 2001). Intracerebroventrikularna primjena doze od 85 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Eksendina 9 statistički je značajno smanjila ekspresiju *c-fos* proteina u hipokampusu u odnosu na kontrolu (-58 %, $p < 0,05$, vs CTR) i u odnosu na dozu od 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (-52 %, $p < 0,05$, vs GLP-1 60), dok u hipotalamusu nije došlo do statistički značajnih promjena u ekspresiji iako postoji tendencija sniženja kod doze od 125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Graf 1).



Graf 1. Western blot analiza omjera intenziteta signala aktivacijskog markera *c-fos* i β -aktina u hipokampusu (HPC, lijevo) i hipotalamusu (HPT, desno) kontrolnih životinja (CTRL) i životinja 20 minuta nakon intracerebroventrikularne primjene 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (GLP-1 60), 85 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (GLP-1 85) ili 125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (GLP-1 125) Ex-9. Rezultati su prikazani kao box plot s prikazanim medijanom i svim pojedinačno prikazanim vrijednostima u obliku točaka. Razina značajnosti označena je kao * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.2. Akutni učinak icv Eksendina 9 na ekspresiju inzulinskog receptora u hipotalamusu i hipokampusu mozga štakora

Inzulinski receptor posebno je zastupljen u hipokampusu, hipotalamusu, olfaktornom bulbusu i moždanom korteksu. Njegov signalizacijski put uključuje veliki broj sekundarnih glasnika, od kojih se mnogi preklapaju sa signalizacijskim putem GLP-1 receptora i sudjeluju u regulaciji metabolizma (Hoyer i sur., 2004). Stoga je ispitano mijenja li se ekspresija IR-a kao odgovor na različite doze antagonista GLP-1R. Intracerebroventrikularna primjena doze od 85 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Eksendina 9 statistički je značajno smanjila ekspresiju IR-a u hipokampusu u odnosu na kontrolu (-56 %, $p < 0,05$, vs CTR) i u odnosu na dozu od 125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (-28 %, $p < 0,05$, vs GLP-1 125), dok u hipotalamusu nema statistički značajnih promjena iako postoji tendencija sniženja kod doze od 85 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Graf 2).

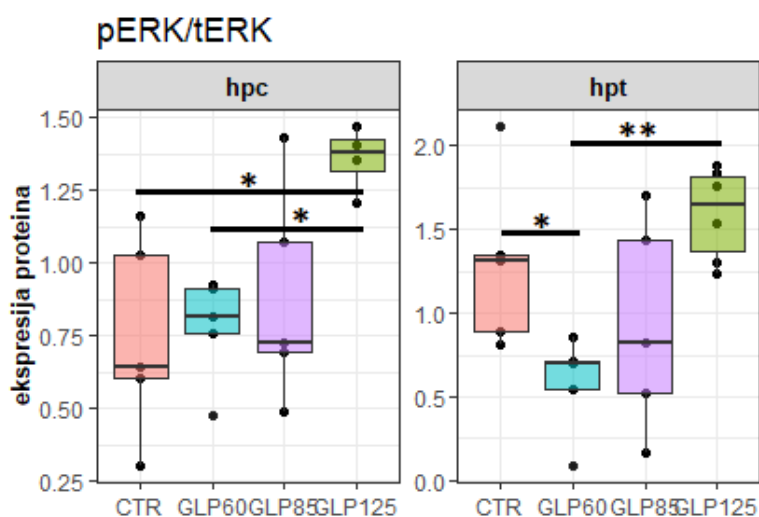


Graf 2. Western blot analiza omjera intenziteta signala IR-a i β -aktina u hipokampusu (HPC, lijevo) i hipotalamusu (HPT, desno) kontrolnih životinja (CTRL) i životinja 20 minuta nakon intracerebroventrikularne primjene 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (GLP-1 60), 85 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (GLP-1 85) ili 125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (GLP-1 125) Ex-9. Rezultati su prikazani kao box plot s prikazanim medijanom i svim pojedinačno prikazanim vrijednostima u obliku točaka. Razina značajnosti označena je kao * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.3. Akutni učinak icv Eksendina 9 na ekspresiju sekundarnih glasnika *GLP-1R* signalizacijskog puta u hipotalamusu i hipokampusu štakora

4.3.1. Akutni učinak icv Eksendina 9 na ekspresiju pERK i tERK u hipotalamusu i hipokampusu štakora

Kinaza regulirana izvanstaničnim signalima (ERK) postoji u stanici u dva oblika - fosforiliranom (pERK), koji je ujedno i aktivni oblik, te u nefosforiliranom obliku (ERK). Omjer pERK u odnosu na ukupni ERK (fosforilirani i nefosforilirani), govori o tome je li specifični izvanstanični signal potaknuo apoptozu ili autofagiju i stanično preživljavanje. Veći omjer pERK/tERK vodi stanicu u apoptozu, dok niži omjer potiče autofagiju (Liu i sur., 2015). Intracerebroventrikularna primjena doze od 125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Eksendina 9 statistički je značajno povećala omjer pERK/tERK u hipokampusu (+81 %, $p < 0,05$, vs CTRL; + 75%, $p < 0,05$, vs GLP-1 60), dok je doza od 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Eksendina 9 statistički značajno smanjila omjer pERK/tERK u hipotalamusu (-55 %, $p < 0,05$, vs CTRL). Doza od 125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ povećala je omjer pERK/tERK i u hipotalamusu, no ne statistički značajno u odnosu na kontrolu, već u odnosu na dozu od 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Eksendina 9 (+174 %, $p < 0,01$, vs GLP-1 60) (Graf 3).

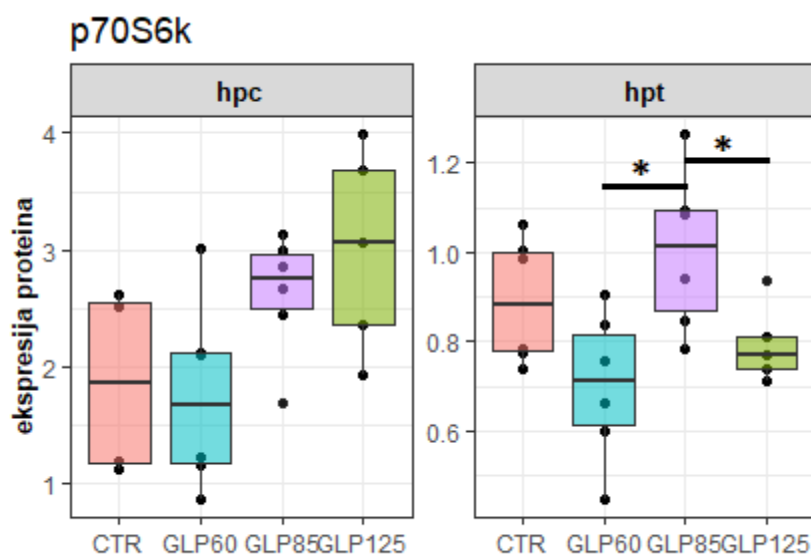


Graf 3. Western blot analiza omjera intenziteta signala pERK/tERK i β -aktina u hipokampusu (HPC, lijevo) i hipotalamusu (HPT, desno) kontrolnih životinja (CTRL) i životinja 20 minuta nakon intracerebroventrikularne primjene 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (GLP-1 60), 85 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (GLP-1 85) ili 125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (GLP-1 125) Ex-9. Rezultati su prikazani kao box plot s prikazanim medijanom i svim

pojedinačno prikazanim vrijednostima u obliku točaka. Razina značajnosti označena je kao * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.3.2. Akutni učinak icv Eksendina 9 na ekspresiju p70S6k u hipotalamusu i hipokampusu mozga štakora

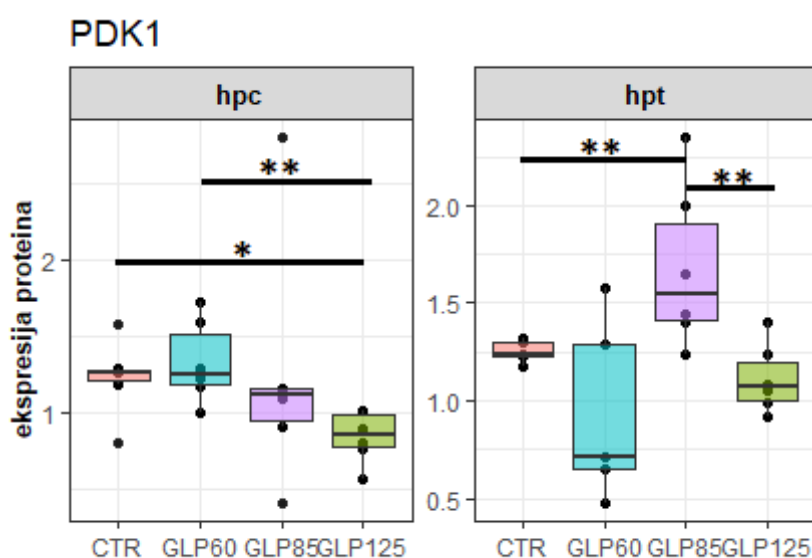
p70 kinaza ribosomalnog proteina S6 (p70S6k) dio je signalizacijskog puta mTOR. Fosforilacijom ribosomalnog S6 proteina, potiče sintezu proteina i sudjeluje u progresiji staničnog ciklusa, preživljavanju i rastu stanice (Lin i sur., 2003). Intracerebroventrikularna primjena doze od 85 $\mu\text{g/kg}$ i 125 $\mu\text{g/kg}$ Eksendina 9 povećala je ekspresiju p70S6k u hipokampusu, no odnosi između grupa nisu statistički značajni. U hipotalamusu rezultati pokazuju samo statistički značajnu razliku u ekspresiji p70S6k kod doze od 85 $\mu\text{g/kg}$ u odnosu na 60 $\mu\text{g/kg}$ i 125 $\mu\text{g/kg}$ Eksendina 9 (+43 %, $p > 0,05$, vs GLP-1 60; +43%, $p > 0,05$, vs GLP-1 125) (Graf 4).



Graf 4. Western blot analiza omjera intenziteta signala p70S6k i β -aktina u hipokampusu (HPC, lijevo) i hipotalamusu (HPT, desno) kontrolnih životinja (CTRL) i životinja 20 minuta nakon intracerebroventrikularne primjene 60 $\mu\text{g/kg}$ (GLP-1 60), 85 $\mu\text{g/kg}$ (GLP-1 85) ili 125 $\mu\text{g/kg}$ (GLP-1 125) Ex-9. Rezultati su prikazani kao box plot s prikazanim medijanom i svim pojedinačno prikazanim vrijednostima u obliku točaka. Razina značajnosti označena je kao * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.3.3. Akutni učinak icv Eksendina 9 na ekspresiju PDK1 u hipotalamusu i hipokampusu mozga štakora

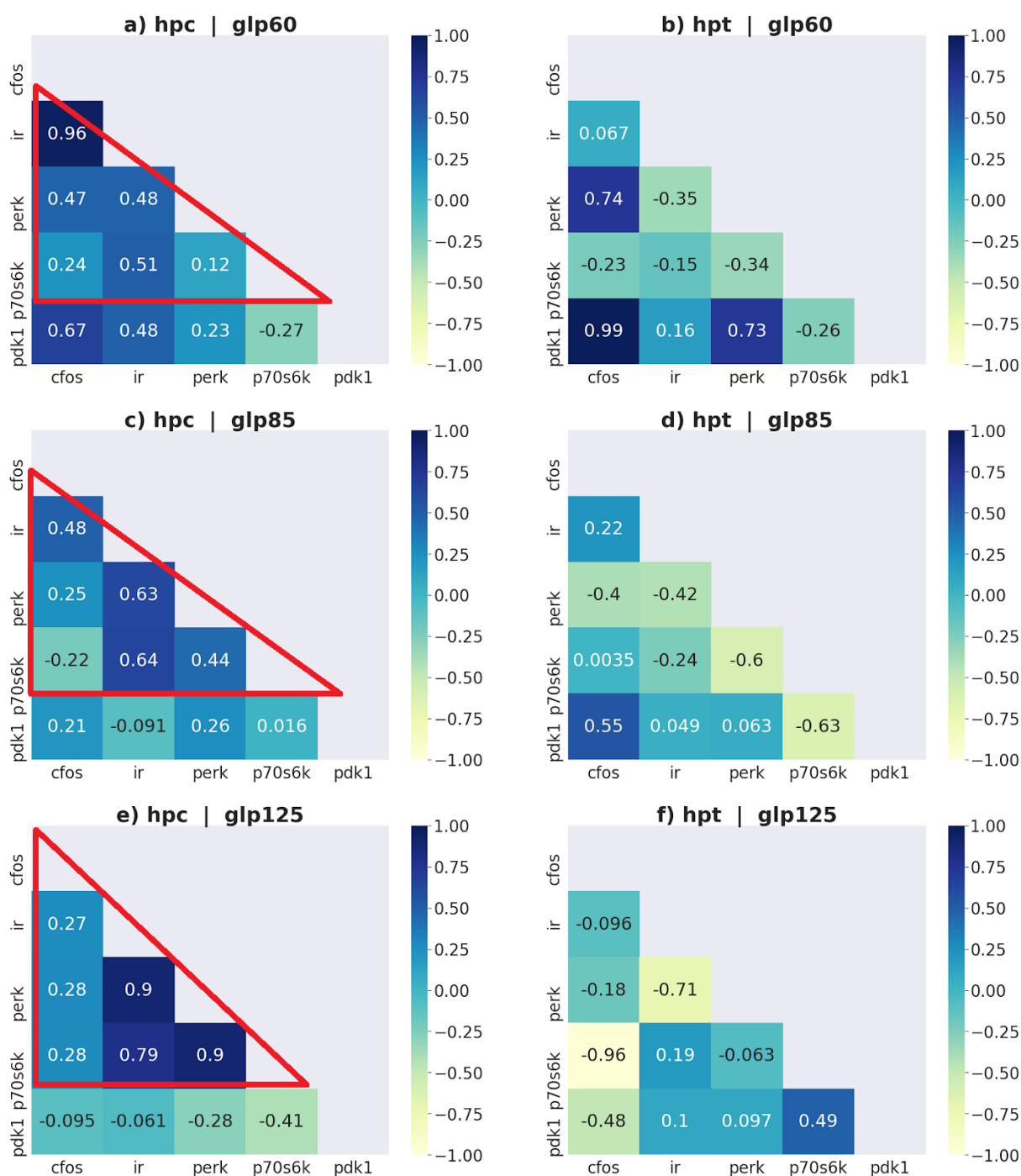
O fosfoinozitudu ovisna protein kinaza 1 (PDK1) je protein iz PI3k/Akt signalizacijskog puta koji uključuje i p70S6k. Uključen je u regulaciju procesa proliferacije, diferencijacije i apoptoze (Belham i sur., 1999; Williams i sur., 2000). Intracerebroventrikularna primjena doze od 125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Eksendina 9 statistički je značajno smanjila ekspresiju PDK1 u hipokampusu (-31 %, $p < 0,05$, vs CTRL; -36 %, $p < 0,01$, vs GLP-1 60), dok je u hipotalamusu doza od 85 $\mu\text{g}/\text{kg}$ statistički značajno povećala ekspresiju PDK1 (+51 %, $p < 0,01$, vs CTRL; +51 %, $p < 0,01$, vs GLP-1 125) (Graf 5).



Graf 5. Western blot analiza omjera intenziteta signala PDK1 i β -aktina u hipokampusu (HPC, lijevo) i hipotalamusu (HPT, desno) kontrolnih životinja (CTRL) i životinja 20 minuta nakon intracerebroventrikularne primjene 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (GLP-1 60), 85 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (GLP-1 85) ili 125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (GLP-1 125) Ex-9. Rezultati su prikazani kao box plot s prikazanim medijanom i svim pojedinačno prikazanim vrijednostima u obliku točaka. Razina značajnosti označena je kao * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.4. Matrice korelacija promjene ekspresije proteina od interesa u hipokampusu i hipotalamusu

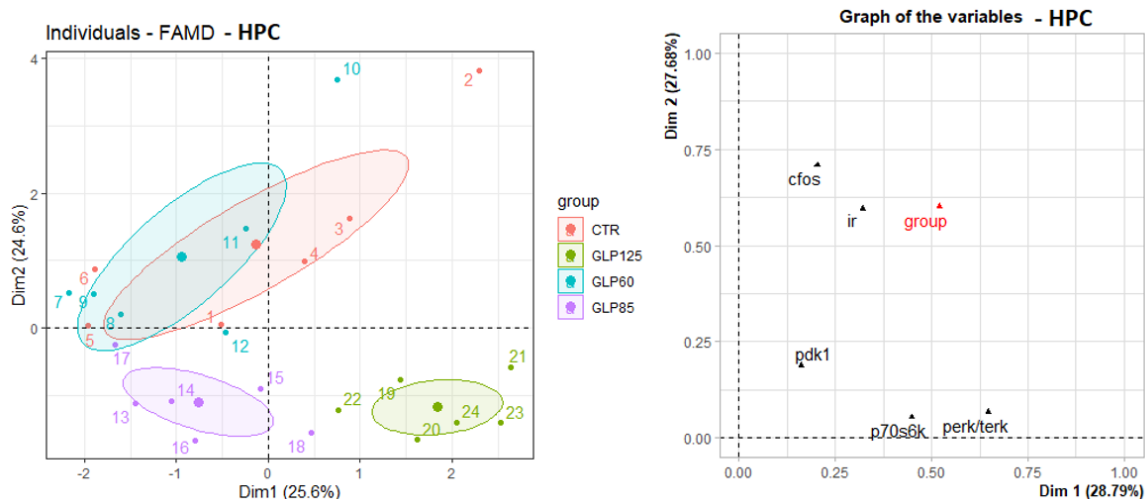
Kako bi se dobio što jasniji uvid u eventualnu povezanost mjerenih proteina koji su dio različitih ili istih signalizacijskih puteva, ispitana je korelacija između promjene ekspresije svakog pojedinog proteina sa promjenom ekspresije ostalih proteina, na način da je svaka skupina uspoređena s kontrolnom skupinom. Detaljna analiza sa ispisom i 2D i 3D vizualizacijom rezultata dostupna je pod www.colab.research.google.com/drive. Ovi podaci mogu ponuditi jasniju sliku o signalizacijskim putevima koji se aktiviraju ili inhibiraju unutar stanice uslijed antagonističkog djelovanja Ex-9. U hipokampusu, promjena ekspresije c-fosa pozitivno korelira s promjenom ekspresije IR-a (Pearsonov korelacijski koeficijent je +0,91), a zanimljiva je i nešto slabija pozitivna korelacija promjene ekspresije p70S6k s promjenom omjera pERK/tERK (Pearsonov korelacijski koeficijent je +0,41). U hipotalamusu nema značajnijih pozitivnih korelacija u promjenama ekspresije proteina, no ekspresija c-fosa negativno korelira s ekspresijom p70S6k (Pearsonov korelacijski koeficijent je -0,43) (Graf 6).



Graf 6. Matrice korelacije promjene ekspresije mjerenih proteina u odnosu na kontrolnu skupinu. Lijevi stupac (a), c), e)) prikazuje rezultate po dozi za hipokampus (hpc), a desni stupac (b), d), f)) za hipotalamus (hpt). Svaki od tri retka odgovara jednoj od tri testne doze GLP-1. Pozitivan broj je indicacija pozitivne korelacije, a negativan negativne korelacije. Vrijednosti bliske nuli su indicacija statističke nezavisnosti dviju varijabli. Crvenim trokutom su okruženi dijelovi matrica unutar HPC s znatnom korelacijom između c-fosa, pERK-a, IR-a i p70S6k.

4.5. FAMD analiza promjene ekspresije svih proteina u hipokampusu i hipotalamusu

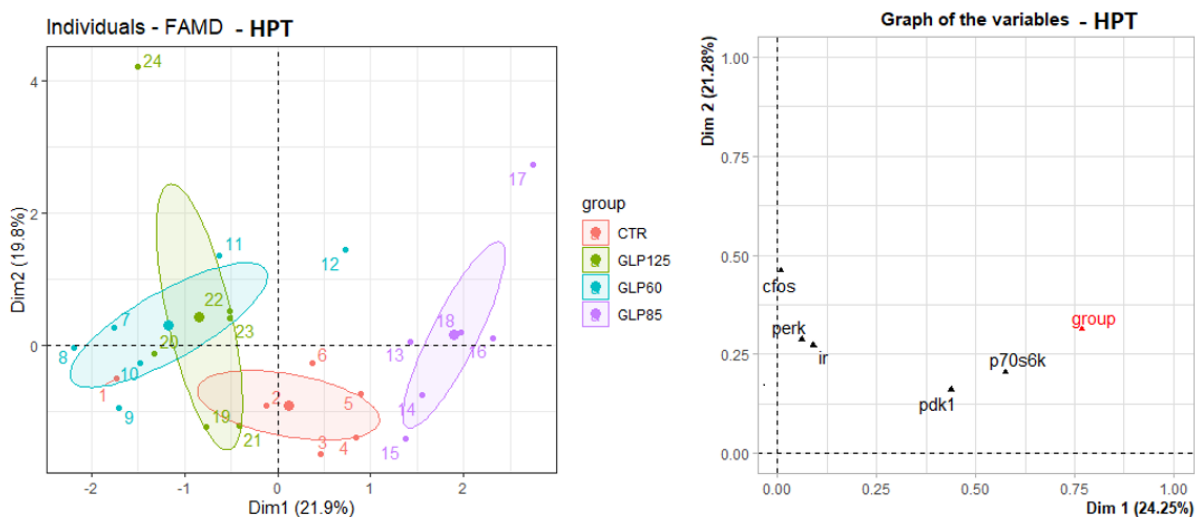
Faktorska analiza za mješovite tipove podataka (FAMD) kombinira analizu glavnih komponenata (PCA, eng. *principal components analysis*) i višestruku analizu korespondencije (MCA, eng. *multiple correspondence analysis*). To znači da omogućava usporedbu sličnosti rezultata za životinje iz iste skupine (CTR, GLP-1 60, GLP-1 85, GLP-1 125), ali uzimajući u obzir i kvalitativne i kvantitativne varijable. Budući da se u eksperimentu promatraju promjene 5 različitih proteina, istovremeni prikaz promjena u ekspresiji koje se događaju za sve njih nije moguć s 2D ni 3D vizualizacijom pa je stoga učinjena proširena analiza s PCA. Kvalitativne varijable, u ovom slučaju, odgovaraju skupinama i regijama (HPT, HPC) (www.sthda.com). Ggplot paketom, koji je dio R softvera, rezultati su vizualizirani na dva načina. Desni graf na Grafu 7 prikazuje doprinos pojedinih varijabli glavnim dimenzijama. Kao što je vidljivo iz tog grafa, najveći doprinos prvoj dimenziji (x-os) imaju omjer ekspresije pERK/tERK i p70S6k. Najveći doprinos drugoj dimenziji (y-os) imaju ekspresija c-fosa i IR-a. Faktorska mapa prikazana na lijevoj strani Grafa 7 prikazuje doprinos obje dimenzije svakoj pojedinoj životinji iz svih skupina u HPC-u. Iz mape možemo iščitati da je u skupini GLP-1125 najznačajnija promjena u pERK/tERK i p70S6k koje odgovaraju prvoj dimenziji. Promjena c-fosa i IR-a koje najviše doprinose drugoj dimenziji, značajne su u skupini CTR i GLP-1 60 (Graf 7).



Graf 7. FAMD analiza promjene ekspresije svih proteina u hipokampusu (HPC), temeljene na rezultatima dobivenim Western blot analizom. Mapa na lijevoj strani prikazuje smještaj individualnih rezultata za svaku životinju u faktorskoj mapi s obzirom na utjecaj glavnih dimenzija. Desni graf prikazuje glavne dimenzije (x os je Dimenzija 1, y os je Dimenzija 2) i

doprinos pojedine varijable svakoj od dimenzija. Varijabla “grupa” se odnosi na doprinos različitih skupina životinja (CTR, GLP-1 60, GLP-1 85, GLP-1 125) pojedinoj dimenziji.

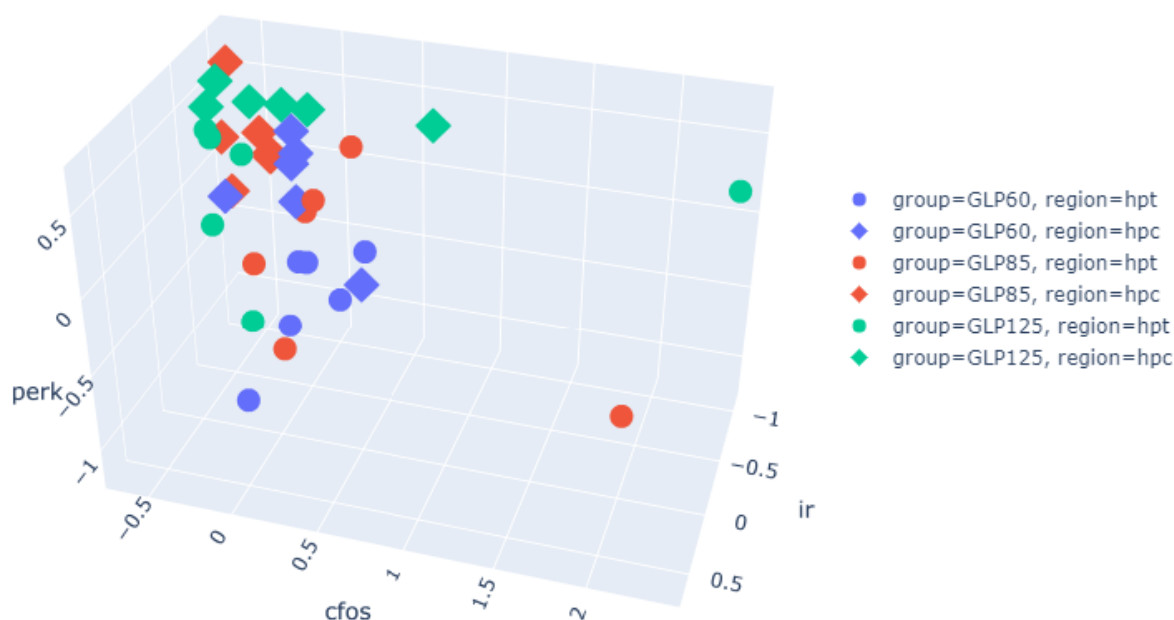
U slučaju hipotalamusa, na već opisani način se interpretira desni graf prikazan na Grafu 8. Najveći doprinos prvoj dimenziji (x-os) ima skupina u kojoj je životinja (CTR, GLP-1 60, GLP-1 85, GLP-1 125), a nešto manji doprinos i u ovom slučaju ima p70S6k. Najveći doprinos drugoj dimenziji (y-os) imaju c-fos, pERK/tERK i IR. Iz faktorske mape (Graf 8 lijevo) vidimo da je promjena p70S6k koja pripada prvoj dimenziji najznačajnija u skupini GLP-1 85. Promjena varijabli koje nose najveći doprinos drugoj dimenziji (c-fos, pERK/tERK, IR) vidljiva je u svim skupinama, osim kontrole (CTR) (Graf 8).



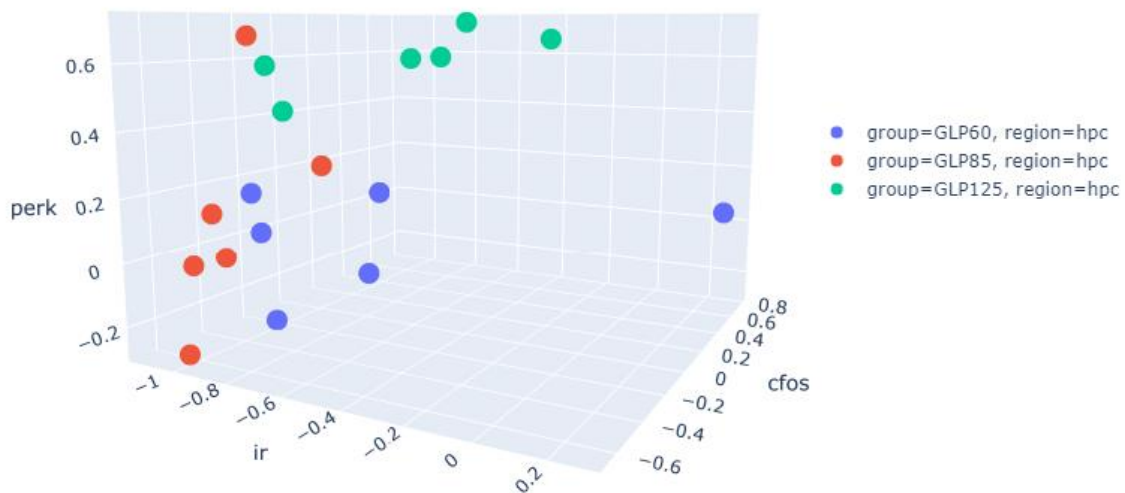
Graf 8. FAMD analiza promjene ekspresije svih proteina u hipotalamus (HPT), temeljene na rezultatima dobivenim Western blot analizom. Mapa na lijevoj strani prikazuje smještaj individualnih rezultata za svaku životinju u faktorskoj mapi s obzirom utjecaj glavnih dimenzija. Desni graf prikazuje glavne dimenzije (x os je Dimenzija 1, y os je Dimenzija 2) i doprinos pojedine varijable svakoj od dimenzija. Varijabla “grupa” se odnosi na doprinos različitih skupina životinja (CTR, GLP-1 60, GLP-1 85, GLP-1 125) pojedinoj dimenziji.

4.6. 3D prikaz promjene ekspresije c-fosa, IR-a i pERK-a, ovisno o dozi

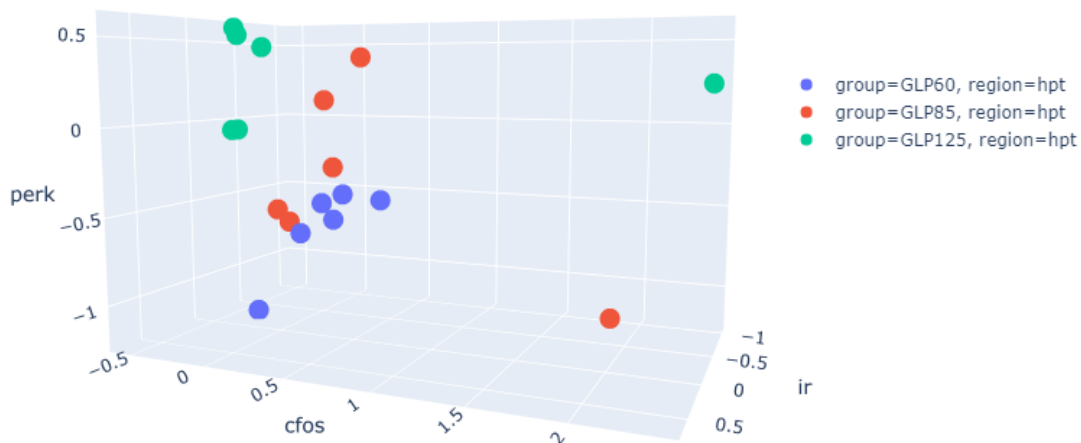
Budući da je u matricama korelacije primijećena uvjerljiva konzistentnost u promjeni ekspresije c-fosa, pERK-a i IR-a, zanimljivo je pogledati kako izgleda dinamički prikaz tih promjena u ovisnosti o dozi Ex-9. U svrhu toga, generirane su 3D matrice koje prikazuju diferencijalnu analizu korelacija ekspresije tih proteina za svaku dozu Ex-9 u odnosu na kontrolu. Generirane su tri 3D matrice - ona koja na istom grafu prikazuje sve uzorke iz HPC i HPT (Graf 9) te zaseban graf s izdvojenim točkama iz HPC (Graf 10) i HPT (Graf 11).



Graf 9. 3D prikaz diferencijalne analize korelacija ekspresije proteina (c-fosa, pERK-a i IR-a) u odnosu na kontrolnu skupinu u HPC i HPT za sve doze. Svaki je uzorak prikazan kao zasebna točka u prostoru, prema promjeni ekspresije c-fosa (x-os), pERK-a (y-os) i IR-a (z-os). Kompletan prikaz s mogućnošću dinamičkog 3D prikaza, dostupan je na: <https://colab.research.google.com/drive/1rxiiFEK2SoseNKIefwjGht6DQmZhKxoB?authuser=0>.



Graf 10. 3D prikaz diferencijalne analize korelacija ekspresije proteina (c-fosa, pERK-a i IR-a) u odnosu na kontrolnu skupinu u HPC za sve doze. Svaki je uzorak prikazan kao zasebna točka u prostoru, prema promjeni ekspresije c-fosa (x-os), pERK-a (y-os) i IR-a (z-os). Kompletan prikaz s mogućnošću dinamičkog 3D prikaza, dostupan je pod <https://colab.research.google.com/drive/1rxiiFEK2SoseNKIefwjGht6DQmZhKxoB?authuser=0>.



Graf 11. 3D prikaz diferencijalne analize korelacija ekspresije proteina (c-fosa, pERK-a i IR-a) u odnosu na kontrolnu skupinu u HPT za sve doze. Svaki je uzorak prikazan kao zasebna točka u prostoru, prema promjeni ekspresije c-fosa (x-os), pERK-a (y-os) i IR-a (z-os). Kompletan prikaz s mogućnošću dinamičkog 3D prikaza, dostupan je pod <https://colab.research.google.com/drive/1rxiiFEK2SoseNKIefwjGht6DQmZhKxoB?authuser=0>.

5. RASPRAVA

Protoonkogen *c-fos* jedan je od neposrednih ranih gena (eng. *immediate early gene*, IEG) i marker je neuronske aktivnosti, budući da mu se ekspresija mijenja neposredno nakon stimulacije stanice. Protoonkogeni iz IEG skupine uglavnom kodiraju za transkripcijske faktore, uključujući i *c-fos* protein, koji onda dalje regulira ekspresiju gena (Hoffman i sur., 1993). Smanjenje ekspresije *c-fosa* povezano je sa smanjenjem neuralne aktivnosti, a samim time i s gubitkom kognicije (Gallo i sur., 2018). Ekstremno smanjenje ekspresije *c-fos* proteina mogući je indikator značajnog gubitka aktivnosti neurona i njihovog propadanja (Corbett i sur., 2017). S druge strane, povećanje ekspresije *c-fos* proteina u limbičkom sustavu zabilježeno je i kod periferne i kod centralne primjene GLP-1 proteina i drugih agonista GLP-1R, a to je povećanje u ekspresiji ujedno i jedan od indikatora neuroprotektivnog djelovanja GLP-1 (Baraboi i sur., 2011). Iz ovdje prikazanih rezultata je vidljivo konzistentno smanjenje ekspresije *c-fos* proteina i u HPC i u HPT (Graf 1), nakon icv primjene svih ispitivanih doza Ex-9. Konzistencija u padu ekspresije *c-fos* proteina posebno je vidljiva u rezultatima za dozu od 125 µg/kg pa se na Grafu 1 na oba grafa (HPC i HPT) vidi da je medijan rezultata u toj ispitivanoj skupini ispod medijana kontrolne skupine (CTR). Dok je u HPT-u upravo ta doza Ex-9 od 125 µg/kg uzrokovala najznačajnije smanjenje ekspresije *c-fosa*, u HPC-u je to doza od 85 µg/kg. Iako rezultati za HPT nisu statistički značajni radi intergrupne varijabilnosti, postoji tendencija sniženja ekspresije *c-fosa* s povećanjem doze Ex-9. Prezentirani rezultati su stoga u skladu s postojećom literaturom (Berrera i sur., 2009; Chan i sur., 2014), ali i u skladu s postavljenim očekivanjima da će primjena antagonista GLP-1R smanjiti neuroprotektivno djelovanje GLP-1 proteina, ovisno o dozi. Zanimljivi trend moguće je primijetiti i kod matrica korelacije na Slici 1. Vidi se da se korelacija promjene ekspresije *c-fosa* u odnosu na svaki drugi protein konzistentno mijenja s povećanjem doze, odnosno, ta korelacija povećanjem doze ili sustavno raste ili sustavno pada, ovisno o tome koji protein se promatra. To daje vrlo vrijedan podatak da je *c-fos* znatno dobar prediktor za promjene drugih proteina u obje regije. Drugim riječima, ako je poznata promjena u ekspresiji *c-fosa* kod različitih doza u obje regije mozga, može se pretpostaviti kakva će promjena biti u ekspresiji drugih proteina.

Osim putem aktivacije *c-fosa*, GLP-1 protein i drugi agonisti GLP-1R pokazuju neuroprotektivni učinak i putem regulacije metabolizma i potrošnje energije u neuronima. U više je istraživanja potvrđeno da aktivacija GLP-1R na površini neurona, posebno u dijelovima limbičkog sustava, potiče lučenje inzulina i samim time bolje iskorištenje glukoze u neuronima.

Predloženi i višestruko potvrđeni mehanizam u pozadini je povećanje koncentracije cAMP-a unutar neurona, što posljedično uzrokuje aktivaciju PKA i otvaranje kalcijevih kanala koji pospješuju egzocitozu inzulina u izvanstanični prostor neurona (Hölscher 2012; Hölscher 2014). U prijašnjim je istraživanjima dokazano i da inhibicija IR-a smanjuje protektivno djelovanje GLP-1 na periferiji, no dokazi o takvoj međuovisnosti u središnjem živčanom sustavu još nedostaju (Caporarello i sur., 2017). Sukladno postavljenoj hipotezi, očekivani suprotni učinak Ex-9, antagonista GLP-1R, i smanjenje ekspresije IR-a uslijed smanjenog lučenja inzulina iz stanica, vidljiv je na Grafu 2. Slično kao i kod rezultata za c-fos, i ovdje se ekspresija IR-a konzistentno smanjuje kod svih primijenjenih doza Ex-9. Najznačajniju promjenu i u HPC i u HPT uzrokovala je doza od 85 $\mu\text{g/kg}$, a zanimljiv je blagi porast ekspresije IR-a kod doze od 125 $\mu\text{g/kg}$ u odnosu na doze 60 $\mu\text{g/kg}$ i 85 $\mu\text{g/kg}$. Razlog za takav blagi porast kod te doze trebalo bi ispitati u budućim eksperimentima, dodatkom još jedne doze veće od 125 $\mu\text{g/kg}$, koja bi pomogla utvrditi postoji li konzistentan porast ekspresije IR-a kod viših doza. Zanimljiva je i velika korelacija u promjeni ekspresije c-fosa i IR-a pri dozama od 60 i 85 $\mu\text{g/kg}$ u HPC, koju je moguće iščitati iz prikaza matrica korelacija na Slici 1. a) i c). Ta povezanost između c-fosa i IR-a se vidi i na Grafovima 7 i 8 gdje na desnom grafu koji prikazuje doprinos pojedinog proteina dvjema dimenzijama, c-fos i IR i u HPC i u HPT značajno doprinose drugoj dimenziji (y-osi). Interpretacijom mape koja prikazuje smještaj svakog pojedinog uzorka iz HPC s obzirom na doprinos te dvije dimenzije (Graf 7 lijevo), vidi se da su *clusteri* pojedinačnih rezultata za sve 4 skupine (CTR, GLP-1 60, GLP-1 85 i GLP-1 125) po toj dimenziji najkompaktniji (najuži), što dodatno potvrđuje statističku značajnost rezultata za c-fos i IR. Ovako jaka korelacija između promjene IR-a i c-fosa, zanimljiva je i u trenutku pisanja ovoga rada još nije konkretno opisana u dostupnoj literaturi. Moguće objašnjenje je da smanjena ekspresija IR-a znači i smanjeno iskorištenje glukoze u neuronima, čime se indirektno smanjuje i neuralna aktivnost, odnosno ekspresija c-fosa. Međutim, takvu bi pretpostavku trebalo detaljnije ispitati dodatnim eksperimentima.

Omjer pERK u odnosu na ukupni ERK (tERK, fosforilirani i nefosforilirani), govori o tome je li specifični izvanstanični signal potaknuo apoptozu (veći omjer pERK/tERK) ili autofagiju (manji omjer pERK/tERK) i stanično preživljavanje (Liu i sur., 2015). Kao što je vidljivo iz Grafa 3, povišenje doze Ex-9 uzrokovalo je povećanje koncentracije pERK-a (porast omjera pERK/tERK) u HPC i u HPT, što ukazuje na pojačanu aktivnost enzima te posljedičnu apoptozu. Statistički najznačajniju promjenu uzrokovala je upravo najviša doza od 125 $\mu\text{g/kg}$, što je u skladu s podacima iz literature da GLP-1 pri nižim dozama potiče autofagiju i

preživljavanje (manja vrijednost pERK/tERK), a pri višim dozama apoptozu (veća vrijednost pERK/tERK) (Bell i sur. 2016, Liu Z i sur., 2015). I ovi su rezultati u skladu sunaprijed postavljenim pretpostavkama i očekivanjima, da će viša doza Ex-9 potaknuti apoptozu neurona i tako smanjiti neuroprotektivno djelovanje GLP-1. Dodatna potvrda o takvom trendu porasta pERK-a s porastom doze Ex-9 je i matrica korelacije promjene ekspresije proteina u HPC prikazana na Slici 1 a), c) i e) gdje je vidljivo da Pearsonov korelacijski koeficijent za pERK u usporedbi sa svakim drugim proteinom raste porastom doze Ex-9. Zanimljivo je statistički značajno smanjenje pERK-a u HPT nakon primjene doze od 60 µg/kg i otvara pitanje djeluje li Ex-9 pri nižim dozama kao agonist GLP-1R ili je takva doza premala da akutno inhibira GLP-1 signalizaciju te dovede do apoptotičkih promjena u neuronima.

Iz tih matrica (Graf 6 a), b), c) i e)) vidljivo je i da korelacija promjene ekspresije pERK i p70S6k sustavno raste s povećanjem doze Ex-9. p70S6k je kinaza ribosomalnog proteina S6 i dio je signalizacijskog puta mTOR. Fosforilacijom ribosomalnog S6 proteina, potiče sintezu proteina i sudjeluje u progresiji staničnog ciklusa, preživljavanju i rastu stanice (Lin i sur., 2003). GLP-1R agonisti aktiviraju mTOR signalizacijski put i time povećavaju ekspresiju p70S6k. To u konačnici znači smanjenje oštećenja moždanog tkiva, upale, smanjeno nakupljanje nepravilno smotanih proteina i sprečavanje nastanka neurodegenerativnih promjena (Rowlands i sur., 2018). Međutim, postoje dokazi da se hiperaktivacijom mTOR signalizacijskog puta (a time i hiperaktivacijom p70S6k), narušava homeostaza sinteze proteina i potiče neurodegeneracija (An i sur., 2003, Tramutola i sur., 2015; Yates i sur., 2013). Sukladno tome, iz ovdje prezentiranih rezultata je vidljivo da su doze Ex-9 od 85 µg/kg i 125 µg/kg značajno povećale ekspresiju p70S6k u HPC, dok je u HPT povećanje ekspresije p70S6k uzrokovala samo doza od 85 µg/kg. Zanimljivo je da se i u ovom slučaju može povući paralela s matricama korelacije pa se može iščitati na Slici 1 a), c) i e) da u HPC korelacija između promjene ekspresije pERK i p70S6k konzistentno raste, upućujući i na taj način na ulogu ova dva proteina u poticanju apoptoze neurona. Ta povezanost pERK i p70S6k vidljiva je na Grafu 7 (desno) koji prikazuje da upravo ta dva proteina najviše doprinose prvoj dimenziji u FAMD analizi HPC. Iz mape prikazane na Grafu 7 (lijevo) vidljivo je i da se *cluster* uzoraka iz skupine GLP-1 125 jasno razdvaja od ostalih *cluster*a po toj prvoj dimenziji, što dodatno potvrđuje ulogu pERK i p70S6k u apoptozi neurona.

PDK1 je protein iz PI3k/Akt signalizacijskog puta koji uključuje i p70S6k. Uključen je u regulaciju procesa proliferacije, diferencijacije i apoptoze (Belham i sur., 1999; Williams i sur., 2000). Povezanost PDK1 i p70S6k u prikazanim se rezultatima slikovito vidi u HPT gdje su doze od 60 $\mu\text{g/kg}$ i 125 $\mu\text{g/kg}$ smanjile ekspresiju PDK1 i p70S6k, dok je doza od 85 $\mu\text{g/kg}$ povećala ekspresiju oba proteina (Graf 5). U HPC se ekspresija PDK1 konzistentno smanjuje povećanjem doze (Graf 5). Uloga PDK1 u neuroprotekciji i regulaciji metabolizma još uvijek nije potpuno jasna. Postoje dokazi da smanjenje ekspresije PDK1 potiče razvoj neurodegenerativnih bolesti (Liu i sur., 2011; Xu i sur., 2017), što bi davalo objašnjenje za ovdje prezentirane rezultate u HPC. Međutim, i pojačana ekspresija PDK1 je u nekim istraživanjima dovedena u vezu s patofiziologijom neurodegenerativnih bolesti (Pietri i sur., 2013; Yang i sur., 2018), što pak potencijalno objašnjava rezultate u HPT. Budući da je promjena ekspresije PDK1 i p70S6k pozitivno korelirana u HPT, što je za očekivati budući da su dio istog signalizacijskog puta (Rowlands, 2018), postoji mogućnost da doza od 85 $\mu\text{g/kg}$ u HPT djeluje agonistički, a u HPC antagonistički. Za jasnije objašnjenje zašto se promjena ekspresije PDK1 u prikazanim rezultatima razlikuje u HPC u odnosu na HPT, potrebno je provesti dodatna istraživanja.

Na prikazu matrica korelacije promjena ekspresije proteina u HPC (Graf 6 a), c), e)), trokutom su označeni dijelovi matrice koji kroz sve tri doze Ex-9 pokazuju konzistentnu korelaciju. Činjenica da je promjena ekspresije 4 različita proteina (c-fosa, IR-a, pERK-a i p70S6k) konzistentno korelirana kroz sve tri doze, znatno doprinosi statističkoj značajnosti rezultata za HPC. Taj trokut govori i da su upravo ta 4 proteina dobri prediktori promjena koje se događaju u HPC, odnosno da se na temelju promjene jednog od njih može iz korelacija zaključiti kako će se promijeniti ostali. Posebno je zanimljiv konzistentan trend promjene faktora korelacije iz doze u dozu (korelacijski koeficijenti ili uzastopno rastu prema većoj dozi ili se uzastopno smanjuju, ovisno o proteinu). S druge strane, iz Slike 1 b), c), d) vidljivo je da je PDK1 dobar prediktor promjena u HPT.

Zbog uvjerljive konzistentnosti u matricama korelacije promjena ekspresije c-fosa, IR-a i pERK-a (Graf 6 a), c), e)) i dodatnog dokaza njihove povezanosti iz FAMD analize glavnih dimenzija (Graf 7 desno), bilo bi zanimljivo pogledati kako izgleda dinamički prikaz tih promjena u ovisnosti o dozi Ex-9. U svrhu toga izrađene su 3D matrice koje prikazuju diferencijalnu analizu korelacija ekspresije tih proteina za svaku dozu Ex-9 u odnosu na kontrolu. Iz Grafa 9, na kojoj je za svaku dozu prikazana promjena ekspresije ukupnih proteina

u odnosu na kontrolu, vidi se da i u HPC i u HPT postoji određeni trend porasta promjene ekspresije pERK-a prema višim dozama (pa su zelene točke i četverokuti grupirani u gornjem dijelu grafa). Vidljivo je također i da točke koje opisuju promjene u HPC povećanjem doze teže prema središtu grafa, u kojem je promjena ekspresije sva tri proteina najveća i vidljiva je najveća korelacija među proteinima. Na Grafu 11, koji prikazuje korelacije promjena ekspresije pERK, c-fos i IR, vidljivo je da i u HPT-u postoji određena konzistentnost u promjenama ekspresije ta tri proteina s porastom doze, budući da su točke formirane u *clustere*. S obzirom na šumovite podatke kod HPT i odstupanja, statistička analiza te regije znatno je teža i onemogućava izvlačenje statistički poduprtih zaključaka ili objašnjenja. Ključan problem je, čini se, mali broj uzoraka, posebice za dozu od 125 µg/kg i nedostatak dodatne, još veće doze Ex-9 koja bi potencijalno nudila objašnjenja za znatno odstupanje rezultata kod doze od 125 µg/kg u HPT.

Iz Grafa 10, koji prikazuje izdvojene točke koje opisuju promjene kod svih doza u HPC u odnosu na kontrolu, vidi se opet da korelacija pERK-a s c-fosom i IR-om raste prema višim dozama (pa su točke smještene najviše), ali i da su točke za pojedinu dozu skupljene u *cluster-e*, što znači da su rezultati konzistentni i statistički značajni.

6. ZAKLJUČAK

Icv primjena Ex-9:

- 1) akutno smanjuje neuronsku aktivnost u HPC i HPT mozga štakora 20 minuta nakon tretmana, što je vidljivo kao smanjenje ekspresije c-fosa povećanjem doze Ex-9. Najveće sniženje u HPC je uzrokovalo doza Ex-9 od 85 µg/kg, a u HPT doza Ex-9 od 125 µg/kg.
- 2) akutno smanjuje metaboličku aktivnost u HPC i HPT mozga štakora 20 minuta nakon tretmana, što je vidljivo kao smanjenje ekspresije IR-a. Najveće sniženje u obje regije uzrokovalo je doza od 85 µg/kg.
- 3) akutno potiče apoptozu stanica u HPC i HPT mozga štakora 20 minuta nakon tretmana, što je vidljivo kao povećanje ekspresije pERK i p70S6k. Najveće sniženje ekspresije pERK u obje regije uzrokovalo je doza od 125 µg/kg, dok je najveće sniženje ekspresije p70S6k u obje regije uzrokovalo doza od 85 µg/kg.
- 4) dovodi do konzistentnog smanjenja ekspresije PDK1 u HPC i HPT štakora s porastom doze Ex-9, što upućuje na pojačanu apoptozu stanica. No potrebna su dodatna istraživanja za objašnjenje porasta ekspresije PDK1 u HPT mozga štakora nakon primjene doze od 85 µg/kg Ex-9.

Promjena ekspresije c-fos, IR i pERK konzistentno je pozitivno korelirana u HPC nakon primjene svih doza Ex-9 u odnosu na kontrolnu skupinu, što potvrđuje hipotezu da icv primjena Ex-9 smanjuje neuroprotektivno djelovanje GLP-1 proteina i metaboličku aktivnost neurona u HPC štakora, porastom doze Ex-9.

Razlike u promjenama ekspresije proteina u HPC u odnosu na HPT potencijalno su posljedica regionalne specifičnosti GLP-1 signalizacije. Potrebna su dodatna istraživanja kako bismo bolje objasnili primijećena odstupanja.

Intracerebroventrikularna (icv) primjena antagonista GLP-1R, eksendina 9 (Ex-9) smanjuje neuroprotektivno djelovanje GLP-1 proteina i metaboličku aktivnost neurona u HPT i HPC štakora, ovisno o dozi.

7. LITERATURA

An WL, Cowburn RF, Li L, Braak H, Alafuzoff I, Iqbal K, Iqbal IG, Winblad B, Pei JJ. Up-regulation of phosphorylated/activated p70 S6 kinase and its relationship to neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, 2003, 163(2), 591-607.

Baraboi ED, St-Pierre DH, Shooner J, Timofeeva E, Richard D. Brain activation following peripheral administration of the GLP-1 receptor agonist exendin-4. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2011, 301(4), 1011-1024.

Belham C, Wu S, Avruch J. Intracellular signalling: PDK1--a kinase at the hub of things. *Curr Biol*, 1999, 9(3), 93-96.

Bell MC, Meier SE, Ingram AL, Abisambra JF. PERK-Opathies: An Endoplasmic Reticulum Stress Mechanism Underlying Neurodegeneration. *Curr Alzheimer Res*, 2016, 13(2), 150-163.

Berrera JG, D'Alessio DA, Drucker DJ, Woods SC, Seeley RJ. Differences in the Central Anorectic Effects of Glucagon-Like Peptide-1 and Exendin-4 in Rats. *Diabetes*, 2009, 58(12), 2820-2827.

Bomfim TR, Forny-Germano L, Sathler LB, Brito-Moreira J, Houzel JC, Decker H, Silverman MA, Kazi H, Melo HM, McClean PL, Hölscher C, Arnold SE, Talbot K, Klein WL, Munoz DP, Ferreira ST, De Felice FG. An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease-associated A β oligomers. *J Clin Invest*, 2012, 122(4), 1339-1353.

Caporarello N, Parrino C, Trischitta V, Frittitta V. Insulin receptor signaling and glucagon-like peptide 1 effects on pancreatic beta cells. *PLOS One*, 2017, 12(8), doi:10.1371/journal.pone.0181190.

Chan SW, Lu Z, Lin G, Tai Wai Yew D, Kong Yeung C, Rudd JA. The differential antiemetic properties of GLP-1 receptor antagonist, exendin (9-39) in *Suncus murinus* (house musk shrew). *Neuropharm*, 2014, 83, 71-80.

Chen S, Liu A, An F, Yao W, Gao X. Amelioration of neurodegenerative changes in cellular and rat models of diabetes-related Alzheimer's disease by exendin-4. *Age (Dordr)*, 2012, 34(5), 1211-1224.

Corbett BF, You JC, Zhang X, Pyfer MS, Tosi U, Iascone DM, Petrof I, Hazra A, Fu CH, Stephens GS, Ashok AA, Aschmies S, Zhao L, Nestler EJ, Chin J. Δ FosB regulates gene expression and cognitive dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Cell Rep*, 2017, 20(2), 344-355.

Deacon CF. Circulation and degradation of GIP and GLP-1. *Horm Metab Res*, 2004, 36(11-12), 761-765.

During MJ, Cao L, Zuzga DS, Francis JS, Fitzsimons HL, Jiao X, Bland RJ, Klugmann M, Banks WA, Drucker dj, Haile CN. Glucagon-like peptide-1 receptor is involved in learning and neuroprotection. *Nat Med*, 2003, 9(9), 1173-1179.

Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses, 2016., <http://www.rpkgs.datanovia.com>, pristupljeno 24.8.2020.

FAMD - Factor Analysis of Mixed Data in R: Essentials, 2016., <http://www.sthda.com>, pristupljeno 24.8.2020.

Gallo FT, Kathe C, Morici JF, Medina JH, Weisstaub NV. Immediate Early Genes, Memory and Psychiatric Disorders: Focus on c-Fos, Egr1 and Arc. *Front Behav Neurosci*, 2018, 12(79), doi:10.3389/fnbeh.2018.00079.

Gejl M, Gjedde A, Egefjord L, Møller A, Hansen SB, Vang K, Rodell A, Brændgaard H, Gottrup H, Schacht A, Møller N, Brock B, Rungby J. In Alzheimer's Disease, 6-Month Treatment with GLP-1 Analog Prevents Decline of Brain Glucose Metabolism: Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Clinical Trial. *Front Aging Neurosci*, 2016, 8(108) doi:10.3389/fnagi.2016.00108.

ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis, 2016., <http://www.cran.r-project.org>, pristupljeno 24.8.2020.

GLP-1 Receptor Agonists, 2019., <https://www.alzdiscovery.org>, pristupljeno 21.03.2021.

Hansen HH, Fabricius K, Barkholt P, Niehoff ML, Morley JE, Jelsing J, Pyke C, Knudsen LB, Farr SA, Vrang N. The GLP-1 Receptor Agonist Liraglutide Improves Memory Function and Increases Hippocampal CA1 Neuronal Numbers in a Senescence-Accelerated Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Alzh Dis*, 2015, 46, 877-888.

Herrera DG, Robertson HA. Activation of *c-fos* in the brain. *Prog Neurobiol*, 1996, 50, 83-107.

Hinnen D. Glucagon-Like Peptide 1 Receptor Agonists for Type 2 Diabetes. *Diabetes Spectr*, 2017, 30(3), 202-210.

Hoffman GE, Smith MS, Verbalis JG. c-Fos and Related Immediate Early Gene Products as Markers of Activity in Neuroendocrine Systems. *Front Endocrinol*, 1993, 14(3), 173-213.

Hoyer S. Glucose metabolism and insulin receptor signal transduction in Alzheimer disease. *Eur J Pharmacol*, 2004, 490(1-3), 115-125.

Hölscher C. The Role of GLP-1 in Neuronal Activity and Neurodegeneration. *Vitam Horm*, 2010, 84, 331-354.

Hölscher C. Potential Role of Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) in Neuroprotection. *CNS Drugs*, 2012, 26, 871-882.

Hölscher C. Central effects of GLP-1: new opportunities for treatments of neurodegenerative diseases. *J Endocrinol*, 2014, 221(1), 31-41.

Kelly P, McClean PL, Ackermann M, Konerding MA, Hölscher C, Mitchell CA. Restoration of cerebral and systemic microvascular architecture in APP/PS1 transgenic mice following treatment with Liraglutide™. *Microcirculation*, 2015, 22(2), 133-145.

Lin An W, Cowburn RF, Li L, Braak H, Alafuzoff I, Iqbal K, Iqbal IG, Winblad B, Pei JJ. Up-Regulation of Phosphorylated/Activated p70 S6 Kinase and Its Relationship to Neurofibrillary Pathology in Alzheimer's Disease. *Am J Pathol*, 2003, 163(2), 591-607.

Liu Y, Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX. Deficient brain insulin signalling pathway in Alzheimer's disease and diabetes. *J Pathol*, 2011, 225(1), 54-62.

Liu Z, Zhao N, Guan G, Wang J. Protein kinase R-like ER kinase and its role in endoplasmic reticulum stress-decided cell fate. *Cell Death Dis*, 2015, 6(7):e1822.

Long-Smith CM, Manning S, McClean PL, Coakley MF, O'Halloran DJ, Hölscher C, O'Neill C. The diabetes drug liraglutide ameliorates aberrant insulin receptor localisation and signalling in parallel with decreasing both amyloid- β plaque and glial pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nuromolecular Med*, 2013, 15(1), 102-114.

McClean PL, Hölscher C. Liraglutide can reverse memory impairment, synaptic loss and reduce plaque load in aged APP/PS1 mice, a model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, 2012, 76, 57-67.

Mossello E, Ballini E, Boncinelli M, et al. Glucagon-like peptide-1, diabetes, and cognitive decline: possible pathophysiological links and therapeutic opportunities. *Exp Diabetes Res*, 2011, 2011:281674.

Multivariate Exploratory Data Analysis and Data Mining, 2008., <http://www.factominer.free.fr.>, pristupljeno 24.8.2020.

Noble EP, Wurtman RJ, Axelrod J. A simple and rapid method for injecting H³-norepinephrine into the lateral ventricle of the rat brain. *Life Sci*, 1967, 6(3), 281–291.

Park SA. A Common Pathogenic Mechanism Linking Type-2 Diabetes and Alzheimer's Disease: Evidence from Animal Models. *J Clin Neurol*, 2011, 7, 10-18.

Pietri M, Dakowski C, Hannaoui S, Alleaume-Butaux A, Hernandez-Rapp J, Ragagnin A, Mouillet-Richard S, Haik S, Bailly Y, Peyrin JM, Launay JM, Kellermann O, Schneider B. PDK1 decreases TACE-mediated α -secretase activity and promotes disease progression in prion and Alzheimer's diseases. *Nat Med*, 2013, 19(9), 1124-1131.

Rowlands J, Heng J, Newsholme P, Carlessi R. Pleiotropic Effects of GLP-1 and Analogs on Cell Signaling, Metabolism, and Function. *Front Endocrinol*, 2018, 9: 672. doi:10.3389/fendo.2018.00672.

R package "corrplot": Visualization of a Correlation Matrix (Version 0.84), 2020., <http://www.cran.r-project.org>, pristupljeno 25.8.2020.

Sathananthan M, Farrugia LP, Miles JM, Piccinni F, Man CD, Zinsmeister AR, Cobelli C, Rizza RA, Vella A. Direct effects of exendin-(9,39) and GLP-1-(9,36)amide on insulin action, β -cell function, and glucose metabolism in nondiabetic subjects. *Diabetes*, 2013, 62(8), 2752-2756.

Simsir IY, Soyaltin UE, Cetinkalp S. Glucagon like peptide-1 (GLP-1) likes Alzheimer's disease. *Diab Met Syndr*, 2018, 12(3), 469-475.

Talbot K. Brain insulin resistance in Alzheimer's disease and its potential treatment with GLP-1 analogs. *Neurodegen Dis Manage*, 2014, 4(1), 31-40.

Tramutola A, Triplett JC, Di Domenico F, Niedowicz DM, Murphy MP, Coccia R, Perluigi M, Butterfield DA. Alteration of mTOR signaling occurs early in the progression of Alzheimer disease (AD): analysis of brain from subjects with pre-clinical AD, amnesic mild cognitive impairment and late-stage AD. *J Neurochem*, 2015, 133(5), 739-749.

Tramutola A, Arena A, Cini C, Butterfield DA, Barone E. Modulation of GLP-1 signaling as a novel therapeutic approach in the treatment of Alzheimer's disease pathology. *Expert Rev Neurother*, 2017, 17, 59-75.

Williams MR, Arthur JS, Balendran A, van der Kaay J, Poli V, Cohen P, Alessi DR. The role of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 in activating AGC kinases defined in embryonic stem cells. *Curr Biol*, 2000, 10(8), 439-448.

Wilson Y, Nag N, Davern P, Oldfield BJ, McKinley MJ, Greferath U, Muprhy M. Visualization of functionally activated circuitry in the brain. *PNAS*, 2002; 99(5), 3252-3257.

Xu C, Yu L, Hou J, Jackson RJ, Wang H, Huang C, Liu T, Wang Q, Zou X, Morris RG, Spires-

Jones TL, Yang Z, Yin Z, Xu Y, Chen G. Conditional Deletion of PDK1 in the Forebrain Causes Neuron Loss and Increased Apoptosis during Cortical Development. *Front Cell Neurosci*, 2017, 11: 303. doi: 10.3389/fncel.2017.00330.

Xu W, Yang Y, Yuan G, Zhu W, Ma D, Hu S. Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, reduces Alzheimer disease-associated tau hyperphosphorylation in the hippocampus of rats with type 2 diabetes. *J Investig Med*, 2015, 63(2), 267-272.

Xu WL, von Strauss E, Qiu CX, Winblad B, Fratiglioni L. Uncontrolled diabetes increases the risk of Alzheimer's disease: a population-based cohort study. *Diabetologia*, 2009, 52, 1031-1039.

Yang S, Pascual-Guiral S, Ponce R, Giménez-Llort L, Baltrons MA, Arancio O, Palacio JR, Clos VM, Yuste VJ, Bayascas JR. Reducing the Levels of Akt Activation by PDK1 Knock-in Mutation Protects Neuronal Cultures against Synthetic Amyloid-Beta Peptides. *Front Aging Neurosci*, 2018, 9: 435, doi:10.3389/fnagi.2017.00435.

Yates SC, Zafar A, Hubbard P, Nagy S, Durant S, Bicknell R, Wilcock G, Christie S, Esiri MM, Smith AD, Nagy Z. Dysfunction of the mTOR pathway is a risk factor for Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun*, 2013, 1(3), doi:10.1186/2051-5960-1-3.

8. SAŽETAK/SUMMARY

Sve veći broj istraživanja potvrđuje neuroprotektivno djelovanje GLP-1 i njegovih analoga aktivacijom GLP-1 receptora (GLP-1R) u središnjem živčanom sustavu. Iako je takvo djelovanje potencijalno značajno za terapiju neurodegenerativnih bolesti, točan mehanizam i signalizacija GLP-1R u mozgu još uvijek nisu u potpunosti istraženi. U ovom istraživanju, ispitane su akutne promjene u ekspresiji markera neuronske aktivnosti (c-fosa), metaboličke aktivnosti (inzulinskog receptora, IR) i apoptoze (pERK, p70S6k, PDK1) u hipokampusu (HPC) i hipotalamusu (HPT) zdravih štakora, nakon intracerebroventrikularne (icv) primjene različitih doza antagonista GLP-1 receptora, eksendina 9 (Ex-9). Rezultati su analizirani faktorskom analizom mješovitih podataka i prikazani kao apsolutne promjene u ekspresiji pojedinog proteina te su izrađene matrice korelacije promjena u ekspresiji proteina svake skupine u odnosu na kontrolu. Napravljena je 3D vizualizacija kao dinamički prikaz promjena u ekspresiji proteina kod različitih doza u odnosu na kontrolu. Rezultati pokazuju pad neuronske i metaboličke aktivnosti, a porast apoptoze u HPC i HPT, povećanjem doze Ex-9. Primijećena je konzistencija u biokemijskim promjenama unutar svake regije zasebno, ali i razlike u promjenama koje se događaju u jednoj regiji u odnosu na drugu. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se bolje objasnile razlike u biokemijskim promjena koje se događaju u HPC u odnosu na HPT.

Ključne riječi: GLP-1, GLP-1 receptor, eksendin 9, neurodegenerativne bolesti, neuroprotektivno djelovanje

SUMMARY

Increasing numbers of research confirm the neuroprotective effects of GLP-1 through the activation of GLP-1 receptors (GLP-1R) in the central nervous system. Although the effects of GLP-1 could prove significant in treatment of neuro-degenerative diseases, the exact mechanism and signalization of GLP-1R in the brain have not been completely uncovered. This research tests the acute changes in marker expressions of neural activity (c-fos) along with metabolic activities (insulin receptor, IR) and apoptosis (pERK, p70S6k, PDK1) inside the hippocampus (HPC) and hypothalamus (HPT) regions of healthy rat brains after the intracerebroventricular (icv) administration of various doses containing antagonists of the GLP-1 receptor, exendin 9 (Ex-9). Factor analysis of mixed data and correlation matrix were made and the results are shown as absolute changes in protein expression. The 3D visualization has been constructed as a dynamic display of changes in protein expression after the administration of various doses of Ex-9. Our results show a decrease of neural and metabolic activity along with an increase of apoptosis inside the HPC and HPT with the increase of Ex-9. A consistency of biochemical changes through every individual region has been noted along with the difference of changes present in one region in relation to the other region. Further research would be necessary to better explain the differences in biochemical changes present in the HPC compared to the HPT.

Key words: GLP-1, GLP-1 receptor, exendin 9, neurodegenerative diseases, neuroprotective action

9. PRILOZI

KRATICE

AC - adenilat ciklaza

AMP - adenzin monofosfat

ATP - adenzin trifosfat

AMPK - AMP-om aktivirana protein kinaza (eng. *AMP activated protein kinase*)

cAMP - ciklički adenzin monofosfat (eng. *cyclic adenosine monophosphate*)

CSF – cerebrospinalna tekućina (eng. *cerebrospinal fluid*)

DMT2 – šećerna bolest tip II (ŠBT2) (eng. *Diabetes mellitus type 2*)

DPPIV - dipeptidil peptidaza IV

Epac2 - eng. *exchange protein directly activated by cAMP*

Ex-9 – eksendin-9

FAMD - faktorske analize za mješovite tipove podataka (eng. *factor analysis of mixed data*)

GLP-1 – glukagonu sličan peptid-1 (eng. *glucagon like peptide-1*)

GLP-1R – receptor za GLP-1

GSK3 – glikogen sintaza kinaza 3

HPC - hipokampus

HPT - hipotalamus

IEG - neposredni rani geni (eng. *immediate early genes*)

IR – inzulinski receptor

MAPK - mitogenom aktivirana protein kinaza

MCA - višestruku analizu korespondencije (eng. *multiple correspondence analysis*)

PCA - analiza glavnih komponentata (eng. *principal components analysis*)

PDK1- o fosfoinozitudu ovisna protein kinaza 1 (eng. *phosphoinositide-dependent protein kinase*)

pERK- fosforilirana kinaza regulirana izvanstaničnim signalima (eng. *phosphorylated extracellular signal-regulated kinase*)

PK – protein kinaza (**PKA** – protein kinaza A, **PKB** – protein kinaza B, **PKC** - protein kinaza C)

p70S6k - 70 kDa ribosomalna protein S6 kinaza (eng. *70-kDa ribosomal protein S6 kinase*)

tERK - ukupna kinaza regulirana izvanstaničnim signalima (eng. *total extracellular signal-regulated kinase*)

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za Farmakologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

UČINAK ANTAGONISTA RECEPTORA GLUKAGONU SLIČNOG PEPTIDA-1 NA BIOKEMIJSKE PROMJENE U MOZGU ŠTAKORA

Desika Kolarić

SAŽETAK

Sve veći broj istraživanja potvrđuje neuroprotektivno djelovanje GLP-1 i njegovih analoga aktivacijom GLP-1 receptora (GLP-1R) u središnjem živčanom sustavu. Iako je takvo djelovanje potencijalno značajno za terapiju neurodegenerativnih bolesti, točan mehanizam i signalizacija GLP-1R u mozgu još uvijek nisu u potpunosti istraženi. U ovom istraživanju, ispitane su akutne promjene u ekspresiji markera neuronske aktivnosti (c-fosa), metaboličke aktivnosti (inzulinskog receptora, IR) i apoptoze (pERK, p70S6k, PDK1) u hipokampusu (HPC) i hipotalamusu (HPT) mozga zdravih štakora, nakon intracerebroventrikularne (icv) primjene različitih doza antagonist GLP-1 receptora, eksendina 9 (Ex-9). Rezultati su analizirani faktorskom analizom mješovitih podataka i prikazani kao apsolutne promjene u ekspresiji pojedinog proteina te su izrađene matrice korelacije promjena u ekspresiji proteina svake skupine u odnosu na kontrolu. Napravljena je 3D vizualizacija kao dinamički prikaz promjena u ekspresiji proteina kod različitih doza u odnosu na kontrolu. Naši rezultati pokazuju pad neuronske i metaboličke aktivnosti, a porast apoptoze u HPC i HPT, povećanjem doze Ex-9. Primijećena je konzistencija u biokemijskim promjenama unutar svake regije zasebno, ali i razlike u promjenama koje se događaju u jednoj regiji u odnosu na drugu. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se bolje objasnile razlike u biokemijskim promjenama koje se događaju u HPC u odnosu na HPT.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 37 stranica, 11 grafičkih prikaza i 49 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: GLP-1, GLP-1 receptor, eksendin 9, neurodegenerativne bolesti, neuroprotektivno djelovanje

Mentorice: **Dr. sc. Jelena Osmanović Barilar**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Medicinskog fakulteta.*
Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Maja Ortner Hadžiabdić, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Jelena Osmanović Barilar, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Medicinskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: travanj 2021.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmacology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

DOSE-DEPENDENT EFFECTS OF GLUCAGON-LIKE PEPTIDE-1 RECEPTOR INHIBITOR ON THE SIGNALING PATHWAYS IN THE RAT BRAIN

Desika Kolarić

SUMMARY

Increasing numbers of research confirm the neuroprotective effects of GLP-1 through the activation of GLP-1 receptors (GLP-1R) in the central nervous system. Although the effects of GLP-1 could prove significant in treatment of neuro-degenerative diseases, the exact mechanism and signalization of GLP-1R in the brain have not been completely uncovered. This research tests the acute changes in marker expressions of neural activity (c-fos) along with metabolic activities (insulin receptor, IR) and apoptosis (pERK, p70S6k, PDK1) inside the hippocampus (HPC) and hypothalamus (HPT) regions of healthy rat brains after the intracerebroventricular (icv) administration of various doses containing antagonists of the GLP-1 receptor, exendin 9 (Ex-9). Factor analysis of mixed data and correlation matrix were made and the results are shown as absolute changes in protein expression. The 3D visualization has been constructed as a dynamic display of changes in protein expression after the administration of various doses of Ex-9. Our results show a decrease of neural and metabolic activity along with an increase of apoptosis inside the HPC and HPT with the increase of Ex-9. A consistency of biochemical changes through every individual region has been noted along with the difference of changes present in one region in relation to the other region. Further research would be necessary to better explain the differences in biochemical changes present in the HPC compared to the HPT.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 37 pages, 11 figures and 49 references. Original is in Croatian language.

Keywords: GLP-1, GLP-1 receptor, exendin 9, neurodegenerative diseases, neuroprotective action

Mentors: **Jelena Osmanović Barilar, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb School of Medicine.
Lidija Bach-Rojecky, Ph.D., *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Reviewers: **Lidija Bach-Rojecky, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.
Maja Ortner Hadžiabdić, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Jelena Osmanović Barilar, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb School of Medicine.

The thesis was accepted: April 2021.