

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Ivan V. Zaletel

**ISPITIVANJE POREMEĆAJA
NEUROGENEZE U SUBGRANULARNOJ
ZONI HIPOKAMPUSA NA MIŠJEM
MODELU ALCHAJMEROVE BOLESTI**

Doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF MEDICINE

Ivan V. Zaletel

**ANALYSIS OF NEUROGENESIS
ALTERATIONS IN THE SUBGRANULAR
ZONE OF THE HIPPOCAMPUS IN A
MOUSE MODEL OF ALZHEIMER'S
DISEASE**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2019

Mentor:

dr Nela Puškaš, vanredni profesor

Institut za histologiju i embriologiju „Aleksandar Đ. Kostić”, Medicinski fakultet,
Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

dr Milica Labudović Borović, vanredni profesor

Institut za histologiju i embriologiju „Aleksandar Đ. Kostić”, Medicinski fakultet,
Univerzitet u Beogradu

dr Miloš Bajčetić, docent

Institut za histologiju i embriologiju „Aleksandar Đ. Kostić”, Medicinski fakultet,
Univerzitet u Beogradu

dr Emilija Manojlović Gačić, docent

Institut za patologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Marija Švirtlih, viši naučni saradnik

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

dr Ivan Čapo, docent

Zavod za histologiju i embriologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Datum odbrane:

Zahvalnica

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je na Institutu za histologiju i embriologiju „Aleksandar Đ. Kostić” Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Odeljenju za neurobiologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” Univerziteta u Beogradu, Laboratoriji za humanu molekularnu genetiku Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu i Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Ova disertacija je plod uspešne saradnje velikog broja istraživača zaposlenih na pomenutim Institutima, a kojima dugujem veliku zahvalnost na pomoći u eksperimentalnom radu, pisanju i oblikovanju doktorske disertacije. Među njima posebnu zahvalnost dugujem dr Mariji Švrtlih i dr Milki Perović na velikom trudu i posvećenosti prilikom izrade disertacije. Takođe, naročitu zahvalnost dugujem prof. dr Milici Labudović Borović na prijateljskoj podršci i pomoći u sprovođenju ovog istraživanja.

Zahvaljujem se svim članovima komisije na korisnim savetima i sugestijama koje su mi pružili za vreme izrade i pisanja ove disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorki prof. dr Neli Puškaš na strpljenju kojem me je učila, na neposrednoj i nesebičnoj podršci koju mi je pružala tokom svih ovih godina zajedničke i uspešne saradnje, kao i na iskrenom prijateljstvu koje je iz te saradnje proisteklo.

Neizmernu zahvalnost dugujem svojoj majci Vesni, baki Nadi i deki Ivanu koji su me podržavali, bodrili i motivisali tokom čitavog školovanja. Hvala vam na bezgraničnoj podršci, ljubavi i veri.

Najveću zahvalnost dugujem mojoj Jovani koja je uvek bila i koja će uvek biti uz mene i pružati mi безусловnu podršku, razumevanje i ljubav.

Hana i ti ste svemu ovome dale smisao.

Posvećeno mojoj porodici

ISPITIVANJE POREMEĆAJA NEUROGENEZE U SUBGRANULARNOJ ZONI HIPOKAMPUSA NA MIŠJEM MODELU ALCHAJMEROVE BOLESTI

Sažetak

Alchajmerova bolest je progresivno neurodegenerativno oboljenje i najčešći uzrok demencije kod starijih osoba, sa prevalencom dva puta većom u ženskoj populaciji. Jedna od struktura koje najranije bivaju zahvaćene patohistološkim promenama u AB je hipokampus, deo limbičkog sistema koji ima važnu ulogu u procesima učenja i formiranja memorije. Nova istraživanja potvrdila su da se i kod ljudi u subgranularnoj zoni hipokampusa aktivno odvija proces neurogeneze u adultnom periodu. Imajući u vidu činjenicu da novostvoreni neuroni imaju ulogu u procesima učenja i pamćenja, odnosno da utiču na oblikovanje kognicije i ponašanje individue, smatra se da se kognitivni deficit i gubitak pamćenja kod neurodegenerativnih oboljenja može delom pripisati poremećenoj neurogenezi na nivou subgranularne zone hipokampusa. Istraživanja procesa i dinamike adultne neurogeneze u hipokampusu životinja ili osoba obolelih od Alchajmerove bolesti su dala kontradiktorne rezultate. U zavisnosti od eksperimentalnih uslova, kao što su životinjski model Alchajmerove bolesti, starost i pol životinje, kao i markeri kojima se analiziraju ćelijski procesi, rezultati su ukazali kako na smanjenje, tako i na nepromenjen ili čak povećan obim neurogeneze kod animalnih modela i kod pacijenata obolelih od Alchajmerove bolesti. Dosadašnja istraživanja ukazuju na važnu ulogu članova SOXB grupe transkripcionih faktora u brojnim ćelijskim procesima uključenim u neurogenezu tokom embrionalnog i adultnog perioda razvoja, kao što su održavanje multipotentnosti, proliferacije i diferencijacije neuralnih matičnih/prekursornih ćelija. Pored SOXB transkripcionih faktora određeni neurotrofički faktori, kao što je neurotrofički faktor poreklom iz mozga (BDNF), utiču na procese proliferacije i diferencijacije neuralnih matičnih/prekursornih ćelija. Međutim, tačna uloga ovih faktora u nastanku različitih neurorazvojnih i neurodegenerativnih poremećaja nije dovoljno razjašnjena. Imajući u vidu navedeno, cilj ove studije bio je da se utvrdi obrazac uzrasno-zavisnih promena u ekspresiji SOXB transkripcionih faktora u okviru procesa adultne neurogeneze kod jedinki muškog i

ženskog pola, kao i da se ispituju promene u ekspresiji SOXB transkripcionih faktora kod 5xFAD mišjeg modela Alchajmerove bolesti oba pola i različite starosti.

Za potrebe ovog istraživanja korišćeni su 5xFAD transgeni miševi i njihove odgovarajuće kontrole, netransgeni miševi. 5xFAD miševi koeksprimiraju pet mutacija koje su karakteristične za familijarni oblik Alchajmerove bolesti. U istraživanje su bila uključena 72 miša različitog genotipa, pola i starosti (6, 8 i 16 nedelja). Nakon žrtvovanja životinja odgovarajućeg uzrasta, hipokampusi su izolovani za potrebe histohemijskih, imunohistohemijskih, kao i analize nivoa proteina različitih markera zrelih neurona, ćelijske proliferacije, neurogeneze, neuralnih matičnih ćelija i sinaptičke plastičnosti (NeuN, Ki-67, PCNA, DCX, SOX1, SOX2, SOX21, BDNF).

Imunohistohemijske analize pokazale su da se ukupan broj granularnih neurona u dentatnom girusu hipokampusa analiziranih životinja ne menja sa starenjem. Takođe, rezultati su pokazali da je proliferativni kapacitet unutar subgranularne zone hipokampusa ujednačen kod jedinki oba genotipa i pola starosti 6 i 8 nedelja dok se kod životinja starosti 16 nedelja detektuje značajan pad. Pokazano je takođe da je kod 5xFAD transgenih mužjaka starih 8 nedelja broj mladih novostvorenih neurona manji nego kod kontrolnih životinja. Promene u broju mladih novostvorenih neurona između transgenih i netransgenih mužjaka, nisu detektovane kod miševa starih 6 i 16 nedelja. Kod jedinki oba pola i genotipa detektovan je značajan pad u broju nezrelih neurona sa starenjem. Polne razlike u morfologiji DCX pozitivnih ćelija, u korist klase I kod mužjaka, a klase II kod ženki detektovane su kod životinja starih 8 nedelja. Ćelije u stadijumu proliferacije bile su imunoreaktivne i na SOX1 i SOX2 transkripcione faktore, dok je u malom broju novoformiranih neurona detektovana ekspresija SOX1 transkripcionog faktora. Broj ćelija koje eksprimiraju SOX1, SOX2 i SOX21 protein značajno se smanjuje kod svih životinja tokom starenja i time prati pad u broju novoformiranih DCX pozitivnih neurona. U okviru ispitivanih članova SOXB familije, pad u broju SOX21 imunohistohemijski obeleženih ćelija subgranularne zone utvrđen je kod transgenih mužjaka starosti 8 i 16 nedelja. Sa druge strane, imunoblot analiza sugerše da je ukupna količina BDNF proteina u hipokampusu bila niža kod transgenih mužjaka starih 6 nedelja u odnosu na njihove netransgene kontrole, dok u ostalim analiziranim grupama nisu uočene promene u nivou BDNF proteina.

Na osnovu rezultata ovih istraživanja izvedeno je nekoliko zaključaka. Proliferativni kapacitet, broj novoformiranih, nezrelih neurona i broj SOX1, SOX2 i SOX21 imunoreaktivnih ćelija u subgranularnoj zoni hipokampusa smanjuje se tokom starenja kako kod netransgenih, tako i kod transgenih jedinki oba pola. Uočene promene ne utiču značajno na ukupan broj granularnih neurona u dentatnom girusu kod ovih životinja. Broj novoformiranih neurona je značajno smanjen kod Tg mužjaka u odnosu na kontrole, dok kod ženki ove promene nisu detektovane uprkos smanjenom broju ćelija koje eksprimiraju SOXB transkripcione faktore. Razlike u morfološkim karakteristikama DCX pozitivnih ćelija uočavaju se između mužjaka i ženki, na osnovu čega se može pretpostaviti da izvesni polno-specifični faktori imaju uticaj kako na sam proces neurogeneze, tako i na kompenzatornu reakciju neurogene niše kojom se sprečava propadanje ili produžava preživljavanje DCX pozitivnih ćelija u subgranularnoj zoni ženki 5xFAD miševa.

Zaključci ovog istraživanja ukazuju na dinamičnost procesa adultne neurogeneze, čime se otvara polje za veliki broj daljih istraživanja u kojima bi se ispitivala ekspresija SOX transkripcionih faktora tokom različitih perioda bolesti, ali i u drugim životinjskim modelima AB. Potrebna su i dodatna istraživanja koja bi ispitala molekularne mehanizme koji utiču na kontrolu SOXB transkripcionih faktora, a samim tim i na ceo proces adultne neurogeneze.

Ključne reči: Familijarna Alchajmerova bolest, 5xFAD miševi, neurogeneza, proliferacija, neuralna diferencijacija, SOXB transkripcioni faktori

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Molekularna medicina

UDK:

ANALYSIS OF NEUROGENESIS ALTERATIONS IN THE SUBGRANULAR ZONE OF THE HIPPOCAMPUS IN A MOUSE MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE

Abstract

Alzheimer's disease is a progressive neurodegenerative disease and the most common cause of dementia in the elderly, with a prevalence of two times higher in the female population. One of the earliest affected structures by pathohistological changes in AD is the hippocampus, a part of the limbic system that plays an important role in the processes of learning and memory formation. New research has confirmed that even in humans the neurogenesis process actively occurs through the adult period in the subgranular zone of the hippocampus. Bearing in mind the fact that newly created neurons play a role in the processes of learning and memory, affecting the cognition and behavior of an individual, cognitive deficit and memory loss in neurodegenerative diseases can be partly attributed to altered neurogenesis at the level of the hippocampal subgranular zone. Analysis of the adult neurogenesis processes in the hippocampus of animals or persons suffering from Alzheimer's disease have resulted in contradictory data. Depending on experimental conditions, such as the Alzheimer's animal model, age and sex, as well as the markers used to analyze the neurogenesis, the results indicated both a decrease, unchanged or even increased levels of neurogenesis both in animal models, and even in patients suffering from Alzheimer's disease in smaller number of studies. Previous results indicate the important role of members of the SOXB group of transcription factors in numerous cellular processes involved in neurogenesis during embryonic and adult developmental periods, such as the maintenance of multipotency, proliferation and differentiation of neural stem/precursor cells. In addition to SOXB transcription factors, certain neurotrophic factors, such as the brain derived neurotrophic factor (BDNF), affect the processes of proliferation and differentiation of neural stem/precursor cells. However, the exact role of these factors in the pathogenesis of various neurodevelopmental and neurodegenerative disorders is not sufficiently clarified. Bearing in mind the above, the aim of this study was to determine the pattern of age-dependent changes in the expression of SOXB transcription factors within the

adult neurogenesis process in male and female individuals and to examine the changes in the expression of SOXB transcription factors in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease of both sexes and different ages.

For the purpose of this study, 5xFAD transgenic mice and their corresponding controls, non-transgenic mice were used. 5xFAD mice coexpress five mutations that are characteristic for familial Alzheimer's disease. 72 mice of different genotypes, sex and age (6, 8 and 16 weeks) were included in the study. After sacrificing the animals at the appropriate age, their hippocampuses were isolated for histochemical, immunohistochemical and protein level analysis of different markers of mature neurons, cell proliferation, neurogenesis, neural stem cells, and synaptic plasticity (NeuN, Ki-67, PCNA, DCX, SOX1, SOX2, SOX21, BDNF).

Immunohistochemical analysis have shown that the total number of granule neurons in the dentate gyrus of the hippocampus does not change with aging, and that the proliferative capacity within the subgranular zone of the hippocampus is uniform in animals of both genotypes, aged 6 and 8 weeks. A significant decline in the proliferative capacity within the hippocampal subgranular zone was seen in animals aged 16 weeks when compared to animals aged 6 and 8 weeks. Also, in 5xFAD transgenic males aged 8 weeks the number of newly created neurons is lower than in control animals of the same age. Changes in the number of newly created neurons between transgenic and non-transgenic males have not been detected in mice aged 6 and 16 weeks. In animals of both genders and genotypes, a significant decrease in the number of immature neurons with aging was detected. Gender differences in the morphology of DCX-positive cells, such as the predominance of class I cells in males, and class II in females were detected in animals aged 8 weeks. Proliferative cells were immunoreactive for both SOX1 and SOX2 transcription factors, while a small number of newly formed neurons were positive for the SOX1 transcription factor. The number of cells expressing SOX1, SOX2, and SOX21 proteins significantly decreases in all animals during aging, and thus follows the decline in the number of newly formed DCX-positive neurons. Within the investigated members of the SOXB family, a decrease in the number of SOX21 immunohistochemically labeled cells in the subgranular zone was detected in transgenic males aged 8 and 16 weeks. On the other hand, the immunoblot analysis

suggested that the total amount of BDNF protein in the hippocampus was significantly lower in transgenic males aged 6 weeks compared to their non-transgenic controls, while in other analyzed groups no changes were observed in the levels of BDNF protein.

Based on the above mentioned results, the following conclusions can be made. The first is that the proliferative capacity, the number of newly formed, immature neurons, and the number of SOX1, SOX2 and SOX21 immunoreactive cells in the hippocampal subgranular zone decrease with aging, and that these changes are present both in non-transgenic and transgenic animals of both genders. The observed changes do not significantly affect the total number of granular neurons in the dentate gyrus. Bearing in mind the fact that the early alteration of neurogenesis occurs only in males, it can also be concluded that in female animals there are no changes in the number of newly formed neurons despite the reduced expression of SOXB transcription factors. The differences are, however, detected in the morphological characteristics of DCX-positive cells between males and females, which suggests that certain gender-specific factors have an impact both on the neurogenesis process itself and on the compensatory reaction of the neurogenic niche which aims to prevent the deterioration or to prolong the survival of DCX-positive cells in subgranular zone of female 5xFAD mice.

The conclusions of this study indicate that the adult neurogenesis process is extremely dynamic and thus present a big unexplored area for a large number of further studies, such as the analysis of the expression of SOX transcription factors in different time periods, but also in other Alzheimer's disease models. Further research is needed to investigate the molecular mechanisms that influence the control of SOXB transcription factors and, consequently, the entire process of adult neurogenesis.

Key words: Familial Alzheimer's disease, 5xFAD mice, neurogenesis, proliferation, neural differentiation, SOXB transcription factors

Scientific field: Medicine

Specific scientific field: Molecular medicine

UDC:

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Alchajmerova bolest	2
1.2. Patogeneza Alchajmerove bolesti	3
1.3. Morfološke promene u Alchajmerovoj bolesti	7
1.4. Animalni modeli Alchajmerove bolesti	13
1.5. Adultna neurogeneza u hipokampusu	16
1.6. Adultna neurogeneza i SoxB geni.....	20
1.7. Čelijska proliferacija, diferencijacija i adultna neurogeneza	21
1.8. Adultna neurogeneza u Alchajmerovoj bolesti	23
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	26
3. MATERIJAL I METODE	28
3.1. Eksperimentalne životinje.....	29
3.2. Eksperimentalne grupe.....	29
3.3. Žrtvovanje životinja	30
3.4. Priprema tkiva za histohemijska i imunohistohemijska bojenja	32
3.5. Histohemijska bojenja.....	32
3.6. Fluorescentna imunohistohemijska bojenja	33
3.7. Imunohistohemijska bojenja	34
3.8. Kvantifikacija imunoreaktivnih ćelija.....	35
3.9. Imunoblot (Western blot) analiza	37
3.10. Statistička analiza	38
4. REZULTATI	39
4.1. Ispitivanje histološke strukture subgranularne zone hipokampusa kod 5xFAD miševa..	40
4.2. Detekcija amiloidnih plakova u hipokampusu 5xFAD miševa	41
4.3. Analiza ukupnog broja granularnih neurona unutar dentatnog girusa hipokampusa.....	45
4.4. Analiza broja Ki-67 imunoreaktivnih ćelija u subgranularnoj zoni hipokampusa.....	49

4.5. Analiza broja DCX imunoreaktivnih ćelija u subgranularnoj zoni hipokampusa.	52
4.6. Imunofluorescentna detekcija ekspresije SOX1 i SOX2 proteina u subgranularnoj zoni hipokampusa	55
4.7. Analiza broja SOX1 imunoreaktivnih ćelija u subgranularnoj zoni hipokampusa.....	58
4.8. Analiza broja SOX2 imunoreaktivnih ćelija u subgranularnoj zoni hipokampusa.....	60
4.9. Analiza broja SOX21 imunoreaktivnih ćelija u subgranularnoj zoni hipokampusa.....	62
4.10. Poređenje broja granularnih neurona između životinja različite starosti	64
4.11. Poređenje broja Ki-67 imunoreaktivnih ćelija između životinja različite starosti	65
4.12. Poređenje broja DCX imunoreaktivnih ćelija između životinja različite starosti	67
4.13. Poređenje broja SOX1 imunoreaktivnih ćelija između životinja različite starosti	69
4.14. Poređenje broja SOX2 imunoreaktivnih ćelija između životinja različite starosti	71
4.15. Poređenje broja SOX21 imunoreaktivnih ćelija između životinja različite starosti	73
4.16. Imunoblot analiza BDNF proteina.....	75
5. DISKUSIJA	76
6. ZAKLJUČCI	90
7. LITERATURA	93

1. UVOD

1.1. Alchajmerova bolest

Alzhajmerova bolest (AB) je najčešće neurodegenerativno oboljenje na svetu i najčešći uzrok demencije kod starih osoba. Prema zvaničnim podacima iz 2015. godine, od nekog oblika demencije bolovalo je 46,8 miliona ljudi širom sveta. Procenjeno je, takođe, da će se ovaj broj obolelih duplirati na skoro svakih 20 godina, tako da se sredinom ovoga veka može očekivati preko 130 miliona ljudi obolelih od demencije (Prince i saradnici, 2016). O značaju ovog oboljenja najbolje govori podatak da se na svakih 66 sekundi u Sjedinjenim Američkim Državama javi jedan novi slučaj AB, pri čemu je broj obolelih u ovoj državi procenjen na preko 5,5 miliona ljudi. Pored medicinskog značaja, ova neizlečiva bolest sa sobom nosi i velike ekonomske troškove. Pretpostavlja se da su u 2018. godini ukupni troškovi prouzrokovani demencijama širom sveta iznosili preko bilion dolara (Wimo i saradnici, 2017). S obzirom na prethodne epidemiološke podatke, jasno je zašto se istraživanja na polju AB odvijaju velikom brzinom i to kako sa kliničkog, tako i sa pretkliničkog, odnosno eksperimentalnog aspekta. Laboratorijska istraživanja imaju ogroman značaj u otkrivanju molekularnih mehanizama uključenih u nastanak AB, s obzirom da se definitivna dijagnoza ovog oboljenja i dalje jedino i isključivo može postaviti postmortalnom patohistološkom analizom tkiva mozga (Castellani i saradnici, 2010).

Promene na ćelijskom i molekularnom nivou odgovorne su za kliničku sliku AB, u kojoj postoje rani (poremećaj pamćenja, apatija i depresija) i kasni simptomi i znaci (dezorijentisanost, poremećaj govora, rasuđivanja, ponašanja, hodanja i gutanja) (Prince i saradnici, 2016). Glavni histopatološki nalaz podrazumeva promene koje se mogu detektovati na mikroskopskom nivou, a to su neurofibrilarne petlje i amiloidni plakovi. Neurofibrilarne petlje predstavljaju abnormalne nakupine patološki fosforilisanog tau proteina unutar citoplazme neurona, dok se senilni plakovi sastoje od ekstracelularno nataloženog amiloidnog beta ($A\beta$) peptida, oko koga se nepravilno grupišu neuriti, odnosno aksoni i dendriti neurona (Perl, 2010). Histološka evaluacija moždanih isečaka i pronalazak ovih karakterističnih morfoloških abnormalnosti je i dalje jedini način za postavljanje definitivne dijagnoze AB.

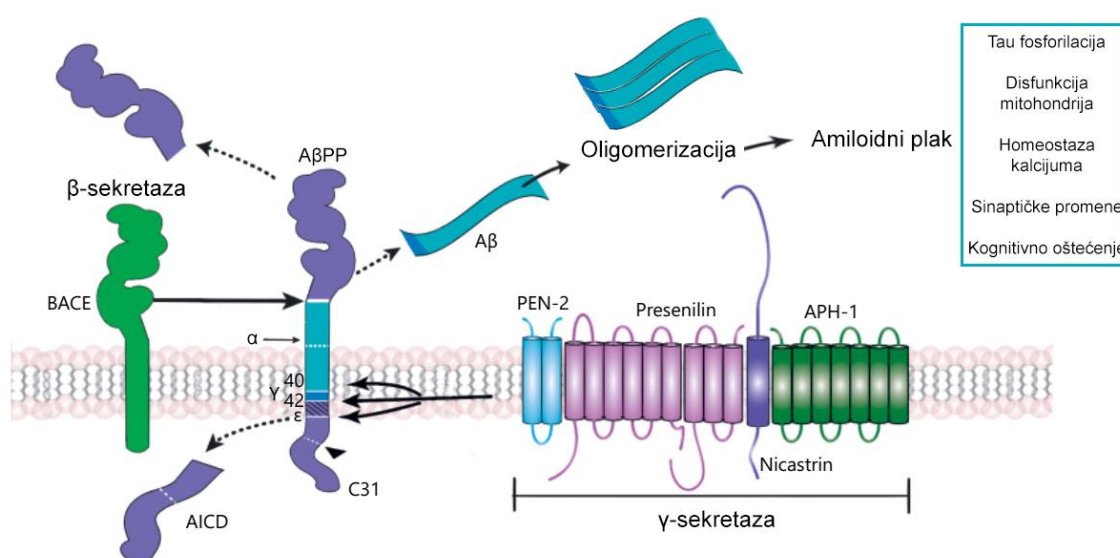
1.2. Patogeneza Alchajmerove bolesti

Iako je AB opisana još 1906. godine od strane Alojza Alchajmera (Maurer i saradnici, 1997), mehanizam nastanka oboljenja, kao i uzroci koji dovode do nastanka ovog najčešćeg tipa demencije i dalje nisu poznati. Brojna otkrića u bazičnim istraživanjima na polju neuronauka, omogućila su istraživačima da steknu bolji uvid u patogenezu AB i da postavljaju brojne hipoteze o načinu nastanka karakterističnih patoloških lezija koje se mogu pronaći u ovom oboljenju. Među najvažnijim hipotezama su holinergička hipoteza i hipoteze koje uzimaju u obzir povezanost oboljenja sa određenim genotipom apolipoproteina E (apoE), hiperfosforilacijom citokseletnih proteina, oksidativnim stresom, poremećajima ćelijskog ciklusa, inflamacijom i abnormalnim metabolizmom A β peptida. Od navedenih hipoteza smatra se da amiloidna hipoteza, tj. nakupljanje senilnih amiloidnih plakova u ekstracelularnom prostoru, predstavlja najvažniji mehanizam koji dovodi do nastanka AB (Dong i saradnici, 2012). Ipak, nijedna od navedenih hipoteza sama po sebi ne može da objasni sve molekularne, patološke i kliničke promene koje se javljaju kod pacijenata obolelih od AB.

Peptid A β nastaje kao produkt proteolitičkog cepanja amiloidnog beta prekursorskog proteina (A β PP; APP). APP je integralni membranski glikoprotein eksprimiran unutar centralnog nervnog sistema, kodiran od strane APP gena na hromozomu 21. Tačna funkcija samog proteina u fiziološkim uslovima i dalje nije u potpunosti poznata. Eksperimentalna istraživanja na ćelijskim kulturama neurona hipokampusa pokazala su da ovaj protein ima važnu ulogu u normalnom formiranju sinapsi (Priller i saradnici, 2006), kao i da se njegova ekspresija povećava u uslovima ćelijskog stresa (Sanabria-Castro i saradnici, 2017). Miševi kod kojih postoji deficit ovog proteina pokazuju poremećaje u funkcionisanju neuromišićnih sinapsi (Wang i saradnici, 2005), dok prekomerna ekspresija ovog proteina povećava sinaptičku plastičnost i prostornu memoriju kod miševa (Dong i saradnici, 2012; Ma i saradnici, 2007).

Proteolitička obrada APP-a može se odigrati na različite načine, dejstvom enzima α -sekretaze, β -sekretaze i γ -sekretaze (Slika 1). Neamiloidni put obrade podrazumeva aktivnost enzima α -sekretaze, koja ne dovodi do produkcije toksičnog A β . Cepanje APP-a pod dejstvom β -sekretaze, a zatim i γ -sekretaze je od patološkog značaja jer dovodi do generisanja A β peptida koji mogu biti različitih dužina, od 38 do 43 amino-

kiseline (Dong i saradnici, 2012). Najzastupljeniji su peptidi od 40 ili 42 amino-kiseline ($A\beta_{40}$ i $A\beta_{42}$), pri čemu $A\beta_{42}$ predstavlja dominantnu i toksičniju formu peptida koja se taloži unutar plakova zbog svoje brže fibrilarizacije i nerastvorljivosti (Serrano-Pozo i saradnici, 2011). Glavna forma β -sekretaze je enzim BACE1 (eng. *beta-site APP cleaving enzyme 1*; enzim 1 koji cepa APP na beta lokaciji) koji cepajući APP formira jednu rastvorljivu varijantu proteina koja se označava kao sAPP, kao i duži fragment pod nazivom C99 (Swerdlow, 2007). Kompleks γ -sekretaze je neophodan za konačno obrazovanje $A\beta$ peptida, a sastavljen je od 4 subjedinice, od kojih poseban značaj imaju proteini presenilin-1 (PSEN1) i presenilin-2 (PSEN2) koji su kodirani od strane *PSEN1* i *PSEN2* gena lociranih na hromozomima 14 i 1.



Slika 1. Proces nastanka toksičnog amiloida beta ($A\beta$) cepanjem amiloidnog-beta prekursorskog proteina. Na slici su prikazane faze u procesu obrade $A\beta$ PP i nastanka $A\beta$, kao i enzimi uključeni u ovaj proces. α – označava mesto dejstva α -sekretaze koja ne dovodi do produkcije toksičnog $A\beta$, tj. pripada neamiloidnom putu obrade $A\beta$ PP; γ i ϵ – mesto dejstva γ -sekretaze, čime nastaju $A\beta_{40}$ i $A\beta_{42}$, kao i $A\beta$ PP intracelularni domen (eng. *APP intracellular domain, AICD*). Formiranje $A\beta$, njegova oligomerizacija i stvaranje plakova idukuju brojne toksične efekte koji učestvuju u patogenezi AB. Skraćenice: BACE – eng. *beta-site APP cleaving enzyme*; enzim koji cepa APP na beta lokaciji; PEN-2 – eng. *PS-enhancer 2*; PS pojačivač 2; APH-1 – eng. *anterior pharynx defensive phenotype 1*; odbrambeni fenotip 1 prednjeg farinksa. Preuzeto i modifikovano iz: Sanabria-Castro i saradnici. *Ann Neurosci.* 2017;24(1):46–54.

Mutacije u navedenim genima, a pre svega u genu za *PSEN1*, odgovorne su za preko 90% slučajeva AB sa ranim početkom (eng. *early-onset Alzheimer's disease*), koja može biti sporadična ili familijarna (eng. *Familial Alzheimer's disease, FAD*), a kod

koje simptomi bolesti počinju pre 65. godine života (Bagyinszky i saradnici, 2014). Prema podacima iz 2017. godine, prijavljeno je preko 220 različitih mutacija u *PSEN1* genu, dok su mutacije u *PSEN2* genu dosta ređe i opisano ih je ukupno 19 (Lanoiselée i saradnici, 2017). Zajedno sa mutacijama u genu za APP kojih je opisano više od 30, ovi geni predstavljaju glavne uzročnike kod AB sa ranim početkom. Iako je broj pacijenata sa familijarnom formom AB mali, značaj ovih mutacija leži u tome što su one upotrebljene za formiranje velikog broja različitih animalnih modela AB.

Iz prethodno navedenog jasno je da sama amiloidna hipoteza nije dovoljna da objasni sve promene koje se događaju u sklopu AB. Drugi važan protein koji se navodi kao još jedan od glavnih uzročnika u etiopatogenezi AB je tau protein. Ovaj protein u fiziološkim uslovima učestvuje u stabilizaciji mikrotubula, ćelijskih struktura koje su veoma bitne u procesu rasta neuronskih produžetaka i aksonskog transporta (Guo i saradnici, 2017). U AB je utvrđeno prisustvo hiperfosforilisanog tau proteina koji remeti njegovu normalnu funkciju i na posletku dovodi do formiranja druge karakteristične mikroskopske lezije u sklopu ove bolesti koja je označena kao neurofibrilarna petlja. Da tau protein ima važnu ulogu u nastanku AB govori i podatak da tau, slično prionskom proteinu, ima sposobnost da izvrši konverziju normalnog tau proteina u abnormalnu formu. Na ovaj način je čak i mala količina mutiranog tau proteina sposobna da transmisijom od jednog do drugog neurona indukuje neurodegeneraciju i nastanak bolesti (Kametani i Hasegawa, 2018). Međutim, brojna eksperimentalna istraživanja pokazala su da promene na ovom proteinu nastaju i kao posledica stvaranja A β , a što je dugi niz godina A β i celu amiloidnu hipotezu o nastanku oboljenja stavljalo u sam centar istraživanja (Sanabria-Castro i saradnici, 2017). Prema ovoj hipotezi promene u sklopu AB direktna su posledica dejstva neurotoksičnog A β koji kako ekstracelularnim, tako i intracelularnim deponovanjem dovodi do sinaptičke disfunkcije i posledične smrti neurona (Dong i saradnici., 2012), ali i uzrokuje inflamaciju unutar moždanog parenhima aktivirajući mikrogliju (Navarro i saradnici, 2018).

Različiti pristupi i metode proučavanja mehanizama nastanka AB, ukazuju na to da amiloidna hipoteza nije jedina, i da je patogeneza AB mnogo kompleksnija. Naime, poslednjih nekoliko godina javlja se sve veći broj istraživača koji smatraju da sam A β

nije glavni krivac za neurotoksičnost, već da promene nastaju kao posledica poremećaja u metabolizmu APP-a (Kametani i Hasegawa, 2018). Razlozi za ovakva mišljenja su brojni podaci iz eksperimentalnih, ali, još važnije, kliničkih studija. Danas je tako poznato da postoje osobe koje imaju amiloidne depozite i kod kojih se ne uočavaju poremećaji u kognitivnim funkcijama, kao i da postoje pacijenti sa AB kod kojih je broj amiloidnih depozita veoma mali (Edison i saradnici, 2007). Imunoterapijski pokušaji usmereni ka A β takođe nisu dali očekivane rezultate, poput ublažavanja simptoma bolesti ili smanjenja nagomilavanja tau proteina, što se opet može objasniti time da A β nije jedini uzročnik nastanka oboljenja (Kametani i Hasegawa, 2018; van Dyck, 2018). U prilog ovome govori i podatak da se povećava broj eksperimentalnih lekova koji su usmereni ka drugim faktorima bolesti, a ne ka A β (Cummings i saradnici, 2018).

Iako se količina sredstava za istraživanje AB povećava svake godine, broj neuspešnih studija koje su testirale nove lekove za terapiju ovog oboljenja je veći od 400. Ovaj podatak pokazuje da i pored ogromnog ulaganja u istraživanje AB, tačni mehanizmi patogeneze i faktori koji dovode do nastanka bolesti, a koji bi predstavljali glavne terapijske ciljeve i dalje nisu poznati. Uzimajući u obzir multifaktorsku prirodu ovog oboljenja, neophodno je da lekovi za terapiju deluju na što veći broj patogeneznih puteva koji su potencijalni uzročnici oboljenja: na deponovanje A β peptida, neurofibrilarnih petlji, inflamaciju, oksidativni stres, poremećaj nivoa minerala, kao i na mnoge druge faktore (Carreiras i saradnici, 2013).

1.3. Morfološke promene u Alchajmerovoj bolesti

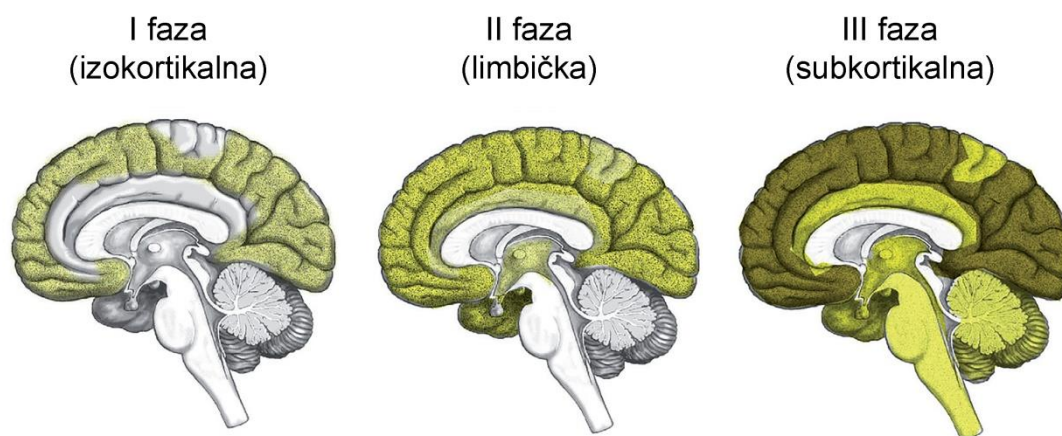
Kod pacijenata koji su bolovali od AB, makroskopski pregled mozga na obdukciji ne pokazuje karakteristične promene koje govore u prilog ovom oboljenju. Promene su nespecifične i podrazumevaju najčešće određeni stepen atrofije kore velikog mozga, koji se može prepoznati po proširenju sulkusa i istanjenju i zaravnjenju girusa. Atrofija primarno pogađa frontotemporalni asocijativni korteks, ali vremenom i svi ostali delovi mozga bivaju zahvaćeni patološkim promenama. Kao posledica gubitka i smanjenja moždane mase dolazi do kompenzatornog proširenja komornog sistema. Međutim, poznato je da se ovakve promene javljaju i kod veoma starih osoba kao posledica senilne atrofije mozga. Makroskopski uočene promene na mozgu koje neuropatologa ipak mogu usmeriti u pravcu razmišljanja o postojanju AB kod obdukovanog pacijenta, jesu izrazita atrofija hipokampusa sa posledičnom dilatacijom temporalnih rogova lateralnih komora (Perl, 2010). Tako je kod pacijenata sa AB zabeležen gubitak od 4,4% volumena hipokampusa godišnje, dok je kod zdravih starijih subjekata ovaj gubitak iznosio svega 0,8% (Schuff i saradnici, 2009). Takođe, najveći gubitak volumena zabeležen je u stadijumu blagog kognitivnog oštećenja, tj. neposredno pre započinjanja klinički prepoznatljivog oblika AB (Henneman i saradnici, 2009; Avila i saradnici, 2010). Hipokampus je, naime, jedan od prvih regiona mozga koji je pogođen promenama u sklopu AB, ali je istovremeno i region kod koga su ove promene najizraženije. Ove informacije su dovele do postavljanja hipoteze o hipokampusno-kortikalnoj-disocijaciji prema kojoj rana oštećenja unutar hipokampusa remete normalan tok informacija iz hipokampusa ka različitim delovima kore velikog mozga i koji dalje uzrokuju simptome AB (Anand i Dhikav, 2012).

Mikroskopski pregled histoloških isečaka uzetih prilikom obdukcije pacijenata koji su bolovali od AB pokazuje čitav niz različitih morfoloških promena od koji su najznačajnije pojava amiloidnih plakova, neurofibrilarnih petlji i distrofičnih neurita, kao i posledični gubitak sinapsi i samih neurona. Navedene promene predstavljaju ključne lezije neophodne za pravilno postavljanje dijagnoze AB (Perl, 2010).

Kao što je prethodno navedeno, dominantna patohistološka promena u sklopu AB je prisustvo senilnih, amiloidnih plakova, koji nastaju nagomilavanjem A β peptida. Ovaj peptid težine 4 kDa koji nastaje proteolitičkim cepanjem APP, zauzima prostornu organizaciju u vidu antiparalelne β -nabrane ploče (Evin i saradnici, 1994). Prostorna orijentacija samog peptida je vrlo bitna pošto je odgovorna za pozitivnost plakova na određena histoheмиjska bojenja kao što su Congo red i Tioflavin-S, kao i za svojstvo birefringencije pod polarizacionim mikroskopom (Perl, 2010). Navedena bojenja takođe omogućavaju da se napravi razlika između dva morfološka tipa amiloidnih plakova – difuznih i amiloidnih plakova sa gustim jezgrom. Tako je pokazano da su Tioflavin-S pozitivni plakovi sa gustim jezgrom povezani sa toksičnim efektima na neuronske nastavke, odnosno sa pojavom distrofičnih neurita i gubitkom sinapsi koji su dalje praćeni aktivacijom astrocita i mikroglije (Serrano-Pozo i saradnici, 2011). Amiloidni plakovi koji pokazuju ovakav tip degeneracije neuronskih produžetaka u njihovoj okolini nazivaju se neuritskim plakovima i od kliničkog su značaja jer se najčešće nalaze kod pacijenata sa AB (Bussière i saradnici, 2004). Za razliku od ovih plakova sa gustim jezgrom, difuzni plakovi se mogu pronaći i u mozgu osoba koje nemaju oštećenje kognitivnih funkcija, što ukazuje na važnost pravilnog morfološkog razlikovanja ova dva tipa plaka.

Centralni deo plaka sastavljen je od A β 4 peptida, dok je periferno okružen abnormalno savijenim produžecima neurona, tj. distrofijskim neuritima, koji, kao i neurofibrilarne petlje, pokazuju afinitet ka impregnaciji srebrom (Perl, 2010). Neuriti pokazuju i dodatne karakteristike, kao što je pozitivnost na hromogranin-A, protein porin u sastavu spoljašnje membrane mitohondrija i deficit citohrom-c oksidaze, a što se smatra posledicom citoskeletnih abnormalnosti koje dovode do poremećenog aksonskog transporta i nakupljanja organela i sinaptičkih vezikula (Pérez-Gracia i saradnici, 2008). Imunoreaktivnost na određene neurotransmitere, kao što su holinergički i glutamatergički markeri, ukazuju na poremećaje u grananju i stvaranju novih bočnih produžetaka (Masliah i saradnici, 2003; Bell i saradnici, 2007), dok pozitivnost na ubikvitin govori u prilog kompenzatornim pokušajima samih neurona da uklone abnormalno nakupljene organele i citoskeletne proteine (Dickson i saradnici, 1990; Serrano-Pozo i saradnici, 2011).

Topografski, deponovanje amiloidnih plakova započinje na nivou izokorteksa, nakon čega dolazi do zahvatanja i dubljih subkortikalnih struktura. Amiloidni depoziti primarno pogađaju ceo korteks velikog mozga, s tim što su slojevi I i VI relativno pošteđeni patoloških promena u odnosu na ostale slojeve (Serrano-Pozo i saradnici, 2011). Braak i Braak (1991) navode tri stadijuma u deponovanju amiloidnih plakova, dok Thal i saradnici (2002) navode ukupno pet stadijuma, koji se radi lakšeg proučavanja opet mogu sumirati u tri faze: izokortikalnu, alokortikalnu ili limbičku i subkortikalnu (Slika 2).

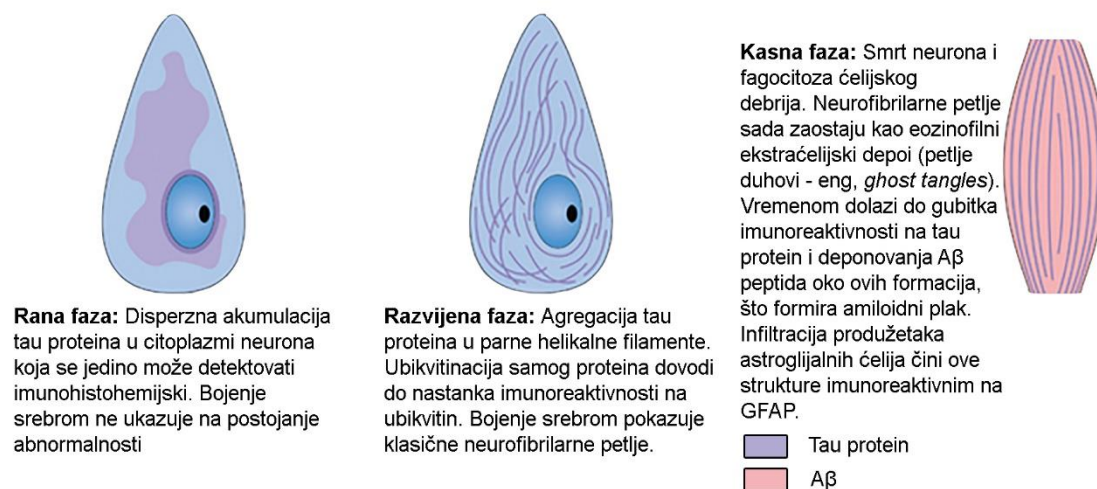


Slika 2. Topografska distribucija deponovanja amiloidnih plakova u mozgu pacijenata sa Alchajmerovom bolešću. Incijalno, depoziti amiloidea nastaju u korteksu velikog mozga gde zahvataju sve slojeve, nakon čega sledi limbička faza deponovanja u entorinalnom korteksu, hipokampusnoj formaciji i amigdali. U kasnim fazama dolazi do zahvatanja dubokih subkortikalnih struktura kao što su bazalne ganglije, jezdra diencefalona i moždanog stabla, kao i kora malog mozga. Preuzeto iz: Candela i saradnici. Arch Ital Biol. 2013; 151(4):169–78. Modifikovano prema: Serrano-Pozo i saradnici. Cold Spring Harb Perspect Med. 2011;1(1):a006189.

Neurofibrilarne petlje predstavljaju nakupine abnormalnih fibrila, koji se javljaju u parovima i zauzimaju helikalnu konformaciju, formirajući tzv. parne helikalne filamente. Ovi filamenti su dijametra oko 20 nm i sužavaju se na dijametar od 10 nm na svakih 80 nm dužine (Miyasaka i saradnici, 2005). Veliki broj različitih proteina ulazi u sastav neurofibrilarnih petlji, ali glavni protein koji čini osnovu ovih formacija je abnormalno fosforilisan protein asociran sa mikrotubulama, označen kao tau (Perl, 2010). Posmatrano pod svetlosnim mikroskopom, ove petlje nalikuju na paralelne i zadebljale filamente koji okružuju jedro i projektuju se ka apikalnom dendritu, ukoliko govorimo o zahvaćenosti piramidalnih neurona korteksa i hipokampusu. Ovakve

neurofibrilarne petlje se opisuju kao formacije koje nalikuju na plamen (eng. *flame-shaped*) (Miyasaka i saradnici, 2005), dok su kod neurona koji imaju morfološki okruglo ili ovalno telo, ovi filamenti međusobno isprepleteni i označeni kao globoidne neurofibrilarne petlje (Perl, 2010). Razvoj neurofibrilarnih petlji prolazi kroz nekoliko morfoloških stadijuma (Slika 3). U prvoj ranoj fazi, prisutna je samo imunohistohemijska pozitivnost perikariona na tau protein, dok je morfologija neurona očuvana. U razvijenoj fazi taloženja filamentozni agregati tau proteina dovode do pomeranja nukleusa ka periferiji neurona, čime započinje njihovo nagomilavanje u proksimalnim delovima neurita, dok u kasnoj fazi dolazi do ekstracelularne pojave petlji (eng. *ghost tangles*) usled smrti neurona (Serrano-Pozo i saradnici, 2011).

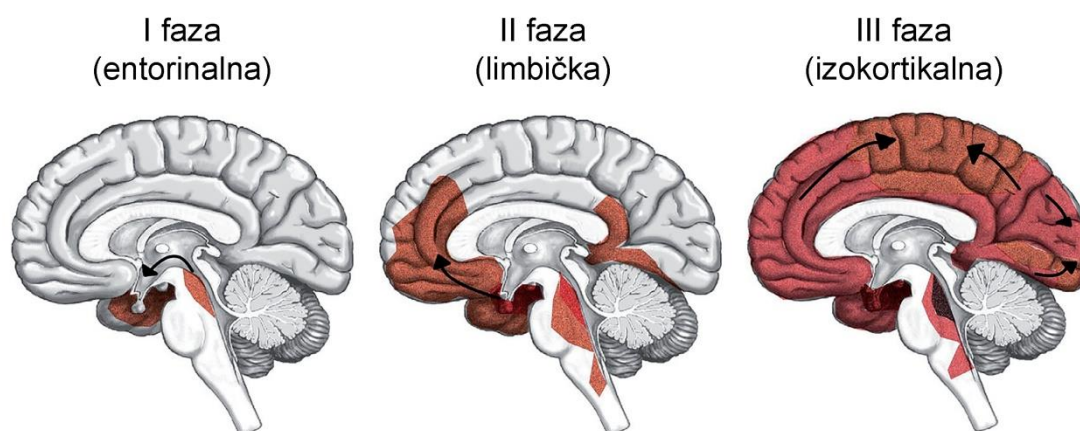
Stadijumi u sazrevanju neurofibrilarnih petlji



Slika 3. Stadijumi sazrevanja neurofibrilarnih petlji. Neurofibrilarne petlje prolaze kroz različite stadijume sazrevanja počevši od isključivo imunohistohemijski detektabilnog nagomilavanja tau proteina u citoplazmi morfološki neizmenjenih neurona, pa do ekstracelularnih neurofibrilarnih petlji koje su jasno vidljive upotrebom srebrne impregnacije. Skraćenice: GFAP – eng. *glial fibrillary acidic protein*; glijalni kiseli fibrilarni protein. Preuzeto i modifikovano sa: <https://clinicalgate.com/dementias/> (Datum preuzimanja: 31. jul 2018. godine).

Neuroni koji su najviše pogođeni deponovanjem neurofibrilarnih petlji, ali i amiloidnih plakova jesu neuroni CA1 regiona hipokampusa, subikuluma, entorinalnog korteksa, amigdale, kao i određenih slojeva kore velikog mozga. Smatra se da oštećenje ovih neuronskih populacija nastaje pre svega kao posledica njihove izrazite osetljivosti na smanjenje nivoa glukoze i kiseonika, što uzrokuje poremećaj sinaptičke transmisije i homeostaze kalcijuma, kao i stres endoplazmatskog retikuluma (Saxena i Caroni, 2011).

Topografski prikaz distribucije neurofibrilarnih petlji unutar mozga pokazuje šest stadijuma kod kojih dolazi do deponovanja ovih formacija u različitim delovima mozga (Braak i Braak, 1991; Braak i saradnici, 2006). Ovih šest stadijuma mogu se sumirati u tri faze (Slika 4). U početnoj fazi, depoziti se mogu uočiti u entorinalnom korteksu, nakon čega se dalje deponovanje dešava u limbičkim strukturama, kao što su subikulum hipokampusa i amigdala. Na kraju, depoziti zahvataju čitav izokorteks, ali sa dominantnim i prvim promenama u asocijativnim delovima korteksa, koji su više pogođeni deponovanjem neurofibrilarnih petlji u odnosu na primarne motorne, senzorne i vizuelne centre (Serrano-Pozo i saradnici, 2011). Značaj poznavanja ove topografske distribucije, kao i obima deponovanja neurofibrilarnih petlji je u direktnoj korelaciji ovog tipa lezija sa težinom demencije, kao i sa simptomima funkcionalnih oštećenja koji se uočavaju kod pacijenata sa AB (Bierer i saradnici, 1995; Perl, 2010).



Slika 4. Topografska distribucija deponovanja neurofibrilarnih petlji u mozgu pacijenata sa Alchajmerovom bolešću. Prvi depoziti neurofibrila javljaju se u entorinalnom korteksu i locus-u coeruleus-u (entorinalna faza), da bi se u sledećoj fazi deponovanje nastavilo u hipokampalnoj formaciji, amigdali, talamusu i claustrum-u (limbička faza). U poslednjoj fazi (izokortikalna) dolazi do zahvatanja korteksa velikog mozga unutar koga su primarno pogođene asocijativne zone. Preuzeto iz: Candela i saradnici. Arch Ital Biol. 2013; 151(4):169–78. Modifikovano prema: Serrano-Pozo A i saradnici. Cold Spring Harb Perspect Med. 2011;1(1):a006189.

Pored amiloidnih plakova i neurofibrilarnih petlji, u sklopu histopatološkog nalaza AB može se uočiti još čitav niz drugih lezija, od kojih su neke jedinstvene i mogu se pronaći isključivo unutar hipokampusa. Takve lezije su npr. Hirano telašca i granulovaskularna degeneracija, koje se javljaju u citoplazmi piramidalnih neurona hipokampusa, a čije poreklo i tačna funkcija u nastanku oboljenja i dalje nisu u potpunosti razjašnjeni

(Serrano-Pozo i saradnici, 2011). Granovaskularna degeneracija se karakteriše prisustvom velikih telašca sa dvostrukom membranom, za koje se smatra da nastaju od endoplazmatskog retikuluma, a kao posledica ćelijskog stresa, usled odgovara na akumulaciju nepravilno savijenih proteina (eng. *unfolded protein response*) (Hoozemans i saradnici, 2009). S obzirom da pokazuju imunopozitivnost na protein ubikvitin i određene markere autofagije moguće je da predstavljaju i kasne stadijume autofagocitoznih vakuola (Funk i saradnici, 2011; Serrano-Pozo i saradnici, 2011). Hirano telašca su aktinom bogate, eozinofilne, štapičaste formacije, koje se kod pacijenata sa AB najčešće viđaju u CA1 regionu hipokampusa. Međutim, ove parakristalne inkluzije nisu specifične za AB i mogu se videti i u drugim neurodegenerativnim oboljenjima, ali i u mozgu zdravih starijih osoba. Poslednji podaci pokazuju da ove formacije mogu imati važnu ulogu u nastanku tautopatija (Spears i saradnici, 2014).

Gubitak neurona je jedna od glavnih patohistoloških karakteristika AB i odgovoran je za makroskopske promene kao što su smanjenje volumena mozga i istanjenje, tj. atrofija kore velikog mozga. Iako se ovaj gubitak može detektovati na preseccima obojenim klasičnim histološkim bojama, često se za potrebe kvantifikacije gubitka koriste imunohistohemijski markeri kao što je NeuN (eng. *neuronal nuclei*; neuronsko jedro). NeuN primarno boji jedro neurona, ali se signal može detektovati i perinuklearno, pa čak i u produžecima neurona. Gubitak NeuN imunoreaktivnosti ima tendenciju da prati topografsku distribuciju deponovanja neurofibrilarnih petlji i pokazano je da bolje korelira sa težinom kognitivnog oštećenja kod pacijenata, nego što je to slučaj sa neurofibrilarnim petljama (Serrano-Pozo i saradnici, 2011). Ranije se smatralo da je sama smrt neurona direktna posledica dejstva neurofibrilarnih petlji, međutim podaci iz eksperimentalnih studija pokazali su da je kod određenih animalnih modela AB kod kojih ne dolazi do formiranja neurofibrilarnih petlji, takođe prisutan gubitak neurona (Maarouf i saradnici, 2013). Zbog toga se danas smatra da postoje dva mehanizma neuronske smrti: jedan koji je direktna posledica tautopatije i drugi koji se dešava kod neurona u kojima se ne stvaraju neurofibrilarne petlje (Serrano-Pozo i saradnici, 2011).

1.4. Animalni modeli Alchajmerove bolesti

Molekularni procesi uključeni u patogenezu AB ne mogu se istraživati u uzorcima moždanog tkiva obolelih osoba iz etičkih razloga, kao i zbog potencijalnog rizika koje ova dijagnostička procedura na mozgu sa sobom nosi. Takođe, uzorci tkiva mozga uzeti *post mortem* od osoba koje su bolovala od AB nisu pouzdani, obično zbog dugog vremenskog perioda koji protekne između momenta nastupanja smrti i uzimanja uzorka, kao i zbog postojanja drugih, dodatnih oboljenja. Odmah nakon smrti u ćelijama pacijenta započinju autolitički procesi koji mogu izmeniti ekspresiju i lokalizaciju određenih proteina i markera i tako uticati na tumačenje rezultata. Zbog toga su istraživanja na eksperimentalnim životinjama koje se koriste kao modeli AB od ključnog značaja u proučavanju molekularnih promena koje se razvijaju u sklopu ovog oboljenja.

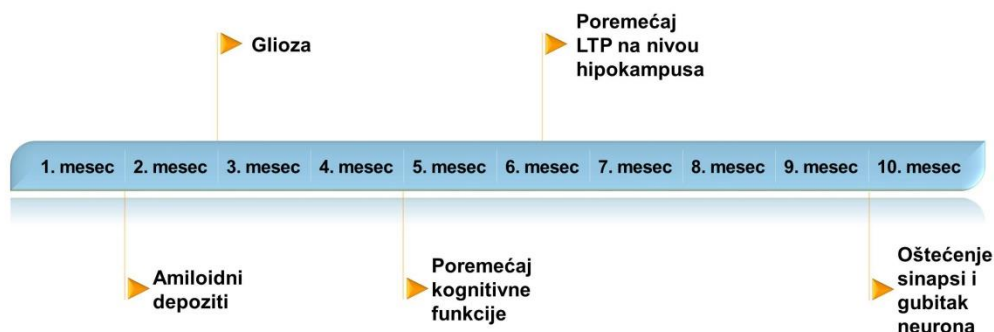
Imajući u vidu da je genom miša 99% homolog ljudskom genomu, većina animalnih modela AB predstavljaju različite sojeve miševa u kojima je metodama genetičkog inženjeringa utišana endogena genska ekspresija ili uveden novi genetski materijal (Orta-Salazar i saradnici, 2016). Danas se za potrebe istraživanja najčešće koriste transgeni modeli miševa u kojima se ektopično ekspimiraju humani geni sa mutacijama koje su prethodno detektovane kod pacijenata sa FAD. Amiloidni plakovi kod miševa se tako produkuju ekspresijom mutiranog APP, često zajedno sa ekspresijom mutiranih proteina koji ulaze u sastav kompleksa γ -sekretaze, a pre svega PSEN1. Stvaranje neurofibrilarnih petlji se može postići ektopičnom ekspresijom mutiranog tau proteina, odnosno „oštećenog” proteina koji je prisutan kod pacijenata sa frontotemporalnom demencijom udruženom sa parkinsonizmom, a u okviru hromozoma 17 (Götz i Ittner, 2008). U zavisnosti od toga da li model eksprimira mutiran APP, kompleks γ -sekretaze i/ili tau protein, razlikuju se jednostruki, dvostruki i trostruki transgeni modeli AB.

Prema podacima sa Alzforuma, baze podataka o AB koja je javno dostupna na internetu (<http://www.alzforum.org/research-models>), do sada je napravljeno i opisano preko 150 različitih modela AB. Samim tim, jasno je da je nemoguće na jednom mestu objediniti sve informacije vezane za animalne modele AB. Ipak, neke od karakteristika modela su zajedničke i prvenstveno se odnose na razlike u starosno-zavisnom obrascu patoloških promena kod animalnih modela i humanih pacijenata. Naime, miševi imaju kratak

životni vek - od dve do četiri godine, dok novi podaci govore da se kod ljudi AB razvija godinama pre ispoljavanja simptoma i oštećenja kognitivnih funkcija (Beason-Held i saradnici, 2013; Donohue i saradnici, 2017). Samim tim, upotreba miševa eliminiše starenje kao jedan od bitnih faktora rizika za razvoj AB. Zbog toga, korišćenje modela kod kojih dolazi do veoma ranog deponovanja amiloidnih plakova, kao što je to npr. slučaj sa 5xFAD modelom, sa sobom nosi određene prednosti, ali i mane, jer se eliminiše faktor starenja (Cuadrado-Tejedor i García-Osta, 2014). Još jedno od bitnih otkrića koje je proisteklo iz rada sa transgenim modelima jeste da humani A β u mišu zauzima formu koja se razlikuje po svojoj strukturi u odnosu na humanu formu (Schieb i saradnici, 2011), kao i da A β , njegovi oligomeri, fibrile, pa i plakovi mogu biti prisutni kod određenih transgenih modela bez gubitka i smanjenja broja neurona i daljih poremećaja kognitivnih funkcija (Kim i saradnici, 2013). Ovaj podatak opet govori u prilog činjenici da su produkti patološke obrade APP, a ne A β sam po sebi, odgovorni za kognitivne poremećaje. Takođe, kod transgenih modela AB postoji veoma rani gubitak sinapsi, ali ne dolazi do tako intenzivnog gubitka neurona kao što je to slučaj kod humanog materijala, zbog čega se smatra da ovi animalni modeli imitiraju prodromalnu fazu bolesti (Cuadrado-Tejedor i García-Osta, 2014).

Jedan od trenutno najčešće korišćenih transgenih animalnih mišjih modela AB jeste 5xFAD model, koji su razvili Oakley i saradnici (2006). U ćelijama ovih transgenih 5xFAD miševa, eksprimira se istovremeno pet mutacija koje su karakteristične za FAD. U pitanju su životinje kojima je u genom ubačena sekvenca sa mutiranim humanim *APP* i *PSEN* genima pod kontrolom mišjeg *Thy1* promotora. Od pet prisutnih mutacija, tri su u genima za APP (Swedish - K670N, M671L; Florida - I716V; London - V717I), dok su dve mutacije (M146L, L286V) prisutne u genu za PSEN1. Model je specifičan po tome što veoma rano razvija izraženu amiloidnu patologiju. Usled prisustva prethodno navedenih mutacija dolazi do prekomerne produkcije A β 42, koji se već u uzrastu od oko 1,5 meseci deponuje i agregira unutar tela neurona i njegovih produžetaka. Depoziti plakova mogu se uočiti već od drugog meseca života 5xFAD miševa, i to pre svega u subikulumu, kao i u dubokim slojevima kore velikog mozga. Gubitak sinapsi i neurona nastupa znatno kasnije, oko 9. meseca starosti životinja, ali se poremećaj na nivou dugotrajne potencijacije (eng. *long-term potentiation*, LTP) može primetiti već oko 6. meseca života jedinki (Slika 5) (Oakley i saradnici, 2006; Kimura i Ohno, 2009).

Patološke promene kod 5xFAD miševa sa starenjem



Slika 5. Vremenski prikaz patoloških promena koje se javljaju kod 5xFAD transgenog modela Alchajmerove bolesti. Šema prikazuje najvažnije patološke promene kod 5xFAD modela, među kojima su intraneuralno deponovanje amiloida na polovini 2. meseca, početak glioze nakon 2. meseca, funkcionalna oštećenja od 5. meseca, kao i gubitak neurona na nivou subikuluma i dubokog korteksa velikog mozga nakon 9. meseca života. Skraćenice: LTP – eng. *long-term potentiation*; dugotrajna potencijacija.

S obzirom da 5xFAD model imitira neurodegeneraciju izazvanu amiloidom, on se može koristiti za proučavanje prodromalne faze AB, s obzirom na veoma rano intracelularno deponovanje A β 42. Takođe, ovaj model ispoljava bihejvioralne, biohemijske, ali strukturne promene, kao što je gubitak neurona, koje odgovaraju AB kod humane populacije. Ono što patologiju u ovom modelu razlikuje od humane patologije AB jeste izostanak formiranja neurofibrilarnih petlji, što nije u skladu sa amiloidnom hipotezom, kao i sa eksperimentalnim podacima dobijenim na drugim transgenim modelima, prema kojima prekomerno deponovanje amiloida indukuje hiperfosforilaciju tau proteina i stvaranje neurofibrilarnih petlji (Götz i saradnici, 2004; Maarouf i saradnici, 2013). Moguća objašnjenja ovog fenomena jesu razlike u strukturi i mehanizmu nastanka tau proteina kod ovog modela i ljudi, kao i mogućnost da se kod 5xFAD modela amiloidni plakovi i neurofibrilarne petlje razvijaju nezavisno jedni od drugih, što je potvrđeno i u određenim istraživanjima na humanom materijalu (Wegiel i saradnici, 2001; Maarouf i saradnici, 2013)

Iako je od kreiranja prvog animalnog modela AB prošlo više od 20 godina, nova terapijska sredstva koja su testirana na ovim modelima nisu dala očekivane rezultate i nisu ušla u svakodnevnu kliničku praksu. Naime, glavni problem u translaciji dobijenih

eksperimentalnih pretkliničkih rezultata jesu neke od gore pomenutih razlika u patologiji AB između humanog materijala i animalnih modela ovog oboljenja. Pored nabrojanih razlika treba imati na umu da su ljudi koji se uključuju u kliničke studije po svojim karakteristikama heterogeni, dok su miševi uglavnom inbrednog soja. Izostanak gubitka neurona kod mišjih modela se takođe može objasniti vrstom soja, jer je C57/Bl6 linija, jedna od najviše korišćenih linija za formiranje transgenih modela, izuzetno rezistentna na ekscitotoksičnost (LaFerla i Green, 2012). Međutim, najveći problem jeste upravo činjenica da ovi modeli imitiraju FAD oblik AB, koji je u humanoj populaciji i najređi, a ne sporadičan oblik, koji je izrazito multifaktorijskog porekla (Cuadrado-Tejedor i García-Osta, 2014; Orta-Salazar i saradnici, 2016). Ovako gledano, može se činiti da animalni modeli AB zapravo imitiraju sasvim drugačiju vrstu oboljenja u odnosu na onu koja je često prisutna kod ljudi, pa samim tim i da predstavljaju neadekvatnu polaznu osnovu za istraživanja. Međutim, zahvaljujući ovim modelima dobijene su brojne informacije o mehanizmu nastanka samog oboljenja, kao i o funkciji amiloidnih proteina u normalnim fiziološkim uslovima. Značaj ovih modela može upravo ležati u tome što imitirajući prodromalnu fazu bolesti oni omogućavaju otkrivanje novih biomarkera za ranu dijagnozu AB, ali i molekula na koje potencijalno novi lekovi mogu delovati u cilju prevencije nastanka oboljenja u humanoj populaciji (LaFerla i Green, 2012).

1.5. Adultna neurogeneza u hipokampusu

Proces adultne neurogeneze predstavlja stvaranje novih neurona unutar centralnog nervnog sistema nakon faze razvića. Iako je samo postojanje ovog fenomena otkriveno još daleke 1965. godine u hipokampusu pacova (Altman i Das, 1965), prvi ozbiljni pomaci u proučavanju načinjeni su tek nekoliko decenija kasnije, kada su Reynolds i Weiss (1992) uspeali da izoluju neuralne matične/prekursorne ćelije (eng. *neural stem/precursor cells*, NSPCs) iz strijatuma miša. Time je zapravo srušena dotadašnja dogma o izostanku stvaranja novih neurona nakon rođenja. Veliki pomak je načinjen i kada je proces adultne neurogeneze otkriven kod primata (Gould i saradnici, 1999; Kornack i Rakic, 1999), ali i kod ljudi (Eriksson i saradnici, 1998). U ljudskom mozgu proces adultne neurogeneze je u fiziološkim uslovima prostorno ograničen na dva regiona – subgranularnu zonu (SGZ) dentatnog girusa (DG) hipokampusa i subventrikularnu zonu bočnih komora. Novi neuroni stvoreni u subventrikularnoj zoni

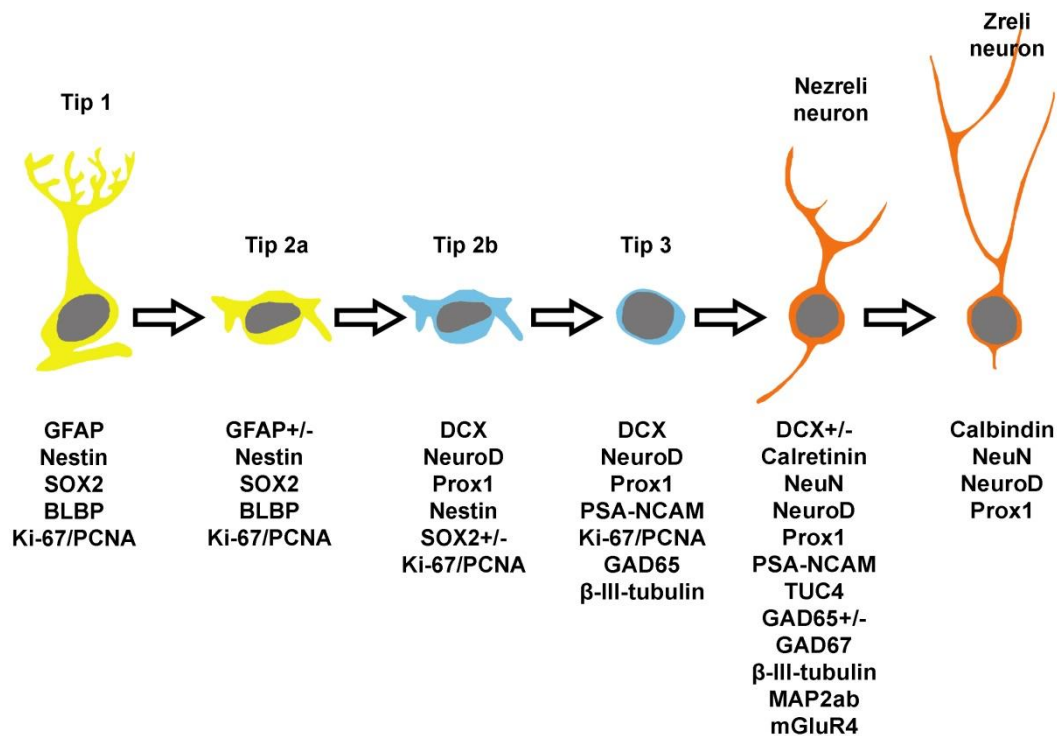
kreću se duž rostralnog migratornog sistema do olfaktornog bulbosa gde se diferenciraju u interneurone. U SGZ hipokampusa, proces adultne neurogeneze dovodi do stvaranja novih granularnih neurona DG (Ming i Song, 2011). Smatra se da je proces adultne neurogeneze u ostalim regionima mozga veoma ograničen u fiziološkim uslovima, ali da se može indukovati nakon oštećenja (Gould, 2007). Proces adultne neurogeneze je dobio na ogromnom značaju upravo zbog činjenice da su se ovim otkrićima stvorile brojne ideje i nade o upotrebi NSPCs u lečenju neurodegenerativnih i traumatskih oštećenja mozga. Takođe, uzimajući u obzir funkciju hipokampusa u procesima učenja i formiranja memorije, veliki značaj posvećen je ispitivanju procesa adultne neurogeneze u SGZ hipokampusa s obzirom na njenu potencijalnu implikaciju u patogenezi neurodegenerativnih oboljenja. Međutim, tačni mehanizmi koji utiču na proces adultne neurogeneze, njenu kontrolu, kao i značaj i funkciju novostvorenih neurona na nivou hipokampusa i dalje predstavljaju veliku nepoznanicu (Kempermann, 2002; Ming and Song, 2011). Stanovište jedne grupe istraživača koji se bave problematikom adultne neurogeneze jeste da novoformirani neuroni imaju fiziološki zadatak da nadoknađuju redukovani kapacitet zrelih neurona u borbi sa potencijalnim ishemijskim oštećenjima, kao i da vrše njihovu postepenu zamenu unutar neuronskih kola hipokampusa tokom celog života (Teixeira i saradnici, 2018).

Novija istraživanja na polju adultne neurogeneze su, međutim, unela brojne kontraverze u sam funkcionalni značaj ovog procesa, ali i u postojanje adultne neurogeneze kod ljudi. Istraživanja na humanom materijalu nisu pružila dokaze o postojanju NSPCs, pa je zaključeno da neurogeneza u hipokampusu ne postoji ili je ekstremno retka kod odraslih osoba (Dennis i saradnici, 2016; Sorrells i saradnici, 2018). Glavno ograničenje ovakvih studija bila je vrsta materijala koji je korišćen za analizu, a to su postmortalni isečci mozgova koji su fiksirani u formalinu, a što je samo po sebi bilo dovoljno da određeni istraživači ove rezultate dovedu u pitanje (Marucci, 2017). Drugi istraživači su, koristeći sličnu metodologiju, uspeli da dokažu da neurogeneza u hipokampusu opstaje kod ljudi tokom čitavog života i da je neurogena niša u kojoj se nalaze proliferišuće progenitorne ćelije, kao i nezreli neuroni, stabilna tokom starenja (Boldrini i saradnici, 2018). Rezultat koji govori u prilog postojanju adultne neurogeneze kod ljudi izneli su Spalding i saradnici (2013) koji su merili nivo ^{14}C inkorporiranog u dezoksiribonukleinsku kiselinu (DNK) neurona, a čije je prisustvo posledica brojnih

nuklearnih proba sredinom prošlog veka. Zahvaljujući ovim podacima zaključeno je da se u adultnom ljudskom mozgu svaki dan oko 700 novih neurona priključi postojećim ćelijama jednog hipokampusa, kao i da su nivoi neurogeneze kod ljudi i miševa uporedivi.

Trenutno prihvaćeno stanovište jeste da neurogeneza u SGZ hipokampusa počinje od ćelija „tipa 1“ koje predstavljaju mirujuće i sporo deleće neuralne matične ćelije (eng. *neural stem cells*, NSCs), a koje imaju karakteristike radijalnih glija ćelija. Ove ćelije nakon aktivacije daju progenitorske ćelije, tzv. „tip 2“ ćelije koje označavaju fazu prelaska iz stadijuma multipotentnih matičnih i visoko proliferativnih matičnih ćelija (NSPCs) u ćelije čiji fenotip ima karakteristike neurona i koje eksprimiraju markere mladih novostvorenih neurona kao što su dablkortin (eng. *doublecortin*, DCX) i NeuroD1 (eng. *neurogenic differentiation 1*; neurogena diferencijacija 1) (Steiner i saradnici, 2006). Nakon migratorne faze, u kojoj ćelije preuzimaju morfologiju sličnu neuroblastima („tip 3“ ćelije), one napuštaju ćelijski ciklus i ulaze u fazu sazrevanja u kojoj pružaju svoje dendritske produžetke ka molekularnom sloju i aksone ka CA3 regionu hipokampusa (Slika 6).

Ćelijski markeri u procesu adultne neurogeneze u hipokampusu



Slika 6. Ćelijski stadijumi u procesu sazrevanja neuralnih matičnih i prekursornih ćelija hipokampusa u neurone i imunohistohemijski markeri koji se koriste za vizuelizaciju ovih ćelija. Proces nastanka novih neurona unutar SGZ hipokampusa podrazumeva prolazak ćelija kroz nekoliko različitih stadijuma u kojima same ćelije menjaju svoje fenotipske karakteristike, što omogućava njihovu identifikaciju primenom određenih nuklearnih i citoplazmatskih markera. Ekspresije određenih proteina nisu jasno vremenski definisane, tako da različiti stadijumi ekspimiraju iste markere, dok za neke faktore, kao što su određeni članovi *SoxB* grupe gena, i dalje nisu precizno definisana mesta njihovog ispoljavanja, tj. tip ćelije u kojima se oni mogu detektovati. Skraćenice: GFAP – eng. *glial fibrillary acidic protein*; glijalni kiseli fibrilarni protein; SOX2 – eng. *SRY Related High Mobility Group Box 2*; BLBP – eng. *brain lipid-binding protein*; moždani lipid-vezujući protein; PCNA – eng. *proliferating cell nuclear antigen*; jedarni antigen proliferišućih ćelija; DCX – eng. *doublecortin*; dablkortin; Prox1 – eng. *prospero homeobox protein 1*; NeuroD1 – eng. *neurogenic differentiation 1*; neurogena diferencijacija 1; PSA-NCAM – eng. *polysialylated-neural cell adhesion molecule*; polisijalilizovani neuralni ćelijski adhezioni molekul; GAD – eng. *glutamate decarboxylase*; glutamat dekarboksilaza; MAP2ab – eng. *microtubule-associated protein 2 ab*; mikrotubularni asocirani protein 2 ab; NeuN – eng. *neuronal nuclei*; neuronsko jedro. Urađeno prema: Knoth i saradnici. PLoS ONE. 2010; 5(1):e8809.

1.6. Adultna neurogeneza i SoxB geni

Molekularni mehanizmi uključeni u ćelijsku deobu i sazrevanje specifičnih ćelijskih populacija u fiziološkim i patološkim uslovima još uvek su nedovoljno istraženi (Mu i Gage, 2011, Hollands i saradnici, 2016). Familija *Sox* (eng. *SRY Related High Mobility Group Box*) gena kodira SOX proteine koji pripadaju HMG (eng. *high-mobility group*) superfamiliji DNK vezujućih proteina (Pevny i Lovell-Badge, 1997; Wegner, 1999). Ovi transkripcioni faktori mogu aktivirati ili utišavati ekspresiju gena (Uchikawa i saradnici, 1999; Popovic i saradnici, 2014) čime regulišu veliki broj ćelijskih procesa, od samoobnavljanja i održavanja pluripotentnosti ćelija unutarćelijske mase blastocista, do njihove diferencijacije i formiranja adultnih tkiva i organa (Wegner, 2011). Na osnovu homologije unutar i van HMG boks domena familija gena *Sox* je klasifikovana u grupe od *A* do *J* (Bowles i saradnici, 2000). Geni grupe *B*, koji su dodatno podeljeni u dve podgrupe, *SoxB1* (*Sox1*, *Sox2* i *Sox3*) i *SoxB2* (*Sox14* i *Sox21*) podgrupu, učestvuju u regulaciji ključnih procesa tokom razvoja nervnog sistema (Lefebvre i saradnici, 2007; Kamachi i Kondoh, 2013; Reiprich i Wegner, 2015). U adultnom mozgu SOX1-3 transkripcioni faktori su predominantno ekspimirani u neurogenim zonama gde učestvuju u regulaciji proliferacije i održavanju ćelijske multipotentnosti (Pevny i saradnici, 1998; Reiprich i Wegner, 2015). Od svih članova ove grupe, ekspresioni obrazac i uloga SOX2 proteina u neurogenezi je najdetaljnije opisana u literaturi. Ćelije koje ekspimiraju visok nivo SOX2 proteina predstavljaju populaciju nediferenciranih ćelija, koje imaju sposobnost samoobnavljanja i diferencijacije u različite tipove ćelija nervnog sistema, kao što su neuroni i glijalne ćelije (Zhang i Cui, 2014; Zhang i Jiao, 2015), što SOX2 čini dobrim markerom za detekciju NSPCs u SGZ hipokampusa (Ellis i saradnici, 2004). Na molekulskom nivou, SOX2 predstavlja jedan multifunkcionalni protein koji na proces razvoja nervnog sistema, pa samim tim i na proces adultne neurogeneze utiče ne samo regulacijom procesa transkripcije, već i regulacijom mikro ribonukleinskih kiselina i epigenetskom regulacijom, delujući na enzime koji modifikuju histone i hromatin, kao što je histon deacetilaza 1 (eng. *histone deacetylase 1*, HDAC1) (Reiprich i Wegner, 2014). Nekoliko studija je pokazalo kritičnu ulogu SOX21 protein u regulaciji diferencijacije NSPCs u nezrele neurone (Wegner, 2011; Whittington i saradnici, 2015). Dosadašnji rezultati ukazuju da se proces održavanja fenotipa NSPCs i njihove diferencijacije u pravcu neurona odvija

zahvaljujući balansu u nivou ekspresije između *SoxB1* i *SoxB2* grupe gena. Rezultati studija su pokazali da proteini iz grupe *SoxB1* gena regulišu održavanje progenitornih karakteristika NSPCs, dok je visok nivo ekspresije SOX21 transkripcionog faktora u ćelijama neophodan da bi se odvijala njihova dalja diferencijacija (Sandberg i saradnici, 2005). Međutim, rezultati su takođe pokazali da ektopična (visok nivo) ekspresija SOX21 proteina suprimira proces neurogeneze i održavanje progenitornog stanja ćelija (Whittington i saradnici, 2015). Slično, SOX1 se eksprimira u aktivnim NSPCs gde se pretpostavlja da učestvuje u održavanju progenitornog stanja, dok njegova kontinuirana ekspresija takođe može usmeriti ove ćelije u pravcu neuronske linije (Kan i saradnici, 2007). Ovi podaci ukazuju da u zavisnosti od nivoa ekspresije u ćelijama, geni *SoxB* grupe mogu različito uticati na molekularne mehanizme koji učestvuju u diferencijaciji ćelija u sastavu neurogene niše hipokampusa.

Imajući u vidu navedene rezultate možemo zaključiti da dalje ispitivanje ekspresije i regulacije SOX transkripcionih faktora doprinosi boljem razumevanju molekularnih mehanizama uključenih u proces adultne neurogeneze na nivou SGZ.

1.7. Ćelijska proliferacija, diferencijacija i adultna neurogeneza

U istraživanjima često korišćeni markeri za detekciju ćelija u fazi proliferacije su Ki-67, jedarni antigen proliferišućih ćelija (eng. *proliferating cell nuclear antigen*, PCNA), kao i egzogeni marker-agens bromodeoksiuridin (BrdU).

Upotreba BrdU, sintetskog analoga timidina, predstavljala je dugo vremena zlatni standard za proučavanje procesa proliferacije unutar nervnog sistema s obzirom na njegovu sposobnost inkorporacije u novostvoreni molekul DNK u proliferišućim ćelijama (Nowakowski i saradnici, 1989). Međutim, markeri kao što su Ki-67 i PCNA u poslednjih nekoliko godina su odneli primat nad BrdU i pokazali brojne prednosti u odnosu na upotrebu BrdU. Tako se BrdU ugrađuje u DNK samo u toku S faze ćelijskog ciklusa, dok je Ki-67 sposoban da markira sve faze ćelijskog ciklusa izuzev G₀ i da bude eksprimiran tokom celog mitotskog procesa (Kee i saradnici, 2002). Ki-67 je endogeni marker, dok je BrdU egzogeni marker-agens i samim tim se mora aplikovati eksperimentalnim životinjama, zbog čega njegova upotreba zavisi od brojnih faktora (Kee i saradnici, 2002). S obzirom na brojne metodološke prednosti, specifičan i senzitiv obrazac ekspresije na parafinskim isečcima, nije iznenađujuće što je veliki

broj skorašnjih studija koje su proučavale proces neurogeneze u hipokampusu koristio Ki-67 kao marker ćelijske proliferacije (Allen i saradnici, 2016; Dennis i saradnici, 2016; Sorrells i saradnici, 2018).

DCX je mikrotubularni neuron-specifični protein koji se prolazno eksprimira tokom neurogeneze u neuroblastima i novostvorenim neuronima (Couillard-Despres i saradnici, 2005). Navedene ćelije koekspimiraju i druge rane neuronske antigene kao što su TuJ1 (eng. *neuron-specific class III beta-tubulin*; neuron-specifična klasa III beta-tubulina), PSA-NCAM (eng. *polysialylated-neural cell adhesion molecule*; polisijalizovani neuralni ćelijski adhezioni molekul) i Pax6 (eng. *paired box protein Pax-6*; upareni box protein Pax-6) (Filippov i saradnici, 2003), ali ne i markere specifične za glijalne, matične, apoptoske ćelije i zrele neuronske ćelije, što ga čini pouzdanim markerom novostvorenih neurona u DG hipokampusa (Brown i saradnici, 2003; Knoth i saradnici, 2010). Visok nivo ekspresije DCX u neuroblasnim i novostvorenim neuronima, tj. ćelijama „tipa 2“, se postepeno utišava tokom dalje diferencijacije ćelija u zrele neurone. Paralelno sa padom nivoa ekspresije DCX dolazi do porasta nivoa ekspresije NeuN kao markera zrelih neurona (Brown i saradnici, 2003).

Veliki broj istraživanja je pokazao i da određeni neurotrofički faktori, kao što je neurotrofički faktor poreklom iz mozga (eng. *brain-derived neurotrophic factor*, BDNF), utiču na procese proliferacije i diferencijacije NSPCs (Waterhouse i saradnici, 2012). Hipokampus kao ključna struktura u procesu nastanka različitih oblika dugotrajne memorije, predstavlja važno mesto dejstva BDNF. Naime, utvrđena je brza i selektivna ekspresija BDNF u hipokampusu tokom kontekstualnog učenja (Hall i saradnici, 2000), dok primena anti-BDNF antitela (Alonso i saradnici, 2002) ili upotreba BDNF *knock-out* miševa (Linnarsson i saradnici, 1997) narušava njihovo spacijalno (prostorno) učenje. Iako je primarna funkcija BDNF-a regulacija sinaptičke plastičnosti, veliki broj eksperimentalnih studija pokazao je da su adekvatni nivoi BDNF neophodni za pravilnu stimulaciju procesa neurogeneze, kao i za preživljavanje samih neurona (Zaletel i saradnici, 2017). Tako primena egzogenog BDNF-a u hipokampusu stimuliše proces neurogeneze (Liu i Nusslock, 2018), dok heterozigotni miševi za BDNF pokazuju niže nivoe ćelijske proliferacije u SGZ hipokampusa (Lee i saradnici, 2002),

kao i nemogućnost stimulacije neurogeneze primenom nekih drugih faktora i postupaka (Rossi i saradnici, 2006). Još jedna od potencijalnih veza između BDNF-a i procesa neurogeneze jeste fizička aktivnost, za koju je pokazano da ima stimulatívne efekte na stvaranje i preživljavanje novih neurona unutar hipokampusa (van Praag i saradnici, 1999; Liu i Nusslock, 2018). Naime, pretpostavlja se da se ova povezanost između fizičke aktivnosti i neurogeneze odvija upravo putem povećane sinteze i ekspresije BDNF na nivou hipokampusa (Liu i Nusslock, 2018). Smatra se da BDNF ove efekte ostvaruje preko svog glavnog receptora TrkB (eng. *tropomyosin-related kinase B*), koji se nalazi na površini NSPCs i koji dovodi do njihove aktivacije, proliferacije i posledične diferencijacije (Shohayeb i saradnici, 2018). Tako je pokazano da trčanje stimuliše stvaranje novih DCX imunoreaktivnih neurona koji na svojoj površini ekspimiraju TrkB receptor u SGZ hipokampusa (Lafenêtre i saradnici, 2010). Ovi efekti na diferencijaciju su veoma bitni za proces stvaranja dopaminergičkih i holinergičkih neurona, s obzirom da su poremećeni nivoi BDNF zabeleženi u uzorcima hipokampusa pacijenata obolelih od AB (Ferrer i saradnici, 1999) i u *substantia-nigra*-i pacijenata sa Parkinsonovom bolešću (Mogi i saradnici, 1999; Howells i saradnici, 2000).

1.8. Adultna neurogeneza u Alchajmerovoj bolesti

Iako je tačna funkcija adultne neurogeneze, kao i njeno postojanje, i dalje tema velikih debata, smatra se da novostvoreni neuroni imaju ulogu u procesima učenja i formiranja memorije, samim tim i u oblikovanju kognicije i ponašanja individue. S obzirom da je hipokampus jedan od prvih regiona mozga koji je pogođen promenama u sklopu AB, kognitivni deficit i gubitak pamćenja kod ovog i drugih neurodegenerativnih oboljenja, delom se upravo pripisuje poremećenoj neurogenezi na nivou SGZ (Mu and Gage, 2011; Rodríguez i Verkhratsky, 2011; Hollands i saradnici, 2016). U prilog ovome govori sve veći broj dokaza dobijenih kod transgenih modela, a koji ukazuju da je proces adultne neurogeneze veoma rano poremećen u AB (Demars i saradnici, 2010; Moon i saradnici, 2014; Unger i saradnici, 2016). Na ovaj način, ne samo da je poremećen proces stvaranja novih neurona, nego su oštećeni i endogeni reparatorni mehanizmi koji bi mogli da nadomeste patološki gubitak neurona koji se javlja u sklopu AB (Mu and Gage, 2011; Hollands i saradnici, 2016).

Različiti animalni modeli AB su korišćeni u cilju ispitivanja uticaja patologije AB na neurogenezu u SGZ (Varela-Nallar i saradnici, 2010; Mu and Gage, 2011; Winner i Winkler, 2015). Ove studije su dale veliki broj kontradiktornih dokaza o disregulaciji neurogeneze, koja započinje pre ili nakon pojave znakova i simptoma AB, a u vidu njenog povećanja, odsustva promena ili smanjenja nivoa neurogeneze (Jin i saradnici, 2004b; Wen i saradnici, 2004; Chevallier i saradnici, 2005; Donovan i saradnici, 2006; Chen i saradnici, 2008; Moon i saradnici, 2014; Ziegler-Walldkirch i saradnici, 2018). Ove razlike mogu biti prouzrokovane različitim eksperimentalnim uslovima, a pre svega različitim vrstama animalnih modela koji su ispitivani i mutacijama koje kod njih postoje, kao i starošću životinja u vreme početka same bolesti i markera koji su korišćeni za detekciju procesa neurogeneze (Varela-Nallar i saradnici, 2010; Mu and Gage, 2011; Winner i Winkler, 2015).

Dugo godina se smatralo da poremećaj neurogeneze kod Alchajmerove bolesti nastaje kao posledica toksičnog efekta amiloidnih plakova (Haughey i saradnici, 2002). Međutim, novija istraživanja su pokazala da ovi plakovi mogu i indukovati neurogenezu kod određenih transgenih animalnih modela AB (Martinez-Canabal, 2014). Kao što je prethodno navedeno, pomenuti modeli AB najčešće nastaju uvođenjem modifikovanih gena za amiloidne i presenilinske proteine, koji samo delimično dovode do nastanka fenotipa karakterističnog za AB. Zbog upotrebe različitih sojeva životinja, mutacija na različitim genima, kao i usled različitog stepena ekspresije odgovarajućih transgena, animalni modeli AB često imaju međusobno neuporedive fenotipove, što dodatno otežava interpretaciju dobijenih rezultata i donošenje odgovarajućih zaključaka (Toda i saradnici, 2018). Novija istraživanja su pokazala da čak i različite forme A β pokazuju različite efekte na proces ćelijske proliferacije unutar hipokampusa. Tako, rastvorljiva forma A β inhibira proliferaciju, dok oligomerne forme, koje se javljaju u intermedijernom stadijumu AB, stimulišu formiranje mikroglije (Baglietto-Vargas i saradnici, 2017).

Zbog prethodno navedenih podataka može se činiti da upotreba animalnih modela u cilju proučavanja adultne neurogeneze u sklopu AB predstavlja veliki izazov i potencijalni problem zbog postojanja izraženih varijacija između samih modela. Međutim, proučavanje ovog procesa na mozgovima ljudi obolelih od AB takođe sa

sobom nosi velike kontradiktornosti koje su do sada zabeležene u brojnim istraživanjima. Dobijeni rezultati se kreću od toga da su adultna neurogeneza i sazrevanje neurona inhibirani (Boekhoorn i saradnici, 2006; Li i saradnici, 2008; Crews i saradnici, 2010), do visoko citiranog rada Jin i saradnika (2004a) u kome je pokazano povećano stvaranje novih neurona unutar hipokampusu. Ove razlike su možda proizvod različitih stadijuma AB koji su upotrebljeni u trenutku kada je vršeno ispitivanje ili se jednostavno mogu objasniti izrazitom heterogenošću samog oboljenja. Naravno, u obzir se moraju uzeti i tehnički aspekti samih istraživanja, tj. analiza određenih markera neurogeneze koji se različito ili neadekvatno eksprimiraju u patološkim uslovima, kao i u postmortalnom humanom materijalu, a o čemu je već bilo reči ranije (Toda i saradnici, 2018).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

U dostupnoj literaturi postoji veliki broj različitih i kontradiktornih podataka o procesu adultne neurogeneze unutar SGZ hipokampusa, kako kod zdravih jedinki, tako i kod jedinki obolelih od AB. Imajući u vidu činjenicu da tačan mehanizam regulacije ovog procesa takođe nije dovoljno istražen, postavljeni su sledeći ciljevi istraživanja:

1. Uporedna analiza broja zrelih granularnih neurona u DG hipokampusa kod 5xFAD transgenih (Tg) miševa i odgovarajućih netransgenih (NeTg) kontrola starosti 6, 8 i 16 nedelja;
2. Uporedna analiza broja ćelija u aktivnim fazama ćelijskog ciklusa u SGZ hipokampusa kod 5xFAD Tg miševa i odgovarajućih NeTg kontrola starosti 6, 8 i 16 nedelja;
3. Uporedna analiza broja mladih novoformiranih neurona u SGZ hipokampusa kod 5xFAD Tg miševa i odgovarajućih NeTg kontrola starosti 6, 8 i 16 nedelja;
4. Uporedna analiza broja ćelija u kojima se detektuje ekspresija SOX1, SOX2 i SOX21 proteina u SZG hipokampusa kod 5xFAD Tg miševa i odgovarajućih NeTg kontrola starosti 6, 8 i 16 nedelja;
5. Uporedna analiza ukupne količine BDNF proteina u hipokampusu kod 5xFAD Tg miševa i odgovarajućih NeTg kontrola starosti 6, 8 i 16 nedelja.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Eksperimentalne životinje

Za potrebe ovog istraživanja korišćeni su 5xFAD Tg miševi i njihove odgovarajuće kontrole, NeTg miševi. Eksperimentalne životinje su nabavljene od firme „Jackson laboratorije” (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA). Za dalji rasplod i dobijanje potomstva oba pola, heterozigotni 5xFAD mužjaci su ukrštani sa B6/SJL F1 sojem ženki. Za svakog potomka rađena je genotipizacija, postupkom lančane reakcije polimeraze (eng. *polymerase chain reaction*, PCR), upotrebom DNK izolovane iz repa životinje. Briga o životinjama i eksperimentalne procedure su bile u skladu sa Direktivom 2010/63/EU o zaštiti životinja koje se koriste u naučne svrhe i odobrene su od strane Etičke komisije za laboratorijske životinje Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, kao i Etičke komisije za laboratorijske životinje Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”.

3.2. Eksperimentalne grupe

U istraživanje su bila uključena 72 miša različitog genotipa (Tg i NeTg životinje), starosti i pola. Miševi su gajeni u providnim kavezima od pleksiglasa, obloženim šuškom, sa žičanom rešetkom postavljenom odozgo, pod standardnim uslovima spoljašnje sredine (temperatura $23 \pm 2^\circ \text{C}$, relativna vlažnost vazduha 50–60% i 12-časovni režim svetlo-tama). Hrana (specijalni briketi za ishranu eksperimentalnih životinja, Veterinarski zavod Subotica) i voda bili su dostupni *ad libitum*. Zdravstveni status životinja je redovno praćen.

Tg 5xFAD životinje su gajene u standardnim laboratorijskim uslovima do dostizanja starosti od 6, 8 i 16 nedelja (Tg_{6, 8, 16}), kao i njihove kontrole, NeTg životinje (NeTg_{6, 8, 16}). Na osnovu starosti, pola i genotipa životinja formirano je ukupno 12 različitih eksperimentalnih grupa sa po šest životinja u svakoj od navedenih grupa:

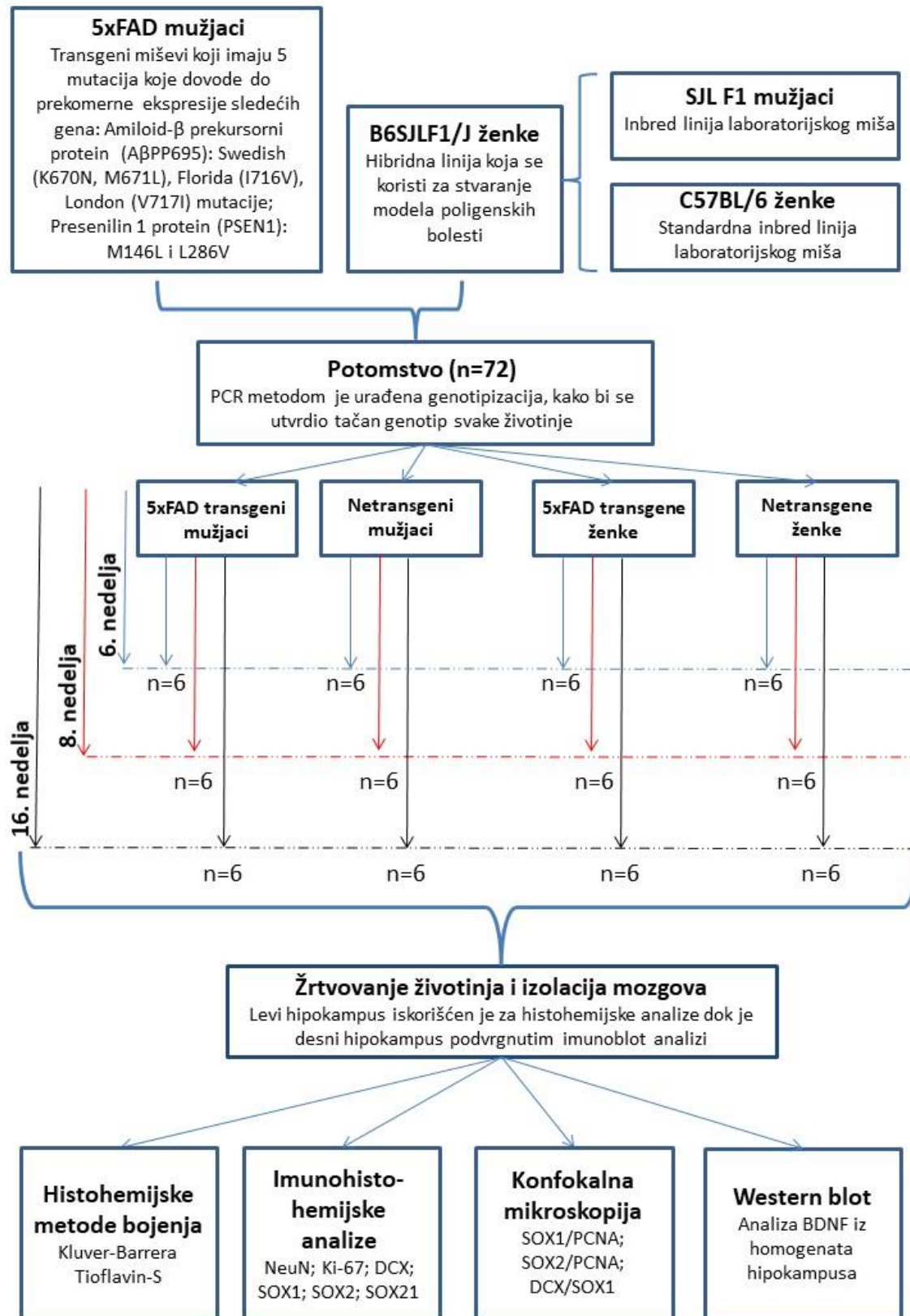
1. Tg 5xFAD mužjaci starosti šest nedelja (TgM₆; n = 6);
2. Tg 5xFAD ženke starosti šest nedelja (TgŽ₆; n = 6);
3. NeTg kontrolni mužjaci starosti šest nedelja (NeTgM₆; n = 6);
4. NeTg kontrolne ženke starosti šest nedelja (NeTgŽ₆; n = 6);
5. Tg 5xFAD mužjaci starosti osam nedelja (TgM₈; n = 6);
6. Tg 5xFAD ženke starosti osam nedelja (TgŽ₈; n = 6);
7. NeTg kontrolni mužjaci starosti osam nedelja (NeTgM₈; n = 6);
8. NeTg kontrolne ženke starosti osam nedelja (NeTgŽ₈; n = 6);
9. Tg 5xFAD mužjaci starosti šesnaest nedelja (TgM₁₆; n = 6);
10. Tg 5xFAD ženke starosti šesnaest nedelja (TgŽ₁₆; n = 6);
11. NeTg kontrolni mužjaci starosti šesnaest nedelja (NeTgM₁₆; n = 6);
12. NeTg kontrolne ženke starosti šesnaest nedelja (NeTgŽ₁₆; n = 6).

Odabir uzrasta u kojima će životinje biti žrtvovane izvršen je na osnovu prethodnih literaturnih podataka u kojima je pokazano da unutarćelijsko deponovanje A β kod ovog modela započinje već u 6. nedelji, dok u 8. nedelji dolazi i do pojave amiloidnih plakova van ćelija. Plakovi se javljaju i unutar hipokampusu, što potencijalno može uticati na odvijanje procesa adultne neurogeneze. U 4. mesecu, tj. 16. nedelji starosti Tg miševa, uočava se značajan porast u broju amiloidnih plakova.

Grafički prikaz šeme organizacije eksperimentalnih grupa prikazan je na slici 7.

3.3. Žrtvovanje životinja

U 6, 8. ili 16. nedelji života (u zavisnosti od eksperimentalne grupe) životinje su žrtvovane primenom intraperitonealne injekcije ketamina (100 mg/kg), nakon čega je otvaran grudni koš i kroz levu srčanu komoru je izvršena kratkotrajna transkardijalna perfuzija sa 0,1 M fosfatnim puferom (eng. *phosphate-buffered saline*, PBS, pH = 7,4). Mozgovi životinja su u cilju njihove prezervacije brzo i precizno izolovani iz lobanje i na ledu podeljeni na levu i desnu hemisferu upotrebom odgovarajućih instrumenata.



Slika 7. Šema eksperimentalnog protokola i primenjenih eksperimentalnih metoda.

3.4. Priprema tkiva za histohemijska i imunohistohemijska bojenja

Leve polovine mozгова, korišćene za histohemijske i imunohistohemijske analize, fiksirane su u 4% puferisanom paraformaldehidu u trajanju od 24 h. Nakon fiksacije, hemisfere su podvrgnute standardnoj proceduri za parafinsko kalupljenje koja podrazumeva sledeće korake: dehidraciju tkiva u seriji alkohola rastuće koncentracije (etanol, 70%, 96%, 100%, Zorka Pharma-Hemija, Šabac, Srbija); prosvetljavanje (ksilol, Zorka Pharma-Hemija, Srbija); kalupljenje u parafinu (Bio-plastextra, Bio-optica, Italy). Nakon dobijanja kalupa, tkivo je sečeno u koronarnoj ravni na rotacionom mikrotomu (debljina preseka 4 μm), nakon čega su preseci ispravljani u vodenom kupatilu i lepljeni na obična i specijalna predmetna stakla za potrebe histoloških analiza (Superfrost™ Ultra Plus Adhesion Slides, Thermo Scientific, USA). Nivoi preseka za histološke analize su bili između -1.656 i -2.255 mm u odnosu na bregmu, a prema atlasu mozga miševa sa stereotaksičkim koordinatama (The Allan Mouse Brain Atlas) (Lein i saradnici, 2007). Za svaki imunohistohemijski analizirani protein, obojena su po dva preseka hipokampusa po životinji. Obojeni preseci su dalje korišćeni za kvantifikaciju broja imunoreaktivnih ćelija, statističku analizu i dobijanje digitalnih mikrofotografija. Minimalno rastojanje između dva preseka iznosilo je najmanje 200 μm .

3.5. Histohemijska bojenja

U cilju orijentacije na tkivnim presecima, procene očuvanosti morfologije hipokampusa i dobijanja digitalnih mikrofotografija, primenjena je *Kluver-Barrerova* metoda bojenja. Vizuelizacija amiloidnih plakova izvršena je bojenjem tkivnih preseka Tioflavinom-S (Sigma-Aldrich, USA). U oba slučaja, parafinski isečci su najpre deparafinisani u ksilolu (Zorka Pharma-Hemija, Šabac, Srbija), nakon čega su rehidrirani u seriji alkohola opadajuće koncentracije (etanol, 100%, 96%, 70%, Zorka Pharma-Hemija, Šabac, Srbija). Bojenje po *Kluver-Barrerovoj* metodi je urađeno upotrebom luksola, litijum karbonata i krezil violeta po standardnoj proceduri, nakon čega su preseci dehidrirani u seriji alkohola rastuće koncentracije, potopljeni u ksilol i pokriveni odgovarajućim medijumom i pokrovnim stakalcima. Preseci namenjeni za vizuelizaciju amiloidnih plakova tretirani su vodenim rastvorom Tioflavina-S (1%), u uslovima zaštićenim od svetlosti, nakon čega su ispirani u alkoholima rastuće koncentracije i destilovanoj vodi, a zatim pokriveni odgovarajućim vodenim medijumom i pokrovnim

stakalcima. Analiza preparata i dobijanje digitalnih mikrofotografija izvršeno je upotrebom Zeiss Axiovert mikroskopa Z1 i AxioVs40 V softverskog paketa.

3.6. Fluorescentna imunohistohemijska bojenja

Imunofluorescentna detekcija SOX1, SOX2, PCNA i DCX proteina izvršena je na parafinskim isečcima, koji su deparafinisani u ksilolu (Zorka Pharma-Hemija, Šabac, Srbija), rehidrirani u seriji alkohola opadajuće koncentracije (etanol, 100%, 96%, 70%, Zorka Pharma-Hemija, Šabac, Srbija) i tretirani citratnim puferom (pH = 6.0) u trajanju od 15 minuta na 121°C u ekspres loncu. Isečci su nakon toga blokirani u 1% BSA (eng. *bovine serum albumine*, albumin iz goveđeg seruma) i 10% normalnom serumu (Sigma-Aldrich, MO, USA) u PBS-u u trajanju od sat vremena, na sobnoj temperaturi. Inkubacija sa sledećim specifičnim antitelima je rađena tokom noći, na sobnoj temperaturi: zečje anti-SOX1 antitelo (rabbit polyclonal IgG, 4194, Cell signaling, razblaženje 1:50); anti-SOX2 antitelo (pAb, rabbit polyclonal IgG, 39823, Active Motif, razblaženje 1:1000); anti-PCNA antitelo (mouse monoclonal IgG, sc-56, Santa Cruz Biotechnology, razblaženje 1:100); anti-DCX antitelo (Doublecortin C-18, goat polyclonal IgG sc-8066, Santa Cruz Biotechnology, razblaženje 1:300). Nakon ispiranja u PBS-u preseci su inkubirani u trajanju od sat vremena u rastvoru kozjih anti-zečjih sekundarnih antitela konjugovanih sa Alexa Fluor® 488 fluoroforom (Invitrogen TM, razblaženje 1:500 u 1% BSA u PBS-u). Anti-DCX i anti-PCNA antitela su najpre obeležena sa biotinizovanim magarećim anti-kozjim IgG (Vector, Burlingame, CA, USA) ili biotinizovanim kozjim anti-mišjim IgG (Vector, Burlingame, CA, USA) tokom 1h na sobnoj temperaturi, a zatim i sa DyLight® 594-streptavidinom (Vector, Burlingame, CA, USA, razblaženje 1:1000) razblaženim u PBS-u, takođe tokom 1h na sobnoj temperaturi. Jedra su obojena sa 0.1 mg/ml diaminofenilindolom (DAPI, Sigma-Aldrich, MO, USA). Rezovi su isprani PBS-om i pokriveni odgovarajućim medijumom (Mowiol, Calbiochem, USA). Analiza preparata i dobijanje digitalnih mikrofotografija je urađeno na Leica TCS SP8 konfokalnom mikroskopu i upotrebom Leica Microsystems LAS AF-TCS SP8 softverskog paketa.

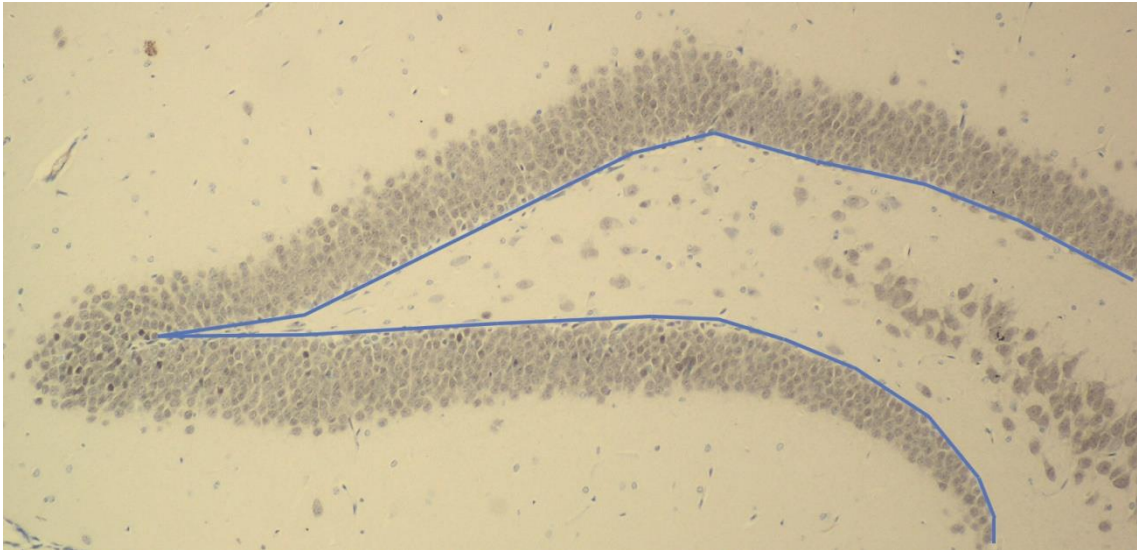
3.7. Imunohistohemijska bojenja

U cilju imunohistohemijskog bojenja parafinski isečci su deparafinisani u ksilolu (Zorka Pharma-Hemija, Šabac, Srbija), rehidrirani u seriji alkohola opadajuće koncentracije (etanol, 100%, 96%, 70%, Zorka Pharma-Hemija, Šabac, Srbija) i kuvani u citratnom puferu (pH = 6.0) u mikrotalasnoj peći (21 minut, 800 W) u cilju demaskiranja antigena. Aktivnost endogene peroksidaze blokirana je 3% vodonikom (H_2O_2), nakon čega su uzorci inkubirani tokom jednog sata u normalnom zečjem ili kozjem serumu komercijalno dostupnih paketa za imunobojenje (VECTASTAIN Elite ABC HRP Kit - Peroxidase, Goat IgG, PK-6105; Peroxidase, Rabbit IgG, PK-6101, Vector Laboratories), a u zavisnosti od tipa antitela koje je prethodno upotrebljeno. Preseci su tokom noći inkubirani sa sledećim antitelima: anti-NeuN antitelo (mouse monoclonal IgG, MAB377, Chemicon, razblaženje 1:100); anti-Ki-67 antitelo (rabbit polyclonal IgG, ab15580, Abcam, razblaženje 1:3500); anti-DCX antitelo (Doublecortin C-18, goat polyclonal IgG sc-8066, Santa Cruz Biotechnology, razblaženje 1:100); anti-SOX1 antitelo (rabbit polyclonal IgG, 4194, Cell signaling, razblaženje 1:100), anti-SOX2 antitelo (pAb, rabbit polyclonal IgG, 39823, Active Motif, razblaženje 1:4000); anti-SOX21 antitelo (goat polyclonal IgG, AF3538, R&D systems, razblaženje 1:500). Nakon toga, preseci su inkubirani još sat vremena sa odgovarajućim sekundarnim antitelom obeleženim biotinom (biotinylated rabbit anti-goat IgG ili biotinylated goat anti-rabbit IgG u zavisnosti od antitela) i potom tretirani sa ABC kompleksom (VECTASTAIN Elite ABC HRP Kit - Peroxidase, Goat IgG, PK-6105; Peroxidase, Rabbit IgG, PK-6101, Vector Laboratories). Između svakog koraka uzorci su ispirani u svežem PBS-u (3 x 5 minuta). Vizuelizacija je izvršena primenom 3,3'-diaminobenzidin hromogena pojačanog niklom (DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit (with Nickel), SK-4100, Vector Laboratories). Preseci su kontrastirani Majerovim hematoksilinom, dehidrirani u seriji alkohola rastuće koncentracije, prosvetljeni u ksilolu i pokriveni odgovarajućim medijumom (DPX, 44581, Sigma, St. Louis, MO, USA) i pokrovnim stakalcima.

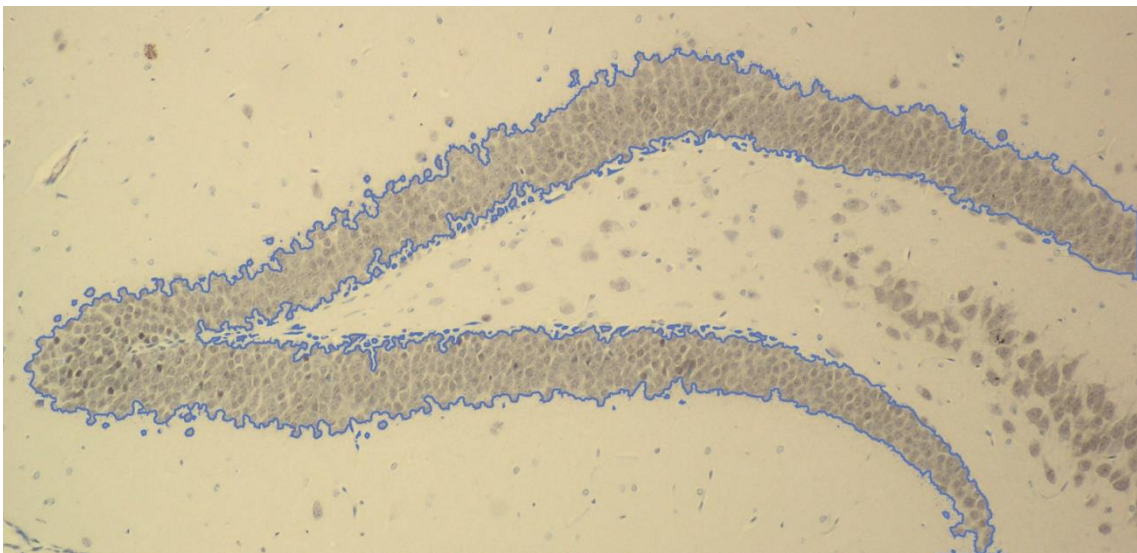
3.8. Kvantifikacija imunoreaktivnih ćelija

Kvantifikacija NeuN, Ki-67, DCX, SOX1, SOX2 i SOX21 imunoreaktivnih ćelija na imunohistohemijski obojenim preparatima hipokampusa urađena je primenom Leica DM4000 B LED mikroskopa sa digitalnom kamerom Leica DFC295, a uz pomoć Leica Application Suite (LAS, v4.4.0) softverskog sistema. Brojanje Ki-67, DCX, SOX1, SOX2 i SOX21 imunoreaktivnih ćelija urađeno je duž SGZ hipokampusa, koja je za potrebe ovog istraživanja definisana kao granični region između hilusa i sloja granularnih ćelija (Moon i saradnici, 2014). Dužina SGZ izmerena je na svakom preseku uz pomoć Leica Application Suite (LAS, v4.4.0) softverskog sistema, nakon čega je izbrojan ukupan broj imunoreaktivnih ćelija na datoj izmerenoj dužini. Brojanje ćelija je izvršeno pod uveličanjem objektiva od x40, a brojane su sve imunoreaktivne ćelije bez obzira na njihovu veličinu i oblik. Broj detektovanih imunoreaktivnih ćelija je izražen po 1 mm dužine SGZ hipokampusa u cilju standardizacije ukupnog broja izbrojanih ćelija (Slika 8). Reprezentativne histološke mikrofotografije iz svake eksperimentalne grupe životinja napravljene su pomoću OlympusBX41 svetlosnog mikroskopa i OlympusC5060A-ADU digitalne kamere, a pod uveličanjem objektiva od x40 i dalje sa imerzionim objektivom (x100).

Kvantifikacija broja imunoreaktivnih NeuN ćelija unutar DG, izvršena je po sličnom principu kao i kvantifikacija ostalih markera korišćenih u studiji, s tim što je broj granularnih ćelija pozitivnih na NeuN kvantifikovan po jedinici površine DG. Kako bi se standardizovala kvantifikacija, ukupan broj detektovanih NeuN imunoreaktivnih ćelija je izražen po 0,1 mm² površine DG (Slika 9).



Slika 8. Kvantifikacija imunoreaktivnih ćelija duž subgranularne zone hipokampusa. Reprezentativni primer preseka hipokampusa obojenog na NeuN marker na kome je plavom linijom označena SGZ duž koje je vršena kvantifikacija Ki-67, DCX, SOX1, SOX2 i SOX21 imunoreaktivnih ćelija. Uvećanje objektiva: 10x.



Slika 9. Kvantifikacija imunoreaktivnih ćelija unutar dentatnog girusa hipokampusa. Reprezentativni primer preseka hipokampusa obojenog na NeuN marker na kome je plavom linijom označen DG unutar koga je vršena kvantifikacija granularnih neurona, obojenih NeuN markerom. Uvećanje objektiva: 10x.

3.9. Imunoblot (Western blot) analiza

Desni hipokampus eksperimentalnih životinja je odmah nakon žrtvovanja precizno disekovan na ledu i brzo zamrznut u tečnom azotu, nakon čega su uzorci prebačeni i čuvani na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do odgovarajućih analiza ekspresije proteina. Pre započinjanja analiza, uzorci hipokampusa su homogenizovani i sonifikovani u 10 volumena hladnog RIPA pufera (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 0.5% Triton x-100, 10mM EDTA, 10 mM EGTA) koji je sadržao proteazne i fosfatazne inhibitore. Nakon centrifugiranja na 20 000 g na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ u trajanju od 30 min, supernatant je prikupljen i čuvan na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do upotrebe.

Koncentracija proteina je određena upotrebom Micro BCA Protein Assay Kit (PierceBiotechnology, Rockford, IL, USA) i BSA kao standarda. Jednake količine proteina (15 μm po traci) razdvojene su pomoću SDS-poliakrilamidne gel elektroforeze (12%) i blotovane na PVDF membrane (GE Healthcare, Princeton, NJ, USA). U cilju blokiranja nespecifičnog vezivanja, membrane su inkubirane tokom jednog sata na sobnoj temperaturi u 3% BSA/TBST (150mM NaCl, 50mM Tris, pH 7.4, i 0.1% Tween20). Nakon inkubacije preko noći u anti-BDNF antitelu (BDNF N-20 rabbit polyclonal IgG, sc-546, Santa Cruz Biotechnology, razblaženje 1:50), membrane su inkubirane sa odgovarajućem anti-zečjim HRP (eng. horse radish peroxidase) konjugovanim sekundarnim antitelom (Santa CruzBiotechnology, Santa Cruz, CA, USA) u trajanju od jednog sata. HRP-imunoreaktivne trake su vizuelizovane upotrebom komercijalnog paketa za pojačanu hemiluminiscenciju (ECL, GE Healthcare, Princeton, NJ, USA) i ekspozicijom na filmu (MXBE, Carestream Health, Inc., Rochester, NY, USA). Svaki blot je dalje inkubiran sa mišjim anti- β -aktin antitelom (Sigma-Aldrich Biotechnology, St. Louis, MO, USA), a intenzitet signala je upotrebljen kao kontrola količine nanetog uzorka. Signali su kvantifikovani denzitometrijski, upotrebom Image Quant softvera (v. 5.2, GE Healthcare, Princeton, NJ, USA) i ImageJ softvera (v. 1.52i, NIH, Bethesda, MD, USA).

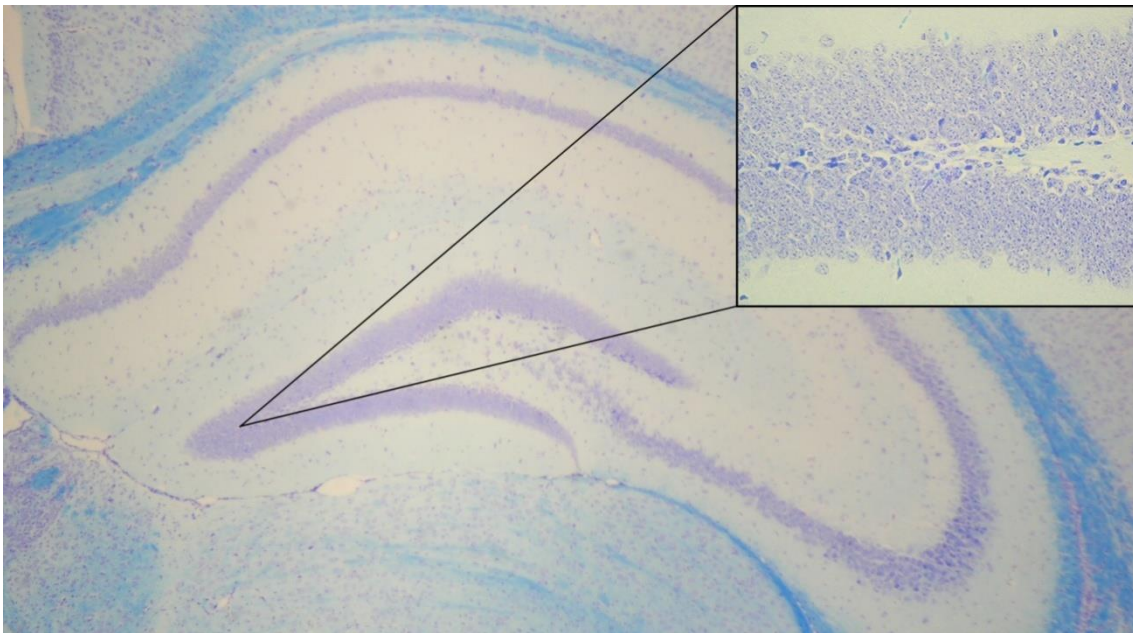
3.10. Statistička analiza

U ovom radu primenjene su metode deskriptivne i inferencijalne statistike. Provera normalnosti podataka izvršena je upotrebom D'Agostino-Pearson omnibus testa. Za procenu postojanja statističke razlike u broju imunoreaktivnih ćelija u SGZ hipokampusa kod NeTg i Tg miševa oba pola korišćena je dvofaktorska analiza varijanse (eng. *analysis of variance*, ANOVA) nakon čega je za otkrivanje postojanja razlike između određenih grupa korišćen *post hoc* Tukijev test za međusobno upoređivanje (eng. *Tukey's multiple comparison test*). Za statističku analizu imunoblot rezultata korišćen je *Kruskall-Wallis test* i *post hoc* Dunov test za međusobno upoređivanje (eng. *Dunn's multiple comparison test*). Rezultati su prikazani numerički i grafički i to kao srednja vrednost \pm standardna devijacija za rezultate imunohistohemije i kao medijana i interkvartilni opseg za imunoblot rezultate. Statistički značajnom razlikom smatrana je p vrednost $\leq 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Ispitivanje histološke strukture subgranularne zone hipokampusa kod 5xFAD miševa

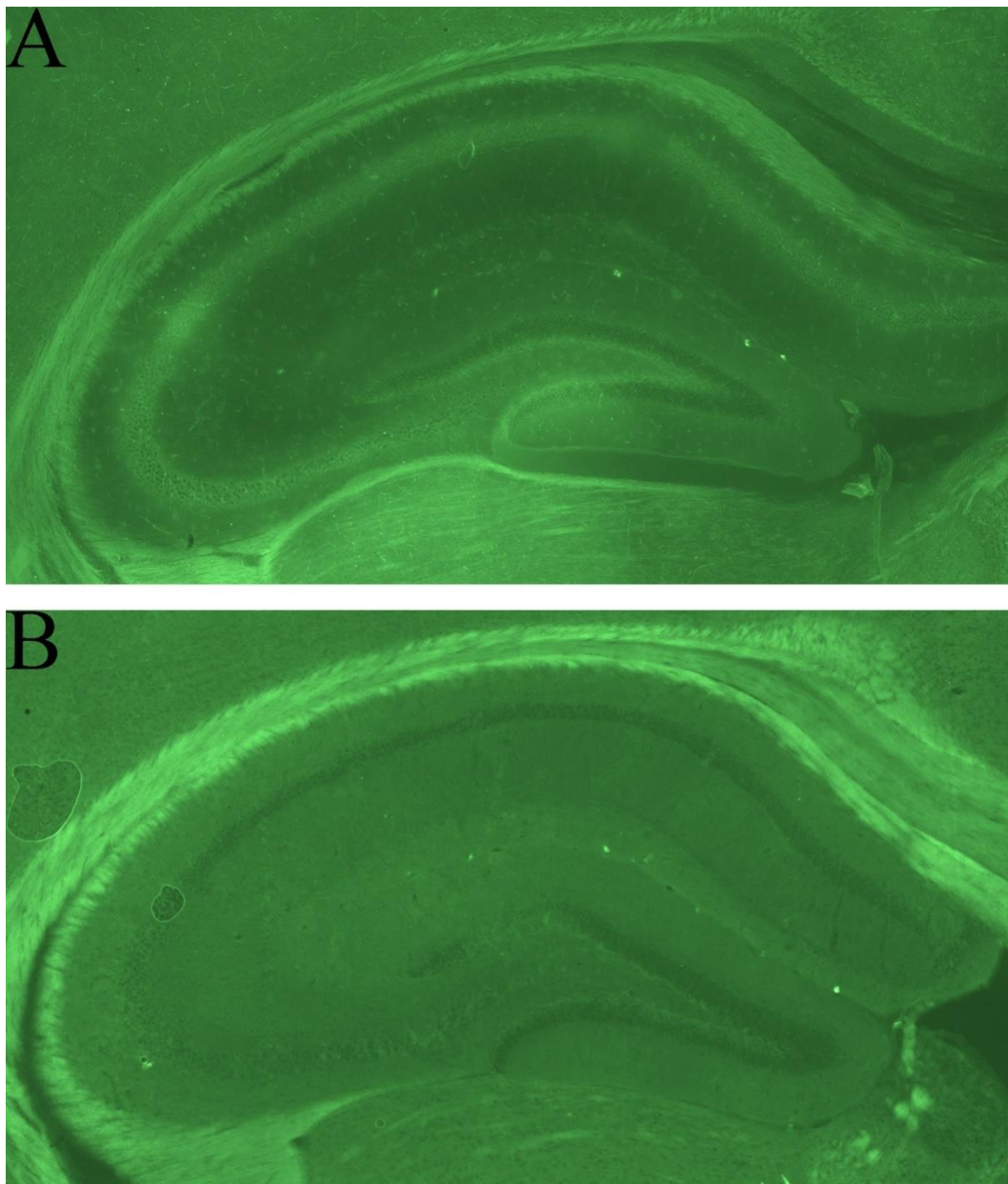
Analiza histološke strukture hipokampusa kod svih ispitivanih životinja, na presecima obojenih *Kluver-Barrerovom* metodom, nije ukazala na prisustvo svetlosnomikroskopski vidljivih patoloških promena koje su karakteristične za neurodegenerativna oboljenja (Slika 10). Zabeleženo je prisustvo određenog broja tamnih neurona (eng. *dark neurons*) za koje se smatra da predstavljaju artefakt koji nastaje u toku procesa vađenja i fiksacije moždanog tkiva (Jortner, 2006). Ovi neuroni nisu uzimani u analizu i nisu uticali na dalji ishod imunohistohemijskih ispitivanja procesa neurogeneze u SGZ.



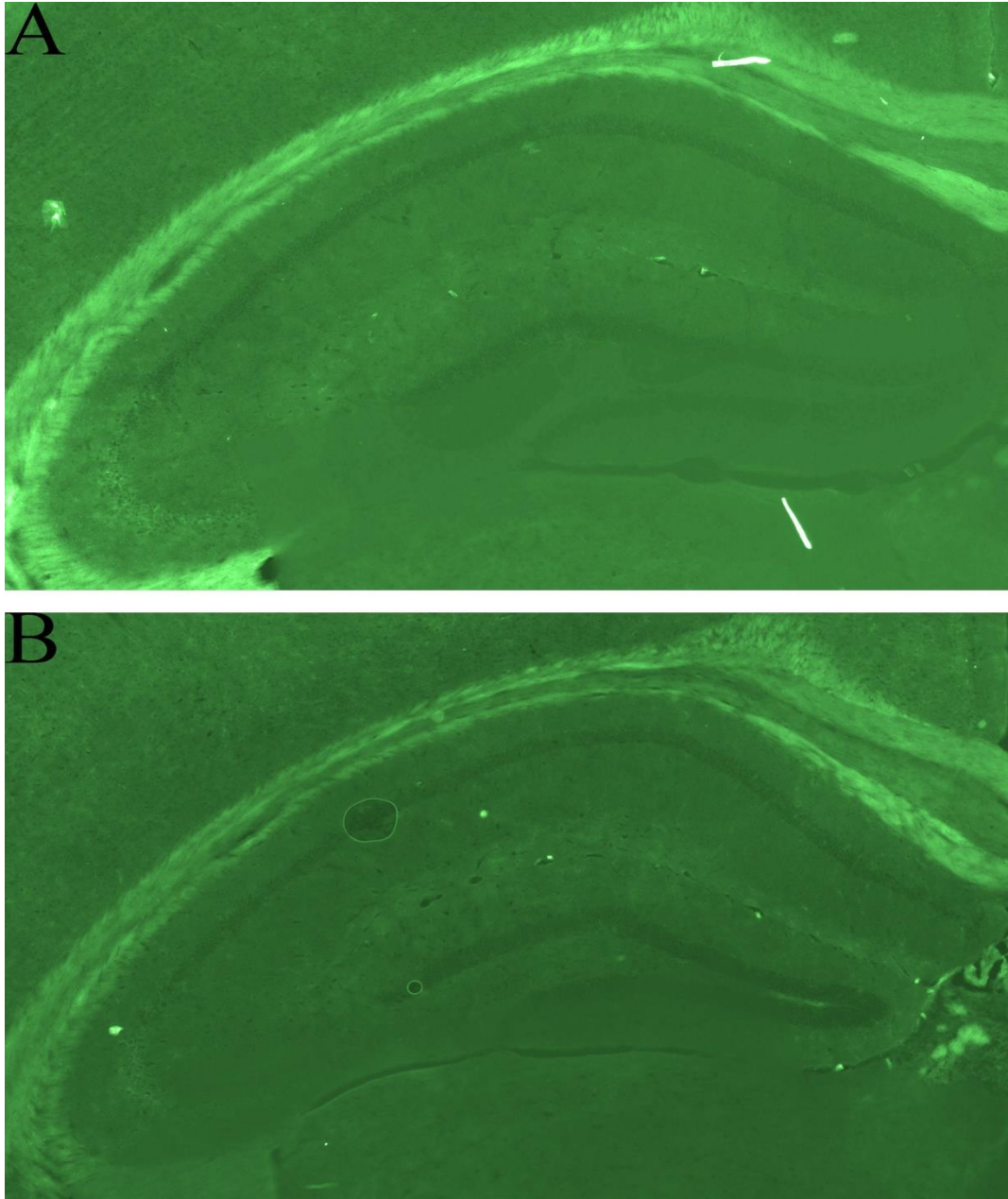
Slika 10. Histološka građa hipokampusa. Reprezentativni primer preseka hipokampusa obojenog *Kluver-Barrerovom* metodom, kod transgenih mužjaka starosti 8 nedelja. Uvećanje objektiva: 4x.

4.2. Detekcija amiloidnih plakova u hipokampusu 5xFAD miševa

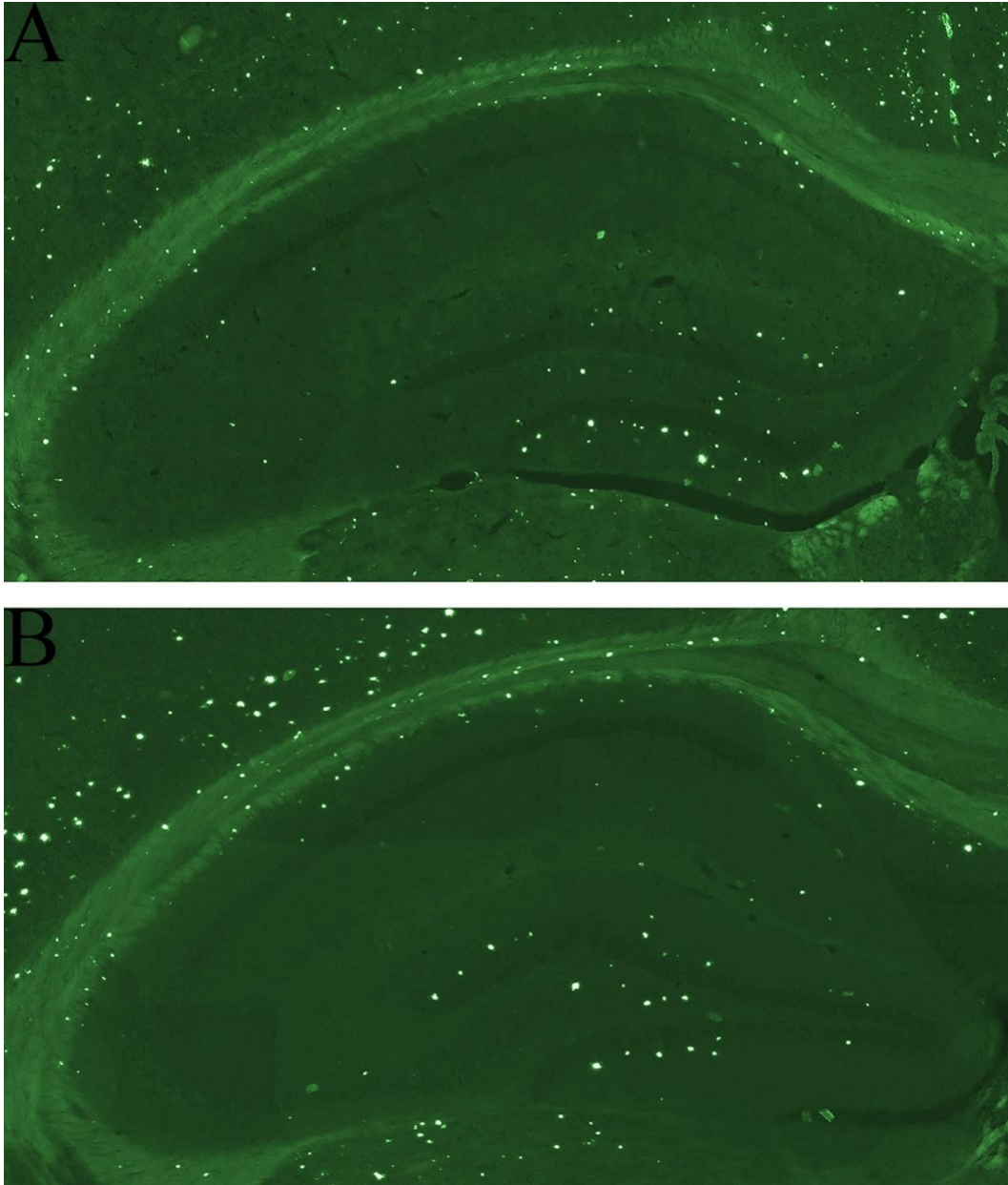
5xFAD model AB se karakteriše veoma ranim razvojem amiloidne patologije, pri čemu se plakovi mogu detektovati već od drugog meseca i to pre svega u subikulumu, kao i u dubokim slojevima kore velikog mozga (Oakley i saradnici, 2006; Moon i saradnici, 2014). Primenom Tioflavin-S bojenja utvrđeno je da deponovanje A β kod 5xFAD miševa uključenih u našu studiju odgovara prethodno opisanim obrascima deponovanja. Naime, kod miševa starosti 6 i 8 nedelja prisustvo amiloidnih plakova unutar hipokampusa nije detektovano ili su bili prisutni jako retki pojedinačni depoziti (Slike 11 i 12). Međutim, kod Tg miševa starosti 16 nedelja uočeno je intenzivnije deponovanje plakova u DG hipokampusa, kao i u dubokim slojevima kore velikog mozga. Unutar DG hipokampusa, plakovi su predominantno bili lokalizovani u molekularnom sloju i hilusu, dok su u granularnom sloju i SGZ detektovani uglavnom sporadično raspoređeni depoziti (Slika 13).



Slika 11. Reprezentativne slike preseka hipokampusa obojenih Tioflavinom-S kod 5xFAD Tg mužjaka (A) i ženki (B) starosti 6 nedelja. Na presecima se ne uočavaju amiloidni plakovi. Uvećanje objektiva: 4x.

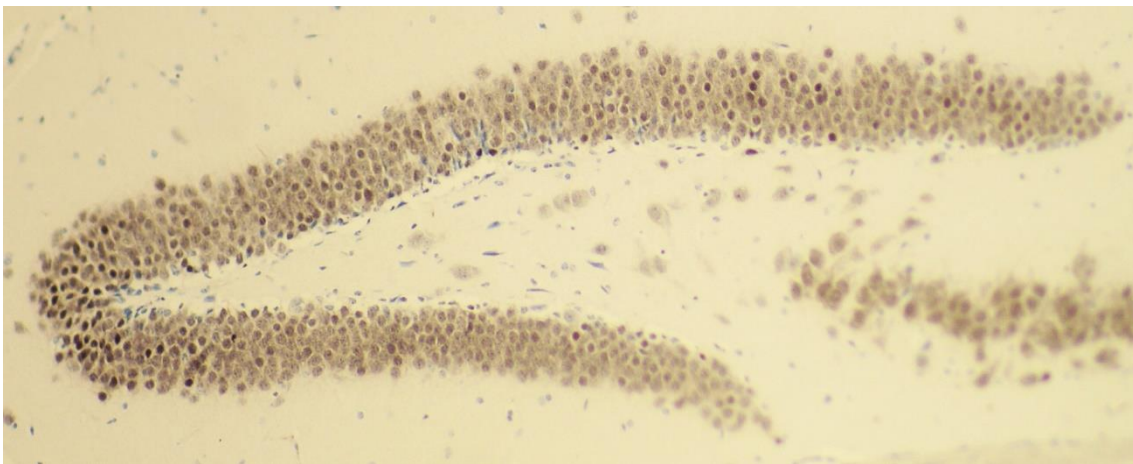


Slika 12. Reprezentativne slike preseka hipokampusa obojenih Tioflavinom-S kod 5xFAD Tg mužjaka (A) i ženki (B) starosti 8 nedelja. Na preseccima se ne uočavaju amiloidni plakovi. Uveličanje objektiva: 4x.



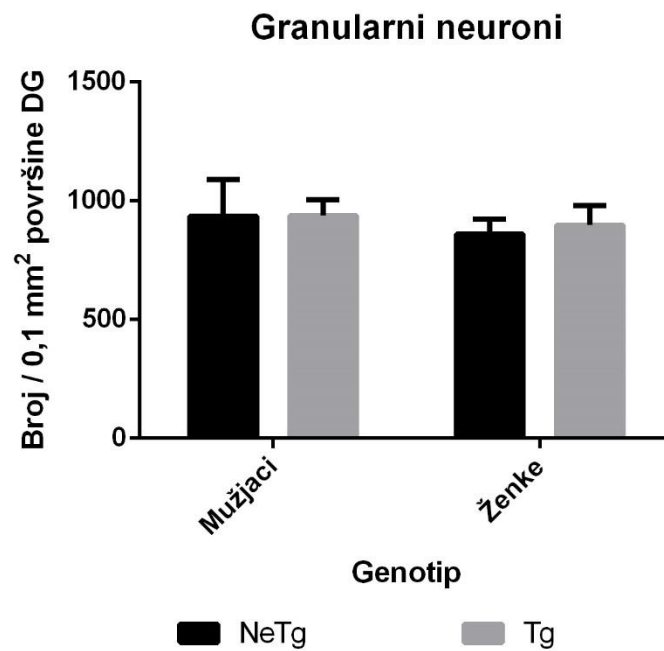
Slika 13. Reprezentativne slike preseka hipokampusa obojenih Tioflavinom-S kod 5xFAD Tg mužjaka (A) i ženki (B) starosti 16 nedelja. Uočava se prisustvo amiloidnih plakova u dentatnom girusu, sa predominantnom lokalizacijom u molekularnom sloju i hilusu, dok su u granularnom sloju i SGZ depoziti A β uglavnom sporadično prisutni. Uveličanje objektiva: 4x.

4.3. Analiza ukupnog broja granularnih neurona unutar dentatnog girusa hipokampusa
AB se karakteriše progresivnim neurodegenerativnim promenama u određenim regionima mozga. Posebno osetljivi su specifični regioni hipokampusa, među kojima se pre svega izdvajaju DG i CA1 region, unutar kojih dolazi do izraženog gubitka neurona (Zarow i saradnici, 2005; Padurariu i saradnici, 2012). U cilju detekcije potencijalnog smanjenja broja neurona unutar DG hipokampusa kao zone u kojoj se odvija adultna neurogeneza, kod svih grupa ispitivanih životinja je kvantitativnom analizom određen broj granularnih neurona koji su imunohistohemijski obeleženi nuklearnim markerom NeuN (Slika 14).

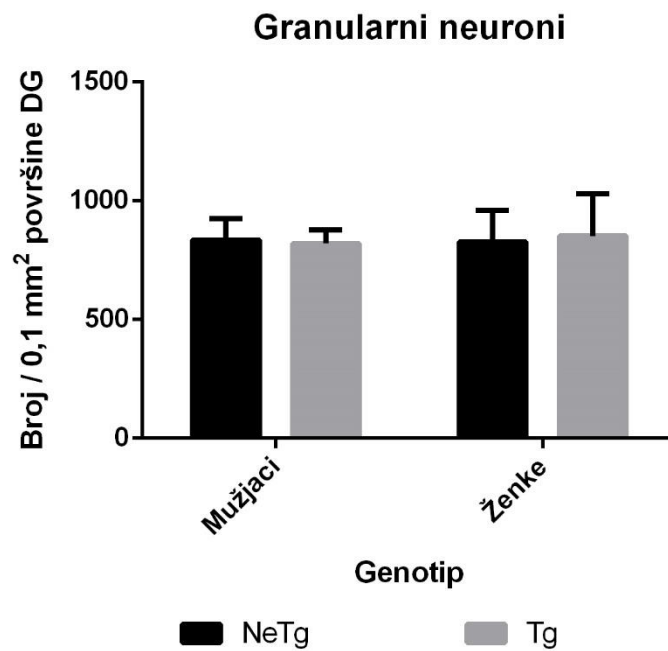


Slika 14. Reprezentativna slika preseka hipokampusa nakon imunohistohemijskog bojenja NeuN markerom i kontrastiranja sa hematoksilinom kod netransgenih mužjaka starosti 8 nedelja. Uvećanje objektiva: 10x.

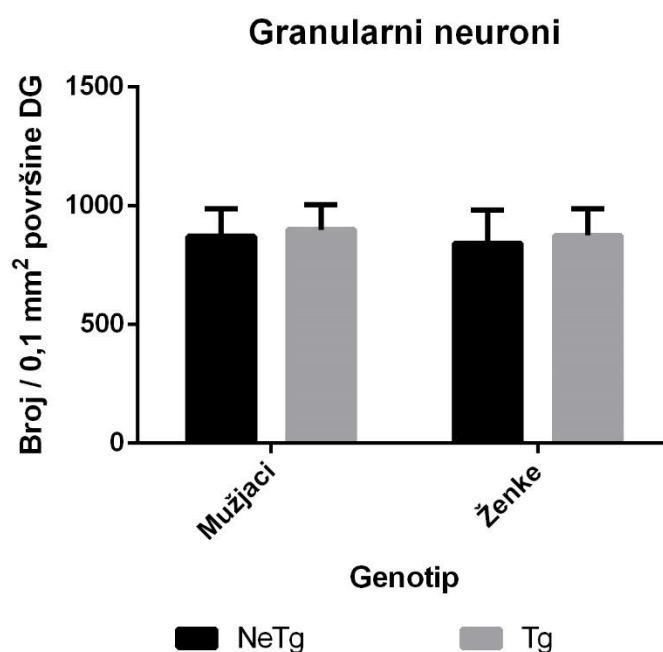
Analizom dobijenih podataka nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike u broju granularnih ćelija DG hipokampusa između NeTg i Tg miševa oba pola, starosti 6 nedelja ($F = 0,355$, $p > 0.05$) (Grafik 1), 8 nedelja ($F = 0,2981$, $p > 0.05$) (Grafik 2) i 16 nedelja ($F = 0,012$, $p > 0.05$) (Grafik 3).



Grafik 1. Prosečan broj granularnih neurona po jedinici površine u hipokampusu netransgenih i transgenih 5xFAD miševa starosti 6 nedelja. Analiza broja granularnih neurona kod različitih grupa životinja starosti 6 nedelja nije pokazala postojanje statistički značajne razlike između ispitivanih grupa. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Skraćenice: DG – dentatni girus; NeTg – netransgeni miševi; Tg – transgeni miševi.



Grafik 2. Prosečan broj granularnih neurona po jedinici površine u hipokampusu netransgenih i transgenih 5xFAD miševa starosti 8 nedelja. Analiza broja granularnih neurona kod različitih grupa životinja starosti 8 nedelja nije pokazala postojanje statistički značajne razlike između ispitivanih grupa. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Skraćenice: DG – dentatni girus; NeTg – netransgeni miševi; Tg – transgeni miševi.



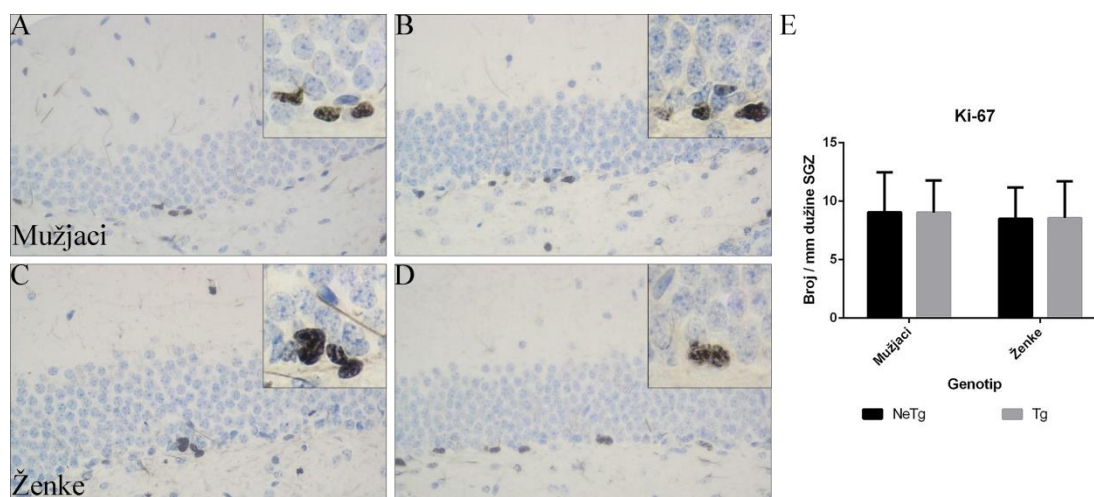
Grafik 3. Prosečan broj granularnih neurona po jedinici površine u hipokampusu netransgenih i transgenih 5xFAD miševa starosti 16 nedelja. Analiza broja granularnih neurona kod različitih grupa životinja starosti 16 nedelja nije pokazala postojanje statistički značajne razlike između ispitivanih grupa. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Skraćenice: DG – dentatni girus; NeTg – netransgeni miševi; Tg – transgeni miševi.

4.4. Analiza broja Ki-67 imunoreaktivnih ćelija u subgranularnoj zoni hipokampusa

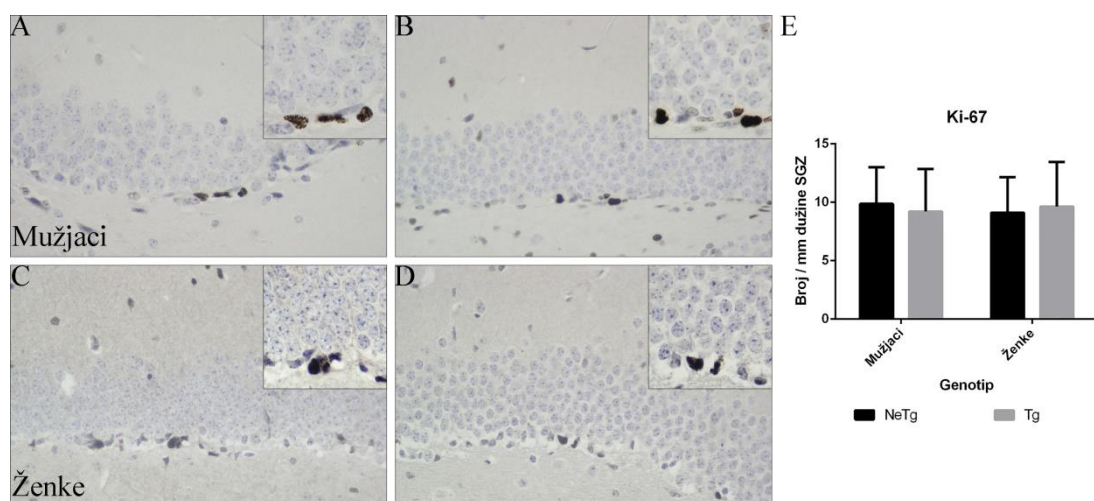
Adultna neurogeneza u hipokampusu, tj. formiranje novih granularnih neurona u DG, predstavlja seriju događaja koja podrazumeva asimetričnu deobu i samoobnavljanje ćelija, i dalje migraciju, diferencijaciju i maturaciju novonastalih ćelija (Kempermann, 2015). Deo eksperimentalnog istraživanja je stoga imao za cilj da ispita prvi korak u ovoj kaskadi događaja, a to je proces proliferacije ćelija u SGZ hipokampusa.

Analiziran je ukupan broj proliferišućih ćelija koje su bile pozitivne na Ki-67, protein koji je eksprimiran tokom čitavog procesa ćelijske deobe, tj. tokom svih aktivnih faza ćelijskog ciklusa (Kee i saradnici, 2002).

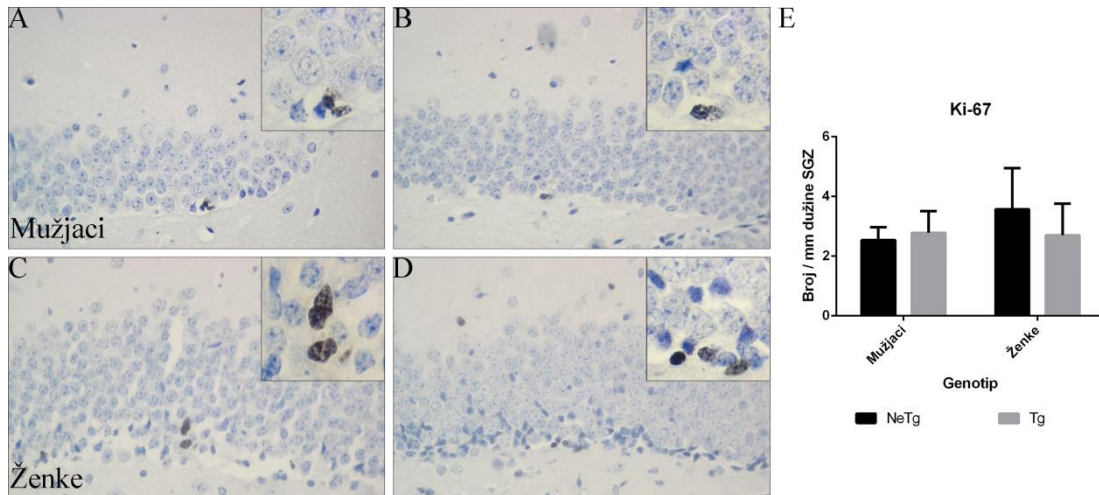
Kvantitativna analiza imunohistohemijskih rezultata pokazala je da ne postoje statistički značajne razlike u broju Ki-67 imunoreaktivnih ćelija između NeTg i Tg miševa oba pola, kako kod životinja starosti 6 nedelja ($F = 0,003$, $p > 0,05$) (Slika 15), tako i kod životinja starih 8 nedelja ($F = 0,366$, $p > 0,05$) (Slika 16) i 16 nedelja ($F = 3,943$, $p > 0,05$) (Slika 17). Analizom broja ćelija može se zapaziti izraziti pad u broju Ki-67 imunoreaktivnih ćelija u 16. nedelji starosti. Navedeni podaci ukazuju da proces ćelijske proliferacije nije oštećen kod 5xFAD animalnog modela AB, kako kod muških tako i kod ženskih jedinki.



Slika 15. Kvantitativna analiza Ki-67 imunoreaktivnih ćelija u subgranularnoj zoni hipokampusa netransgenih i transgenih 5xFAD miševa starosti 6 nedelja. A–D) Reprezentativne slike Ki-67 imunoreaktivnih ćelija NeTg (A) i Tg (B) mužjaka i NeTg (C) i Tg (D) ženki. E) Grafički prikaz broja Ki-67 imunoreaktivnih ćelija kod različitih grupa životinja. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Uvećanje objektiva: 40x (A, B, C, D); 100x pod imerzijom (uokvirene slike). Skraćenice: SGZ – subgranularna zona; NeTg – netransgeni miševi; Tg – transgeni miševi.



Slika 16. Kvantitativna analiza Ki-67 imunoreaktivnih ćelija u subgranularnoj zoni hipokampusa netransgenih i transgenih 5xFAD miševa starosti 8 nedelja. A–D) Reprezentativne slike Ki-67 imunoreaktivnih ćelija NeTg (A) i Tg (B) mužjaka i NeTg (C) i Tg (D) ženki. E) Grafički prikaz broja Ki-67 imunoreaktivnih ćelija kod različitih grupa životinja. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Uvećanje objektiva: 40x (A, B, C, D); 100x pod imerzijom (uokvirene slike). Skraćenice: SGZ – subgranularna zona; NeTg – netransgeni miševi; Tg – transgeni miševi.

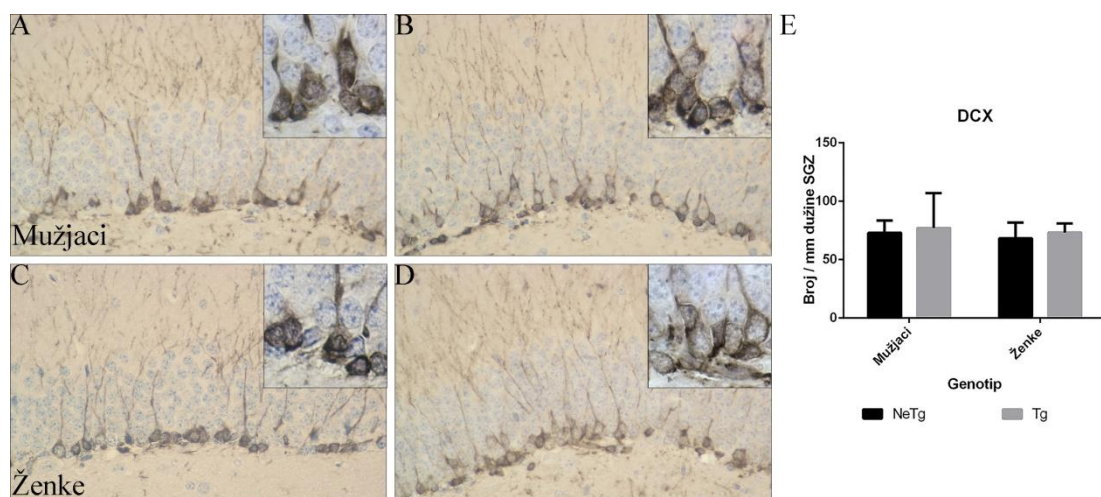


Slika 17. Kvantitativna analiza Ki-67 imunoreaktivnih ćelija u subgranularnoj zoni hipokampusa netransgenih i transgenih 5xFAD miševa starosti 16 nedelja. A–D) Reprezentativne slike Ki-67 imunoreaktivnih ćelija NeTg (A) i Tg (B) mužjaka i NeTg (C) i Tg (D) ženki. E) Grafički prikaz broja Ki-67 imunoreaktivnih ćelija kod različitih grupa životinja. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Uvećanje objektiva: 40x (A, B, C, D); 100x pod imerzijom (uokvirene slike). Skraćenice: SGZ – subgranularna zona; NeTg – netransgeni miševi; Tg – transgeni miševi.

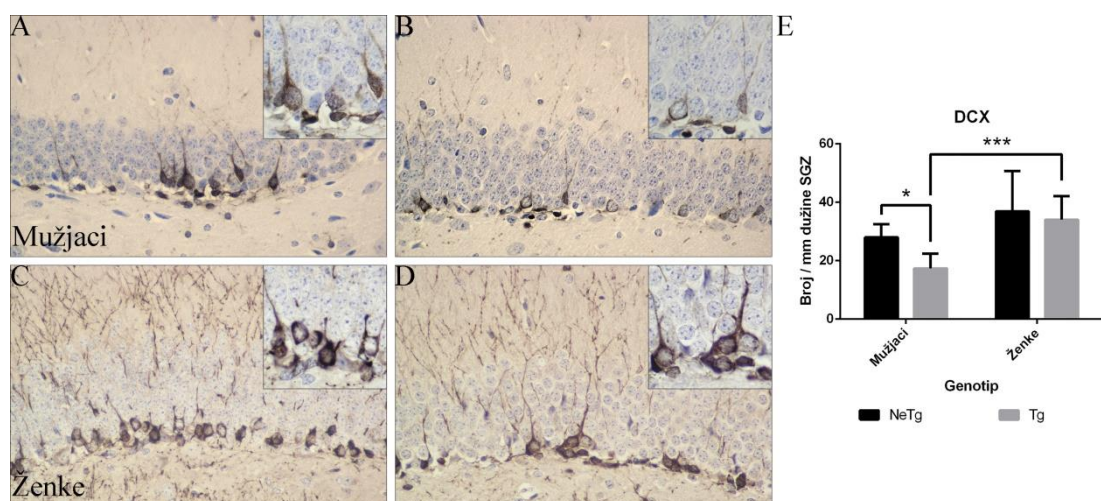
4.5. Analiza broja DCX imunoreaktivnih ćelija u subgranularnoj zoni hipokampusu.

U cilju detekcije neuroblasta i novostvorenih neurona, histološki preseki životinja su imunohistohemijski tretirani antitelom na DCX, protein asociran sa mikrotubulima koji se u toku procesa neurogeneze prolazno eksprimira u ovim formama nezrelih neurona (Couillard-Despres i saradnici, 2005; Varela-Nallar i saradnici, 2010; Winner i Winkler, 2015).

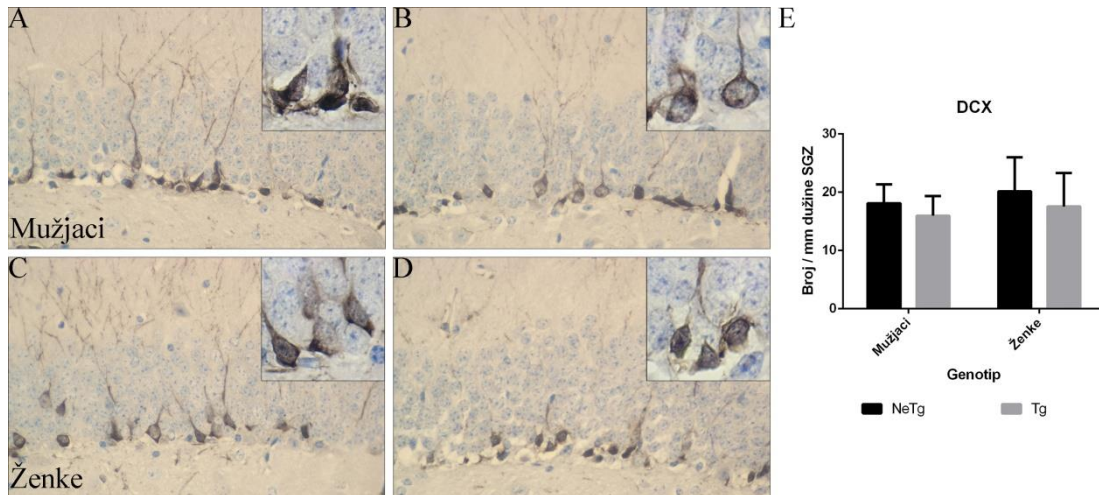
Rezultati analize broja DCX imunoreaktivnih ćelija pokazali su postojanje značajne statističke razlike samo kod mužjaka starosti 8 nedelja (NeTg vs. Tg: $27,98 \pm 4,57$ vs. $17,33 \pm 5,05$, $p \leq 0,05$). U ostalim starosnim grupama, naime, statistički značajna razlika između NeTg i Tg životinja nije utvrđena (Slike 18, 19, 20). Imunohistohemijsko bojenje takođe je pokazalo da kod ženki starosti 6 i 8 nedelja, bez obzira na njihov genotip, DCX imunoreaktivni neuroni imaju izraženije, duže i razgranatije dendrite, dok u 16 nedelji dominiraju ćelije sa slabije razvijenom dendritskom arborizacijom. Nasuprot ženkama, kod mužjaka je zabeležena brojnija populacija ćelija sa slabije razvijenom arborizacijom već u 8 nedelji, pa je samim tim u tom periodu najupečatljivija morfološka razlika u izgledu DCX pozitivnih ćelija između polova. Ovaj podatak ukazuje na potencijalni uticaj izvesnih polno-zavisnih faktora na proces diferencijacije i/ili preživljavanja neuroblasta/nezrelih neurona u različitim stadijumima diferencijacije i sazrevanja u hipokampusu (Slika 19).



Slika 18. Kvantitativna analiza DCX imunoreaktivnih ćelija u subgranularnoj zoni hipokampusa netransgenih i transgenih 5xFAD miševa starosti 6 nedelja. A–D) Reprezentativne slike DCX imunoreaktivnih ćelija NeTg (A) i Tg (B) mužjaka i NeTg (C) i Tg (D) ženki. E) Grafički prikaz broja DCX imunoreaktivnih ćelija kod različitih grupa životinja. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Uvećanje objektiva: 40x (A, B, C, D); 100x pod imerzijom (uokvirene slike). Skraćenice: DCX – eng. *doublecortin*; dablkortin; SGZ – subgranularna zona; NeTg – netransgeni miševi; Tg – transgeni miševi.



Slika 19. Kvantitativna analiza DCX imunoreaktivnih ćelija u subgranularnoj zoni hipokampusa netransgenih i transgenih 5xFAD miševa starosti 8 nedelja. A–D) Reprezentativne slike DCX imunoreaktivnih ćelija NeTg (A) i Tg (B) mužjaka i NeTg (C) i Tg (D) ženki. E) Grafički prikaz broja DCX imunoreaktivnih ćelija kod različitih grupa životinja. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Uvećanje objektiva: 40x (A, B, C, D); 100x pod imerzijom (uokvirene slike). Skraćenice: DCX – eng. *doublecortin*; dablkortin; SGZ – subgranularna zona; NeTg – netransgeni miševi; Tg – transgeni miševi. * $\leq 0,05$; *** $\leq 0,001$.



Slika 20. Kvantitativna analiza DCX imunoreaktivnih ćelija u subgranularnoj zoni hipokampusa netransgenih i transgenih 5xFAD miševa starosti 16 nedelja. A–D) Reprezentativne slike DCX imunoreaktivnih ćelija NeTg (A) i Tg (B) mužjaka i NeTg (C) i Tg (D) ženki. E) Grafički prikaz broja DCX imunoreaktivnih ćelija kod različitih grupa životinja. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Uvećanje objektiva: 40x (A, B, C, D); 100x pod imerzijom (uokvirene slike). Skraćenice: DCX – eng. *doublecortin*; dablkortin; SGZ – subgranularna zona; NeTg – netransgeni miševi; Tg – transgeni miševi.

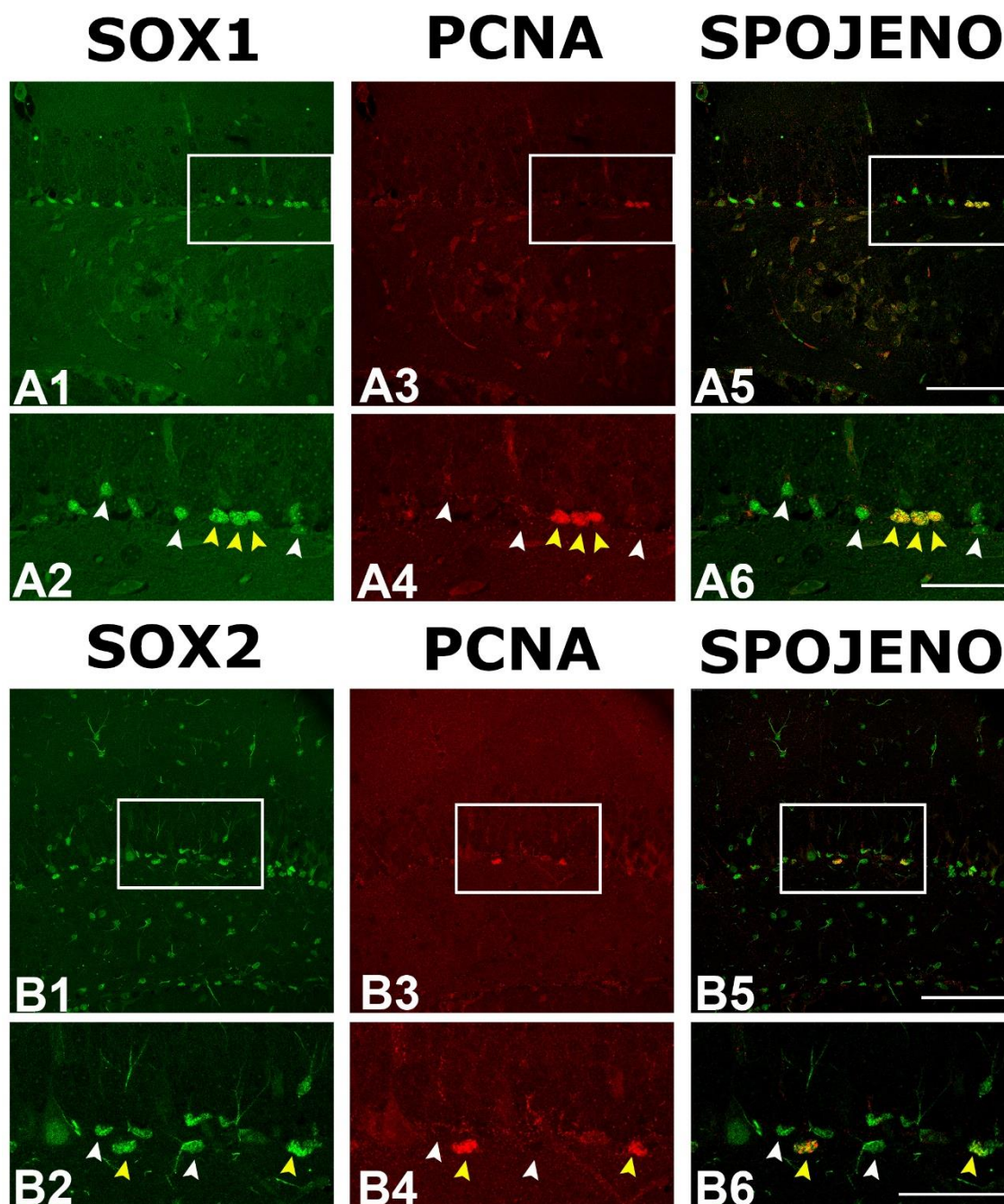
4.6. Imunofluorescentna detekcija ekspresije SOX1 i SOX2 proteina u subgranularnoj zoni hipokampusa

S obzirom da dostupni podaci ukazuju na ekspresiju SOXB proteina unutar SGZ hipokampusa u populaciji NSPCs, sledeći deo eksperimentalnog istraživanja imao je za cilj da ispita kakav je obrazac ekspresije ovih proteina u proliferišućim ćelijama i nezrelim neuronima u našim uzorcima. Duplo imunofluorescentno bojenje je urađeno korišćenjem sledećih kombinacija markera: SOX1/PCNA, SOX2/PCNA i SOX1/DCX.

Rezultati ispitivanja ekspresije SOX1 proteina unutar proliferišućih ćelija pokazala su da se mala populacija ćelija u SGZ nalazi u stadijumu proliferacije, tj. da pokazuje PCNA imunopozitivnost. Međutim, sve ove proliferišuće ćelije pokazivale su i imunoreaktivnost na SOX1 protein (Slika 21, A1–A6).

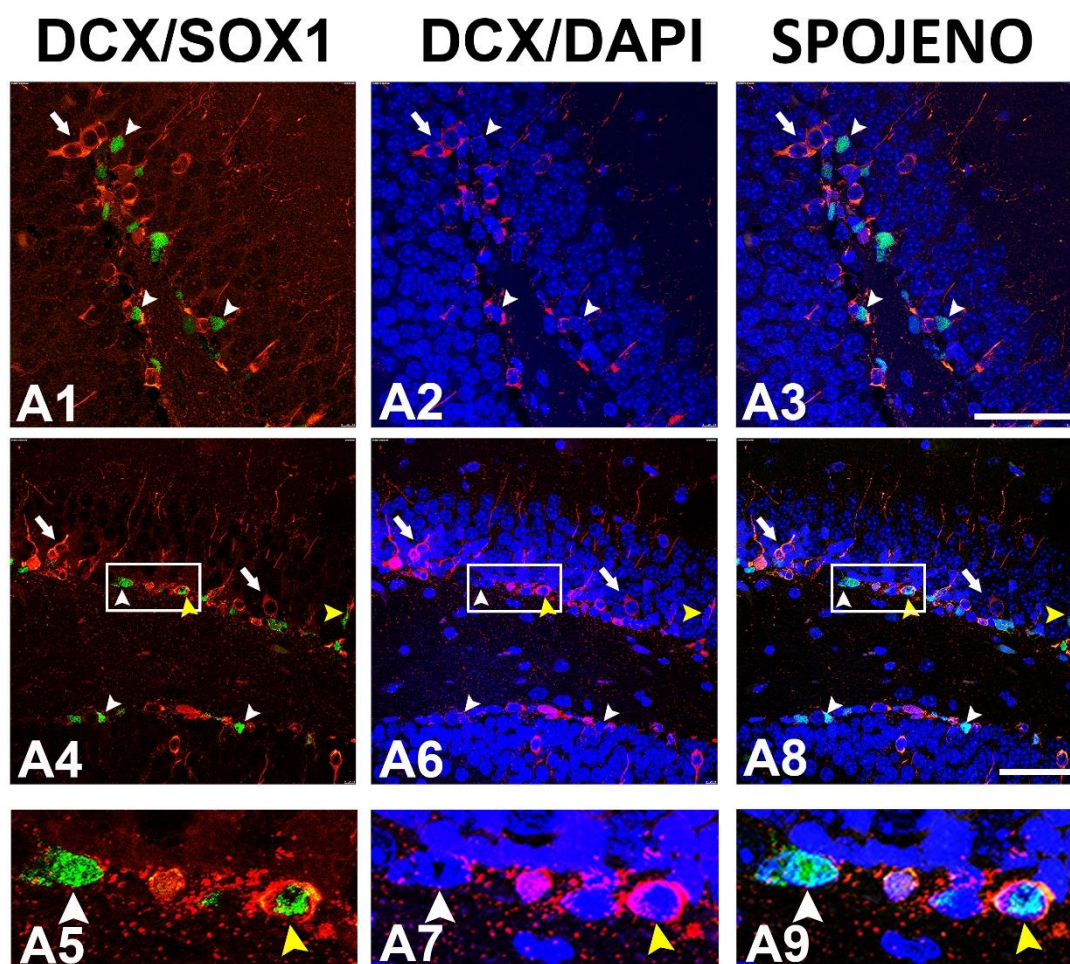
Sledeći korak podrazumevao je i analizu ekspresije SOX1 proteina u neuroblastima i nezrelim neuronima, koji su identifikovani bojenjem na protein DCX. Rezultati imunofluorescentnog ispitivanja SOX1/DCX koekspresije pokazali su da je samo mali broj ćelija pokazivao pozitivnost na oba markera, dok je većina SOX1 imunoreaktivnih ćelija bila negativna na DCX protein (Slika 22, A1–A6).

Rezultati ispitivanja ekspresije SOX2 proteina pokazala su različit nivo ekspresije ovog proteina u ćelijama SGZ hipokampusa. Nivo ekspresije SOX2 proteina u nekim ćelijama bio je umeren, dok je u drugim bio veoma visok. Isključivo u ćelijama u kojima je detektovan visok nivo SOX2 proteina istovremeno je detektovana i ekspresija PCNA proteina (Slika 21, B1–B6).



Slika 21. Imunofluorescentna detekcija ekspresije SOX1 i SOX2 proteina u proliferišućim ćelijama subgranularne zone hipokampusa. Reprezentativne slike koronarnih preseka u nivou dorzalnog hipokampusa kontrolnih miševa obojenih anti-SOX1 (A1, A2), anti-SOX2 (B1, B2) i anti-PCNA (A3, A4, B3, B4) antitelima, slikanih pod konfokalnim mikroskopom. Kolona SPOJENO (slike A5, A6, B5, B6) čine slike koje su dobijene međusobnim preklapanjem signala prethodno navedenih antitela. Uokvireni regioni na slikama A1, A3, A5, B1, B3, B5 predstavljani su uvećano na slikama A2, A4, A6, B2, B4 i B6, tim redom. Bele strelice na slikama A2, A4 i A6 pokazuju na ćelije koje su imunoreaktivne na SOX1, dok bele strelice na slikama B2, B4, B6 pokazuju ćelije koje su imunoreaktivne na SOX2. Žute strelice na slikama A2,

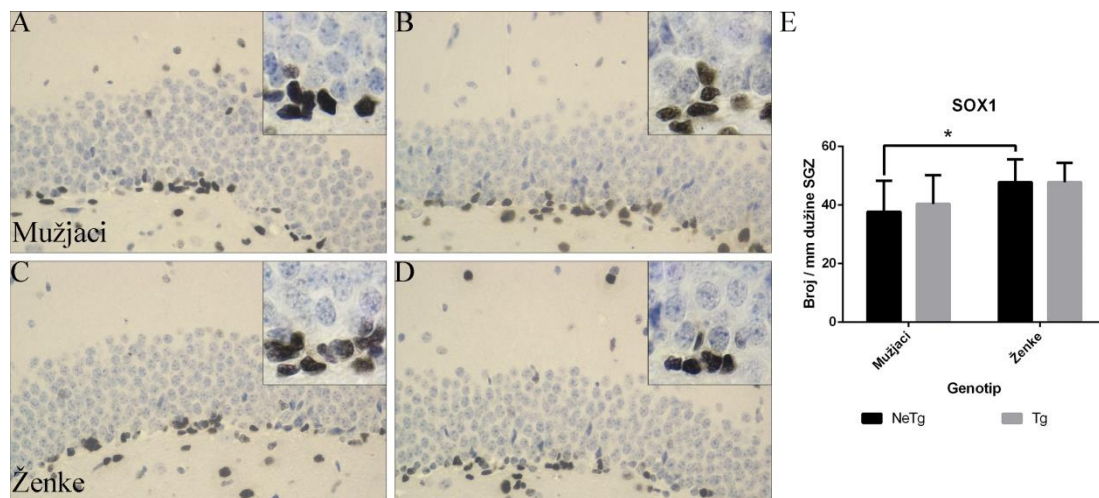
A4, A6, B2, B4, B6 pokazuju ćelije koje su pozitivne na oba proteina (SOX1 ili SOX2 i PCNA). Razmernik: 100 μm . Skraćenice: SOX1 – eng. *SRY Related High Mobility Group Box 1*; SOX2 – eng. *SRY Related High Mobility Group Box 2*; PCNA – eng. *proliferating cell nuclear antigen*; jedarni antigen proliferišućih ćelija.



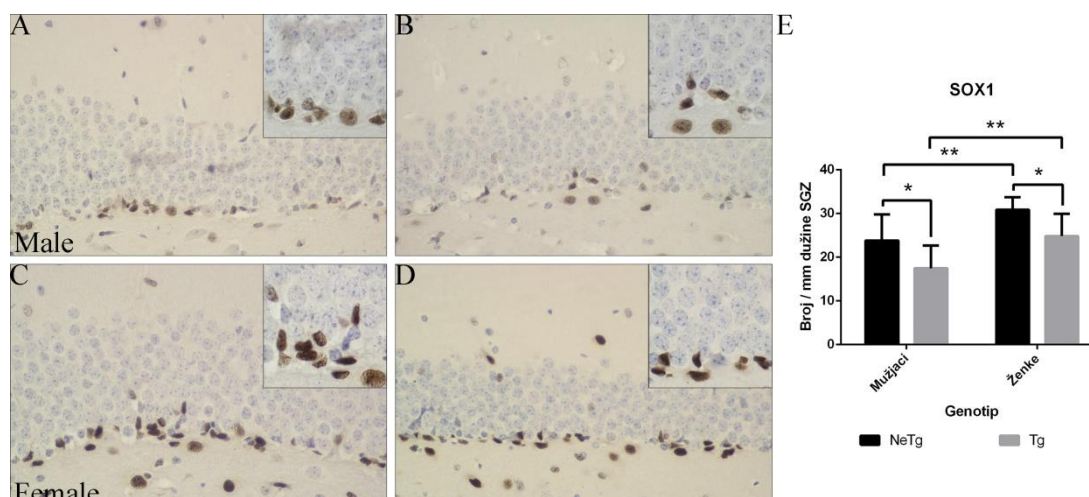
Slika 22. Imunofluorescentna detekcija ekspresije SOX1 proteina u neuroblastima/nezrelim granularnim ćelijama hipokampusa. Reprezentativne slike koronarnih preseka u nivou dorzalnog hipokampusa kontrolnih miševa obojenih anti-SOX1 i anti-DCX antitelima (A1–A9) slikanih pod konfokalnim mikroskopom. Kolonu SPOJENO (slike A3, A8, A9) čine slike koje su dobijene međusobnim preklapanjem signala prethodno navedenih antitela. Uokvireni regioni na slikama A4, A6, A8 predstavljeni su uvećano na slikama A5, A7, A9, tim redom. Glave belih strelica pokazuju na ćelije koje su imunoreaktivne na SOX1, dok bele strelice pokazuju ćelije koje su imunoreaktivne na DCX. Glave žutih strelica pokazuju ćelije koje su pozitivne na oba proteina. Jedra ćelija su kontrastirana sa diamidinofenilindolom (DAPI). Razmernik: 100 μm . Skraćenice: SOX1 – eng. *SRY Related High Mobility Group Box 1*; DCX – eng. *doublecortin*; dablkortin; DAPI – diamidinofenilindol.

4.7. Analiza broja SOX1 imunoreaktivnih ćelija u subgranularnoj zoni hipokampusa.

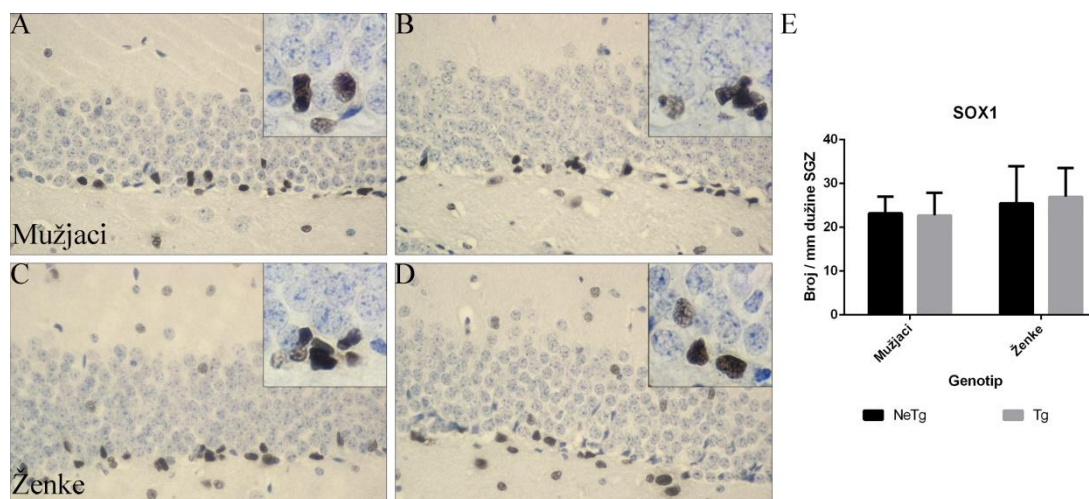
Kvantitativna imunohistohemijska analiza ekspresije SOX1 proteina pokazala je statistički značajno smanjenje broja SOX1 imunoreaktivnih ćelija kod 5xFAD miševa u odnosu na njihove NeTg kontrole kako kod mužjaka (NeTg vs. Tg: $23,83 \pm 6,00$ vs. $17,47 \pm 5,20$, $p \leq 0,05$) tako i kod ženki (NeTg vs. Tg: $30,88 \pm 2,87$ vs. $24,83 \pm 5,11$, $p \leq 0,05$) starosti 8 nedelja (Slika 24). Veći broj SOX1 ćelija zabeležen je kod ženki miševa oba genotipa, nego kod mužjaka, i to u sve tri ispitivane starosne grupe. Međutim, statistički značajna razlika zabeležena je samo kod miševa starosti 8 nedelja (NeTg mužjaci vs. NeTg ženke: $23,83 \pm 6,00$ vs. $30,88 \pm 2,87$, $p \leq 0,01$; Tg mužjaci vs. Tg ženke: $17,47 \pm 5,20$ vs. $24,83 \pm 5,11$, $p \leq 0,01$) i kod NeTg miševa starosti 6 nedelja (mužjaci vs. ženke: $37,74 \pm 10,53$ vs. $47,78 \pm 7,79$, $p \leq 0,05$) (Slika 23).



Slika 23. Kvantitativna analiza SOX1 imunoreaktivnih ćelija u subgranularnoj zoni hipokampusa netransgenih i transgenih 5xFAD miševa starosti 6 nedelja. A–D) Reprezentativne slike SOX1 imunoreaktivnih ćelija NeTg (A) i Tg (B) mužjaka i NeTg (C) i Tg (D) ženki. E) Grafički prikaz broja SOX1 imunoreaktivnih ćelija kod različitih grupa životinja. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Uvećanje objektiva: 40x (A, B, C, D); 100x pod imerzijom (uokvirene slike). Skraćenice: SGZ – subgranularna zona; NeTg – netransgeni miševi; Tg – transgeni miševi; SOX1 – eng. *SRY Related High Mobility Group Box 1*. * $\leq 0,05$.



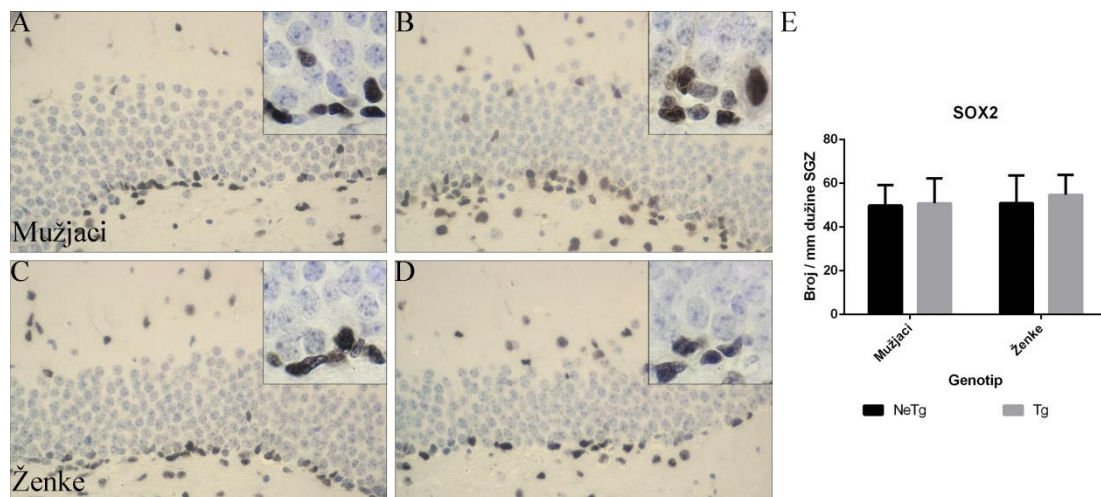
Slika 24. Kvantitativna analiza SOX1 imunoreaktivnih ćelija u subgranularnoj zoni hipokampusa netransgenih i transgenih 5xFAD miševa starosti 8 nedelja. A–D) Reprezentativne slike SOX1 imunoreaktivnih ćelija NeTg (A) i Tg (B) mušjaka i NeTg (C) i Tg (D) ženki. E) Grafički prikaz broja SOX1 imunoreaktivnih ćelija kod različitih grupa životinja. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Uvećanje objektiva: 40x (A, B, C, D); 100x pod imerzijom (uokvirene slike). Skraćenice: SGZ – subgranularna zona; NeTg – netransgeni miševi; Tg – transgeni miševi; SOX1 – eng. *SRY Related High Mobility Group Box 1*. * $\leq 0,05$; ** $\leq 0,01$.



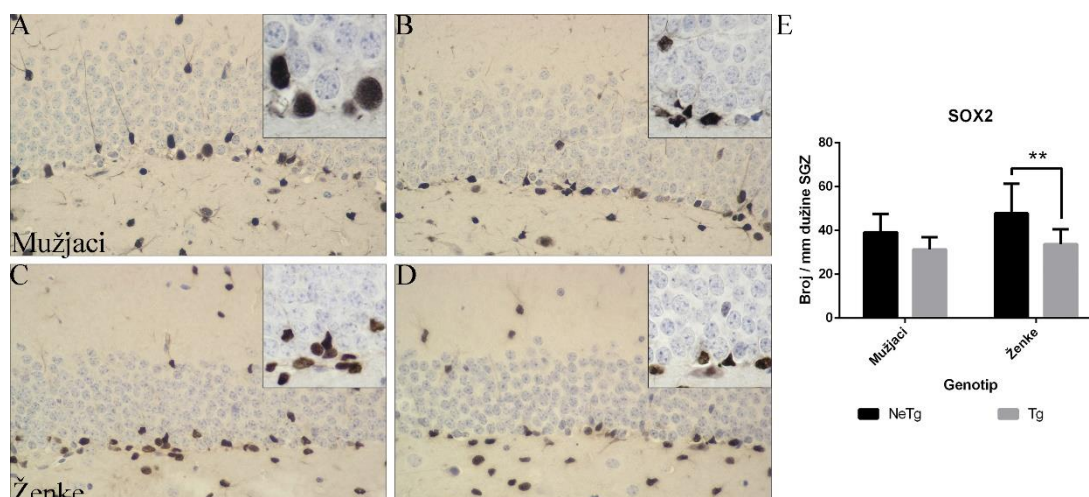
Slika 25. Kvantitativna analiza SOX1 imunoreaktivnih ćelija u subgranularnoj zoni hipokampusa netransgenih i transgenih 5xFAD miševa starosti 16 nedelja. A–D) Reprezentativne slike SOX1 imunoreaktivnih ćelija NeTg (A) i Tg (B) mušjaka i NeTg (C) i Tg (D) ženki. E) Grafički prikaz broja SOX1 imunoreaktivnih ćelija kod različitih grupa životinja. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Uvećanje objektiva: 40x (A, B, C, D); 100x pod imerzijom (uokvirene slike). Skraćenice: SGZ – subgranularna zona; NeTg – netransgeni miševi; Tg – transgeni miševi; SOX1 – eng. *SRY Related High Mobility Group Box 1*.

4.8. Analiza broja SOX2 imunoreaktivnih ćelija u subgranularnoj zoni hipokampusa.

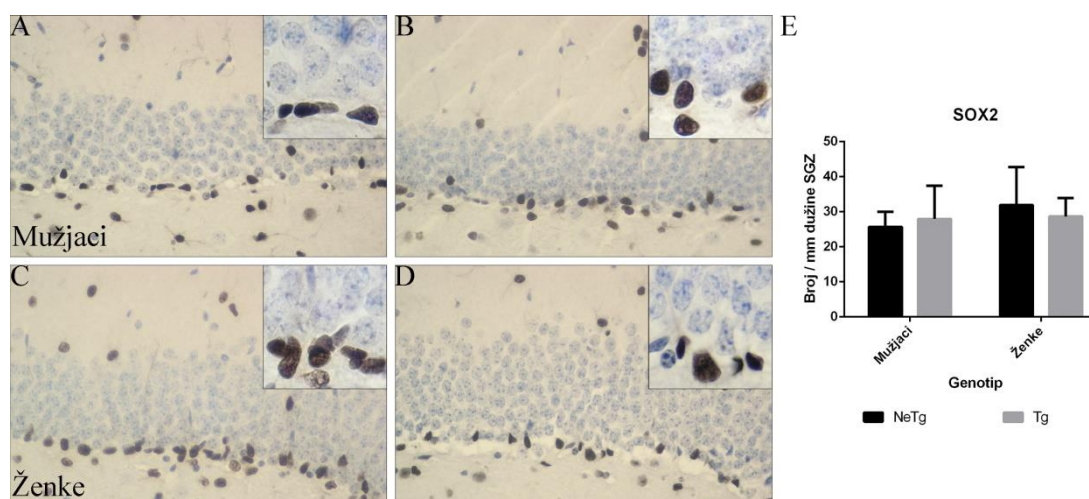
Imunohistohemijska analiza SOX2 proteina u SGZ hipokampusa kontrolnih i 5xFAD miševa različite starosti i pola pokazala je postojanje statistički značajne razlike u broju SOX2 imunoreaktivnih ćelija samo kod ženki miševa starosti 8 nedelja (NeTg vs. Tg: 47.83 ± 13.48 vs. 33.73 ± 6.81 , $p \leq 0,01$) (Slika 27). Postojanje statistički značajne razlike nije pokazano kod miševa starosti 6 i 16 nedelja, što ukazuje na to da je od analiziranih SOX proteina najmanje varijacija u broju imunoreaktivnih ćelija prisutno kod ćelija koje eksprimiraju SOX2 protein (Slike 26 i 28).



Slika 26. Kvantitativna analiza SOX2 imunoreaktivnih ćelija u subgranularnoj zoni hipokampusa netransgenih i transgenih 5xFAD miševa starosti 6 nedelja. A–D) Reprezentativne slike SOX2 imunoreaktivnih ćelija NeTg (A) i Tg (B) mužjaka i NeTg (C) i Tg (D) ženki. E) Grafički prikaz broja SOX2 imunoreaktivnih ćelija kod različitih grupa životinja. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Uvećanje objektiva: 40x (A, B, C, D); 100x pod imerzijom (uokvirene slike). Skraćenice: SGZ – subgranularna zona; NeTg – netransgeni miševi; Tg – transgeni miševi; SOX2 – eng. *SRY Related High Mobility Group Box 2*.



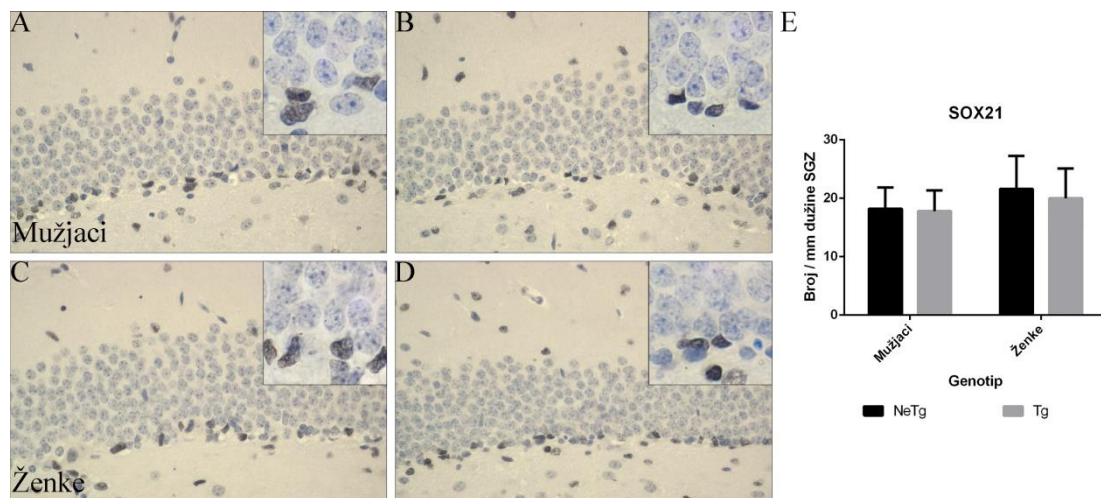
Slika 27. Kvantitativna analiza SOX2 imunoreaktivnih ćelija u subgranularnoj zoni hipokampusa netransgenih i transgenih 5xFAD miševa starosti 8 nedelja. A–D) Reprezentativne slike SOX2 imunoreaktivnih ćelija NeTg (A) i Tg (B) mužjaka i NeTg (C) i Tg (D) ženki. E) Grafički prikaz broja SOX2 imunoreaktivnih ćelija kod različitih grupa životinja. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Uvećanje objektiva: 40x (A, B, C, D); 100x pod imerzijom (uokvirene slike). Skraćenice: SGZ – subgranularna zona; NeTg – netransgeni miševi; Tg – transgeni miševi; SOX2 – eng. *SRY Related High Mobility Group Box 2*. ** $\leq 0,01$.



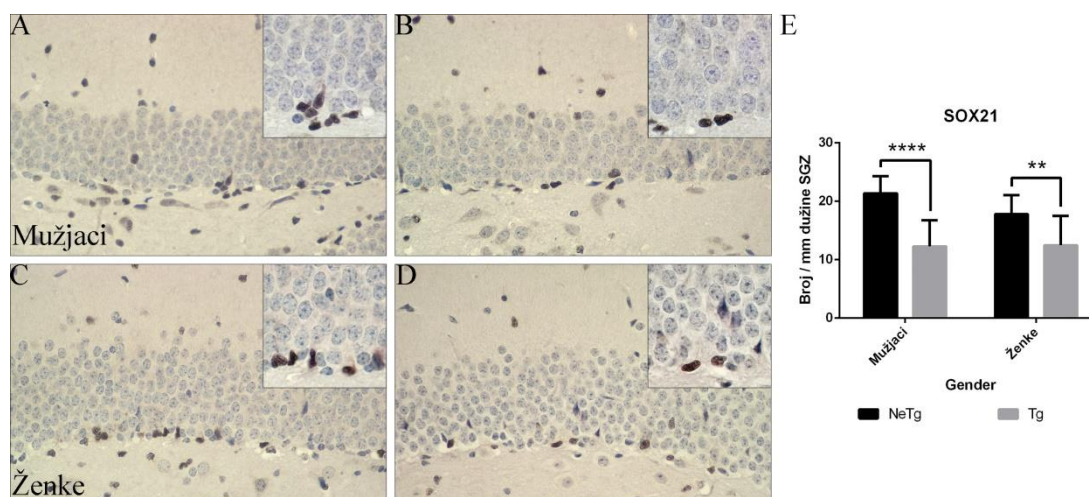
Slika 28. Kvantitativna analiza SOX2 imunoreaktivnih ćelija u subgranularnoj zoni hipokampusa netransgenih i transgenih 5xFAD miševa starosti 16 nedelja. A–D) Reprezentativne slike SOX2 imunoreaktivnih ćelija NeTg (A) i Tg (B) mužjaka i NeTg (C) i Tg (D) ženki. E) Grafički prikaz broja SOX2 imunoreaktivnih ćelija kod različitih grupa životinja. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Uvećanje objektiva: 40x (A, B, C, D); 100x pod imerzijom (uokvirene slike). Skraćenice: SGZ – subgranularna zona; NeTg – netransgeni miševi; Tg – transgeni miševi; SOX2 – eng. *SRY Related High Mobility Group Box 2*.

4.9. Analiza broja SOX21 imunoreaktivnih ćelija u subgranularnoj zoni hipokampusa.

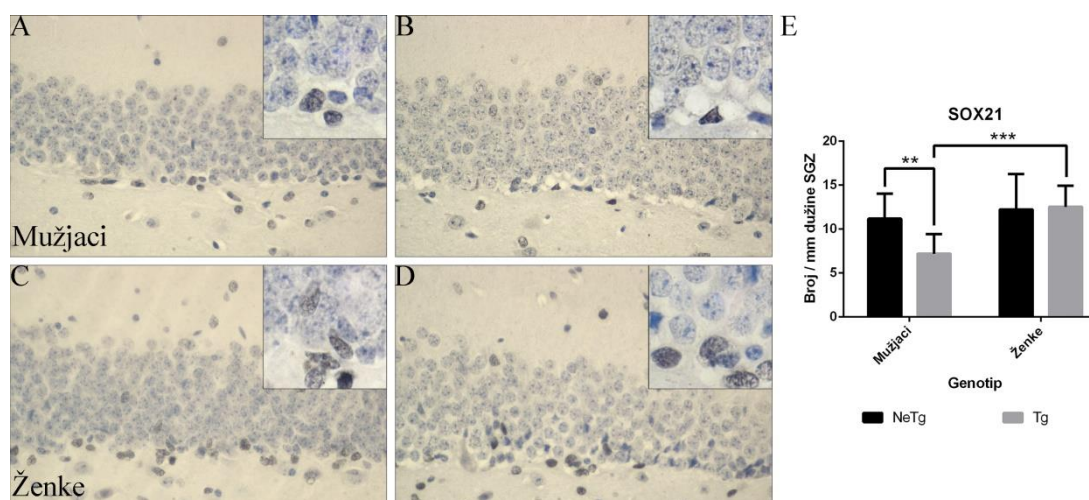
Poslednji u nizu analiziranih SOX proteina bio je SOX21 protein, čija je ekspresija neophodna za pravilno odvijanje procesa proliferacije neuroblasta i diferencijacije neurona. Imunohistohemijska analiza pokazala je smanjenje broja SOX21 imunoreaktivnih ćelija u SGZ hipokampusa kod 5xFAD miševa starosti 8 nedelja u odnosu na njihove NeTg parnjake i to kako kod mužjaka (NeTg vs. Tg: $21,36 \pm 2,95$ vs. $12,25 \pm 4,48$, $p \leq 0,0001$), tako i kod jedinki ženskog pola (NeTg vs. Tg: $17,79 \pm 3,27$ vs. $12,47 \pm 5,03$, $p \leq 0,01$) (Slika 30). Statistički značajna razlika pokazana je i kod miševa starosti 16 nedelja, ali samo kod muških jedinki (NeTg vs. Tg: $11,19 \pm 2,84$ vs. $7,19 \pm 2,25$, $p \leq 0,01$) (Slika 31). Kod životinja starosti 6 nedelja nije utvrđena statistički značajna razlika između životinja različitog pola i genotipa (Slika 29).



Slika 29. Kvantitativna analiza SOX21 imunoreaktivnih ćelija u subgranularnoj zoni hipokampusa netransgenih i transgenih 5xFAD miševa starosti 6 nedelja. A–D) Reprezentativne slike SOX21 imunoreaktivnih ćelija NeTg (A) i Tg (B) mužjaka i NeTg (C) i Tg (D) ženki. E) Grafički prikaz broja SOX21 imunoreaktivnih ćelija kod različitih grupa životinja. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Uvećanje objektiva: 40x (A, B, C, D); 100x pod imerzijom (uokvirene slike). Skraćenice: SGZ – subgranularna zona; NeTg – netransgeni miševi; Tg – transgeni miševi; SOX2 – eng. *SRY Related High Mobility Group Box 21*.



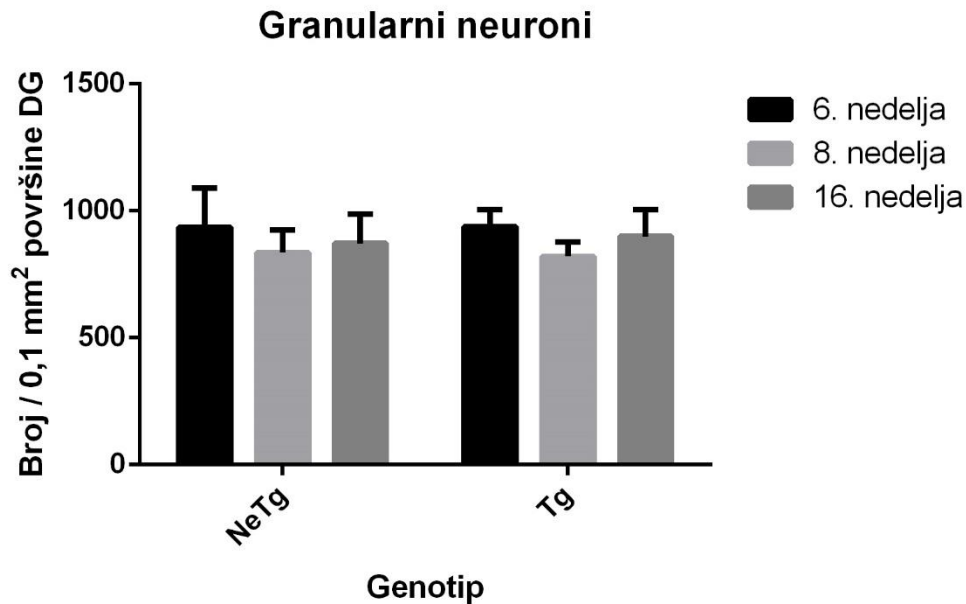
Slika 30. Kvantitativna analiza SOX21 imunoreaktivnih ćelija u subgranularnoj zoni hipokampusa netransgenih i transgenih 5xFAD miševa starosti 8 nedelja. A–D) Reprezentativne slike SOX21 imunoreaktivnih ćelija NeTg (A) i Tg (B) mušjaka i NeTg (C) i Tg (D) ženki. E) Grafički prikaz broja SOX21 imunoreaktivnih ćelija kod različitih grupa životinja. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Uvećanje objektiva: 40x (A, B, C, D); 100x pod imerzijom (uokvirene slike). Skraćenice: SGZ – subgranularna zona; NeTg – netransgeni miševi; Tg – transgeni miševi; SOX2 – eng. *SRY Related High Mobility Group Box 21*. ** $\leq 0,01$; **** $\leq 0,0001$.



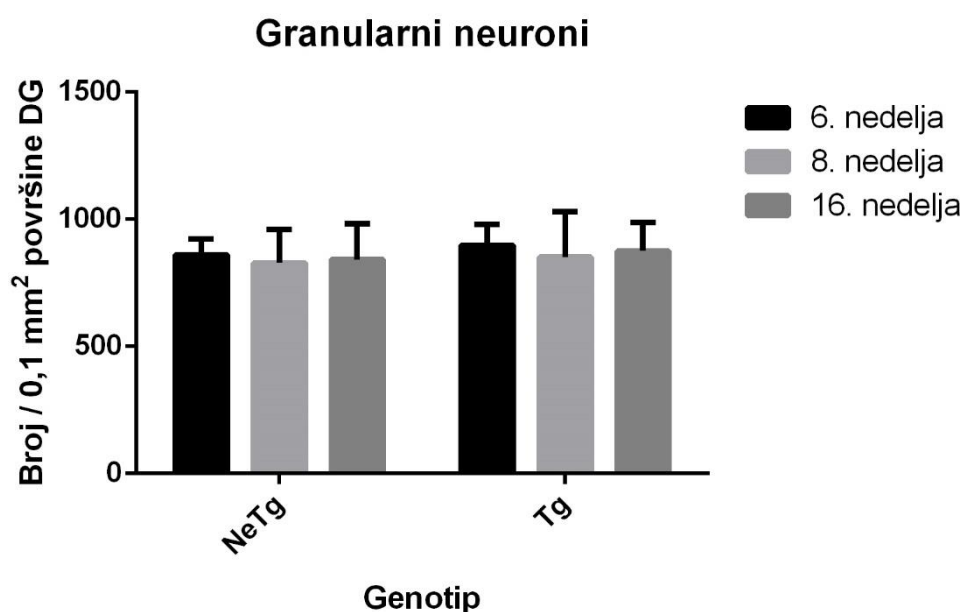
Slika 31. Kvantitativna analiza SOX21 imunoreaktivnih ćelija u subgranularnoj zoni hipokampusa netransgenih i transgenih 5xFAD miševa starosti 16 nedelja. A–D) Reprezentativne slike SOX21 imunoreaktivnih ćelija NeTg (A) i Tg (B) mušjaka i NeTg (C) i Tg (D) ženki. E) Grafički prikaz broja SOX21 imunoreaktivnih ćelija kod različitih grupa životinja. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Uvećanje objektiva: 40x (A, B, C, D); 100x pod imerzijom (uokvirene slike). Skraćenice: SGZ – subgranularna zona; NeTg – netransgeni miševi; Tg – transgeni miševi; SOX2 – eng. *SRY Related High Mobility Group Box 21*. ** $\leq 0,01$; *** $\leq 0,001$.

4.10. Poređenje broja granularnih neurona između životinja različite starosti

Određivanje ukupnog broja granularnih neurona vizuelizovanih NeuN markerom unutar DG hipokampusa nije pokazalo promenu broja ovih neurona tokom procesa starenja kako kod mužjaka ($F = 6,65$; $p > 0,05$) (grafikon 4), tako i kod ženki analiziranih miševa ($F = 0,61$; $p > 0,05$) (grafikon 5).



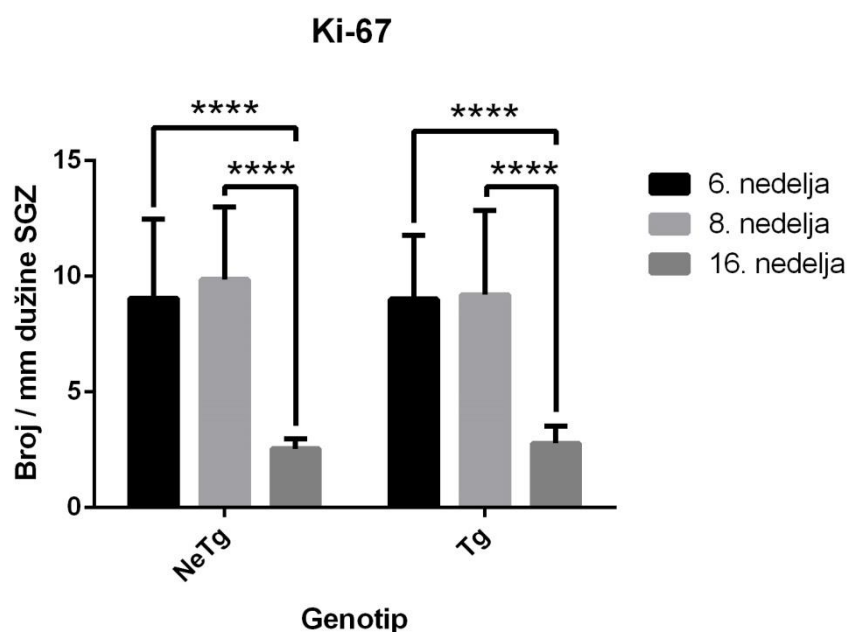
Grafikon 4. Broj granularnih neurona u dentatnom girusu hipokampusa netransgenih i transgenih mužjaka 5xFAD miševa različite starosti. Skraćenice: DG – dentatni girus; NeTg – netransgeni miševi; Tg – transgeni miševi.



Grafikon 5. Broj granularnih neurona u dentatnom girusu hipokampusa netransgenih i transgenih ženki 5xFAD miševa različite starosti. Skraćenice: DG – dentatni girus; NeTg – netransgeni miševi; Tg – transgeni miševi.

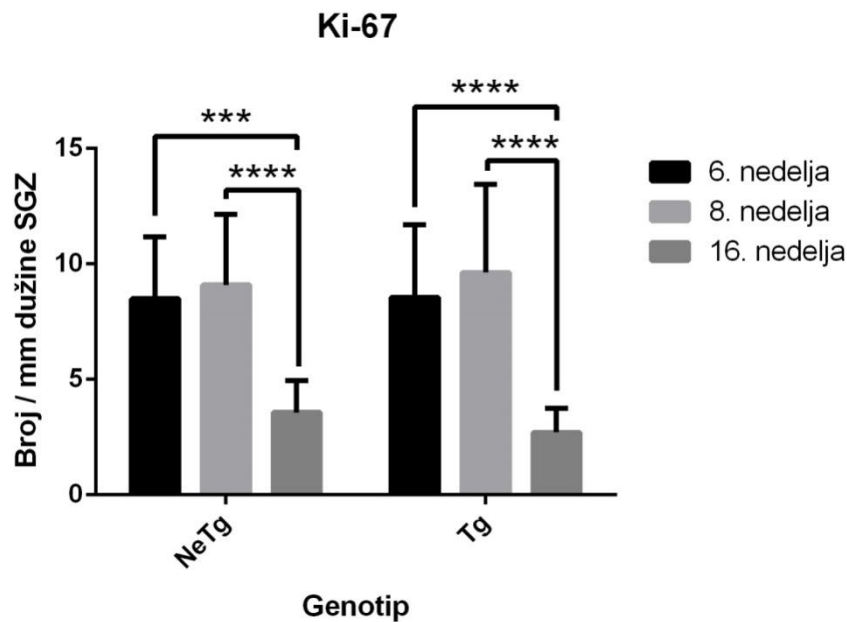
4.11. Poređenje broja Ki-67 imunoreaktivnih ćelija između životinja različite starosti

Rezultati poređenja brojeva Ki-67 imunoreaktivnih ćelija u SGZ hipokampusa kod životinja različite starosti pokazali su da se njihov broj statistički značajno razlikuje kod mužjaka istih genotipova ($F = 48,88$, $p \leq 0,0001$) i to između mužjaka starosti 6 i 16 nedelja (NeTg vs. NeTg: $9,05 \pm 3,43$ vs. $2,54 \pm 0,43$, $p \leq 0,0001$; Tg vs. Tg: $9,02 \pm 2,75$ vs. $2,78 \pm 0,73$, $p \leq 0,0001$) i starosti 8 i 16 nedelja (NeTg vs. NeTg: $9,87 \pm 3,14$ vs. $2,54 \pm 0,43$, $p \leq 0,0001$; Tg vs. Tg: $9,2 \pm 3,7$ vs. $2,78 \pm 0,73$; $p \leq 0,0001$) (Grafikon 6).



Grafikon 6. Broj Ki-67 imunoreaktivnih ćelija u subgranularnoj zoni hipokampusa netransgenih i transgenih mužjaka 5xFAD miševa različite starosti. Skraćenice: SGZ – subgranularna zona; NeTg – netransgeni miševi; Tg – transgeni miševi. **** $\leq 0,0001$.

Slični rezultati dobijeni su i analizom broja Ki-67 imunoreaktivnih ćelija kod ženki miševa različite starosti ($F = 37,43$, $p \leq 0,0001$). Statistički značajna razlika dobijena je između ženki starosti 6 i 16 nedelja (NeTg vs. NeTg: $8,49 \pm 2,68$ vs. $3,57 \pm 1,38$, $p \leq 0,0001$; Tg vs. Tg: $8,56 \pm 3,14$ vs. $2,7 \pm 1,06$, $p \leq 0,0001$) i starosti 8 i 16 nedelja (NeTg vs. NeTg: $9,1 \pm 3,05$ vs. $3,57 \pm 1,38$, $p \leq 0,0001$; Tg vs. Tg: $9,63 \pm 3,82$ vs. $2,7 \pm 1,06$, $p \leq 0,0001$) (Grafikon 7). Analizirajući broj Ki-67 imunoreaktivnih ćelija može se primetiti njihov izrazit pad kod životinja starosti 16 nedelja, pri čemu ovaj pad iznosi čak oko 70% u odnosu na broj ćelija koji je prisutan kod jedinki starosti 6 i 8 nedelja.

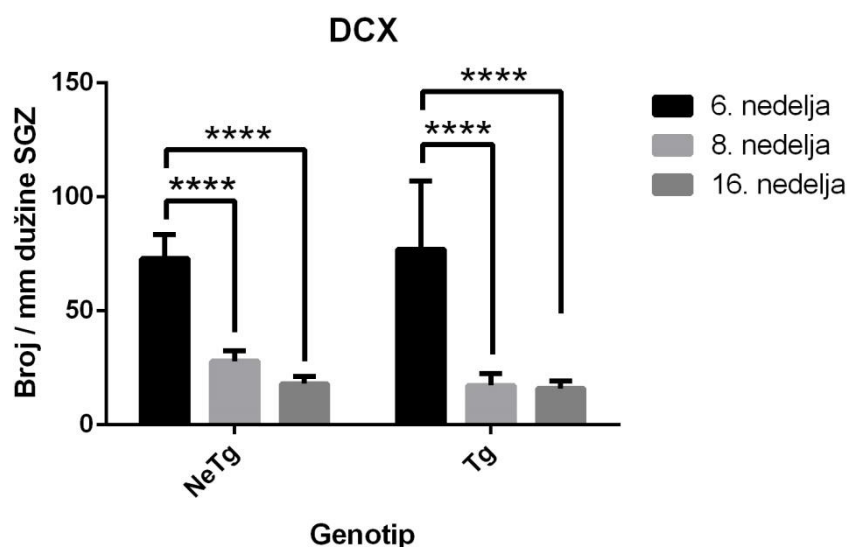


Grafikon 7. Broj Ki-67 imunoreaktivnih ćelija u subgranularnoj zoni hipokampusa netransgenih i transgenih ženki 5xFAD miševa različite starosti. Skraćenice: SGZ – subgranularna zona; NeTg – netransgeni miševi; Tg – transgeni miševi. *** $\leq 0,001$; **** $\leq 0,0001$.

4.12. Poređenje broja DCX imunoreaktivnih ćelija između životinja različite starosti

Upoređivanjem broja DCX imunoreaktivnih ćelija u SGZ hipokampusa kod životinja različite starosti pokazano je da se njihov broj statistički značajno razlikuje kod mužjaka istih genotipova ($F = 136,1$, $p \leq 0,0001$) i to između mužjaka starosti 6 i 8 nedelja (NeTg vs. NeTg: $72,93 \pm 10,62$ vs. $27,98 \pm 4,57$, $p \leq 0,0001$; Tg vs. Tg: $77,05 \pm 29,99$ vs. $17,33 \pm 5,05$, $p \leq 0,0001$) i starosti 6 i 16 nedelja (NeTg vs. NeTg: $72,93 \pm 10,62$ vs. $18,12 \pm 3,22$, $p \leq 0,0001$; Tg vs. Tg: $77,05 \pm 29,99$ vs. $15,97 \pm 3,38$; $p \leq 0,0001$) (Grafikon 8).

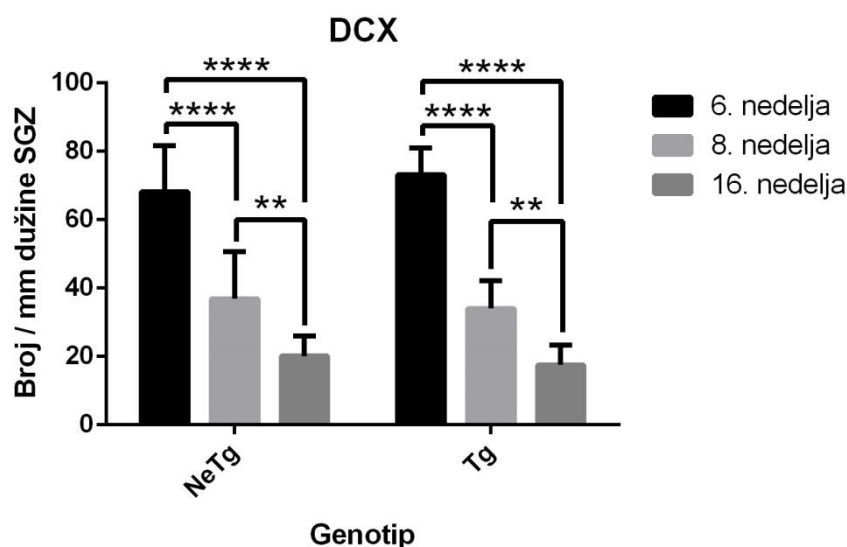
Analizom promene broja DCX imunoreaktivnih ćelija sa starenjem može se primetiti da nakon 6 nedelje starosti dolazi do izrazitog pada u broju nezrelih neurona unutar DG (od 60 do 80% u zavisnosti od genotipa), dok period nakon 8. nedelje karakteriše manje izražen pad u broju ovih ćelija kod životinja oba genotipa.



Grafikon 8. Broj DCX imunoreaktivnih ćelija u subgranularnoj zoni hipokampusa netransgenih i transgenih mužjaka 5xFAD miševa različite starosti. Skraćenice: SGZ – subgranularna zona; NeTg – netransgeni miševi; Tg – transgeni miševi. **** $\leq 0,0001$.

Analizom broja DCX imunoreaktivnih ćelija kod ženki miševa različite starosti takođe je pokazana razlika i uzrasno-zavisno smanjenje broja nezrelih neurona ($F = 178,6$, $p \leq 0,0001$). Statistički značajna razlika dobijena između ženki starosti 6 i 8 nedelja (NeTg vs. NeTg: $68,18 \pm 13,46$ vs. $36,88 \pm 13,81$, $p \leq 0,0001$; Tg vs. Tg: $73,23 \pm 7,83$ vs. $34,02 \pm 8,07$, $p \leq 0,0001$), starosti 6 i 16 nedelja (NeTg vs. NeTg: $68,18 \pm 13,46$ vs. $20,16 \pm 5,83$, $p \leq 0,0001$; Tg vs. Tg: $73,23 \pm 7,83$ vs. $17,53 \pm 5,75$, $p \leq 0,0001$), kao i starosti 8 i 16 nedelja (NeTg vs. NeTg: $36,88 \pm 13,81$ vs. $20,16 \pm 5,83$, $p \leq 0,01$; Tg vs. Tg: $34,07 \pm 8,07$ vs. $17,53 \pm 5,75$, $p \leq 0,01$) (Grafikon 9).

Nagli pad u broju DCX imunoreaktivnih ćelija nakon 6. nedelje života jedinki prisutan je i kod ženki analiziranih miševa i kreće se oko 50% kako za NeTg, tako i za Tg životinje. Međutim, sličan procentualni pad prisutan je i kada se uporede ženke starosti 8 i 16 nedelja, što ukazuje na ravnomerno i kontinuirano opadanje nivoa neurogeneze sa starenjem kod jedinki ženskog pola.



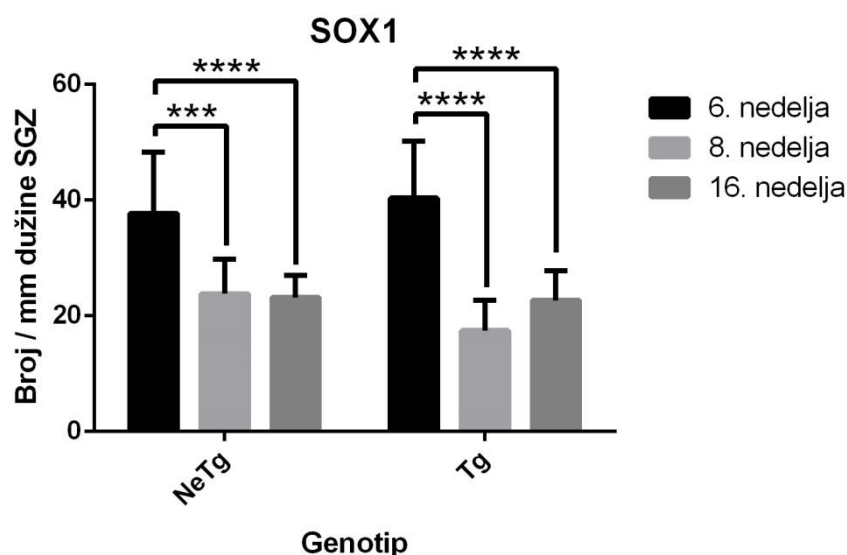
Grafikon 9. Broj DCX imunoreaktivnih ćelija u subgranularnoj zoni hipokampusa netransgenih i transgenih ženki 5xFAD miševa različite starosti. Skraćenice: SGZ – subgranularna zona; NeTg – netransgeni miševi; Tg – transgeni miševi. ** $\leq 0,01$; **** $\leq 0,0001$.

4.13. Poređenje broja SOX1 imunoreaktivnih ćelija između životinja različite starosti

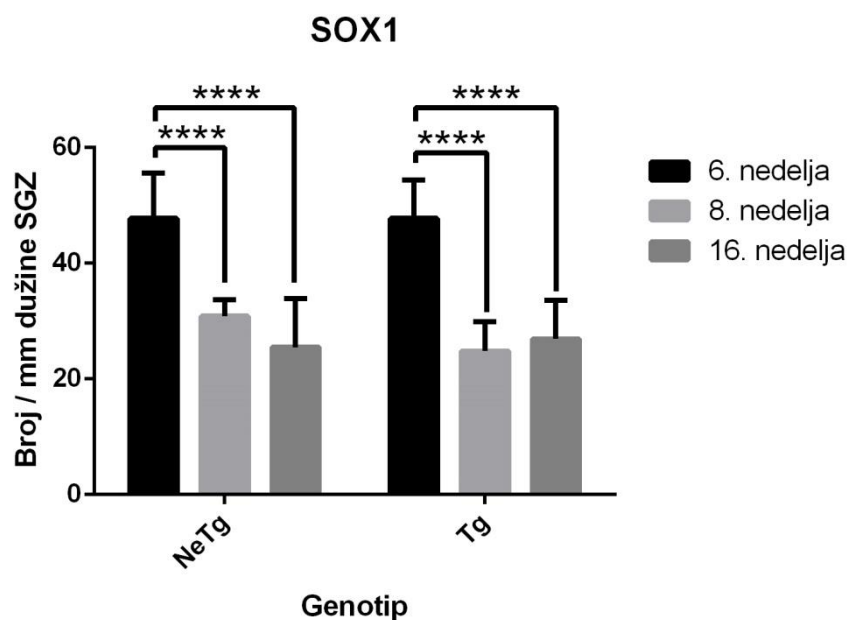
Imunohistohemijaska analiza SOX1 proteina u SGZ hipokampusa tokom starenja pokazala je smanjenje broja SOX1 imunoreaktivnih neurona kako kod mužjaka ($F = 46,44$, $p \leq 0,0001$), tako i kod ženki miševa oba genotipa ($F = 81,53$, $p \leq 0,0001$).

Kod mužjaka miševa statistički značajna razlika otkrivena je između životinja starosti 6 i 8 nedelja (NeTg vs. NeTg: $37,74 \pm 10,53$ vs. $23,83 \pm 6,00$, $p \leq 0,001$; Tg vs. Tg: $40,38 \pm 9,87$ vs. $17,47 \pm 5,19$, $p \leq 0,0001$), kao i između životinja starosti 6 i 16 nedelja (NeTg vs. NeTg: $37,74 \pm 10,53$ vs. $23,20 \pm 3,80$, $p \leq 0,0001$; Tg vs. Tg: $40,38 \pm 9,87$ vs. $22,68 \pm 5,16$, $p \leq 0,0001$) (Grafikon 10).

Iste promene zabeležene su i između ženki miševa starosti 6 i 8 nedelja (NeTg vs. NeTg: $47,78 \pm 7,79$ vs. $30,88 \pm 2,87$, $p \leq 0,0001$; Tg vs. Tg: $47,76 \pm 6,64$ vs. $24,83 \pm 5,11$, $p \leq 0,0001$), kao i između 6 i 16 nedelja starosti (NeTg vs. NeTg: $47,78 \pm 7,79$ vs. $25,48 \pm 8,46$, $p \leq 0,0001$; Tg vs. Tg: $47,76 \pm 6,64$ vs. $26,95 \pm 6,62$, $p \leq 0,0001$) (Grafikon 11). Nakon 6. nedelje starosti, evidentan je izrazit pad u broju ćelija, koji se nakon 8. nedelje starosti gubi kod životinja oba pola i genotipa.



Grafikon 10. Broj SOX1 imunoreaktivnih ćelija u subgranularnoj zoni hipokampusa netransgenih i transgenih mužjaka 5xFAD miševa različite starosti. Skraćenice: SGZ – subgranularna zona; NeTg – netransgeni miševi; Tg – transgeni miševi. SOX1 – eng. *SRY Related High Mobility Group Box 1*. *** $\leq 0,001$; **** $\leq 0,0001$.



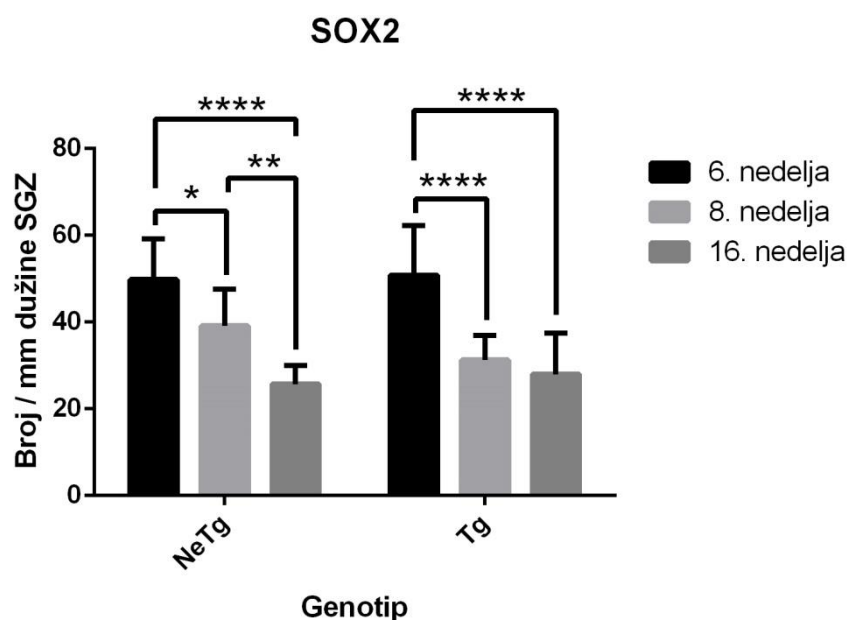
Grafikon 11. Broj SOX1 imunoreaktivnih ćelija u subgranularnoj zoni hipokampusa netransgenih i transgenih ženki 5xFAD miševa različite starosti. Skraćenice: SGZ – subgranularna zona; NeTg – netransgeni miševi; Tg – transgeni miševi. SOX1 – eng. *SRY Related High Mobility Group Box 1*. **** $\leq 0,0001$.

4.14. Poređenje broja SOX2 imunoreaktivnih ćelija između životinja različite starosti

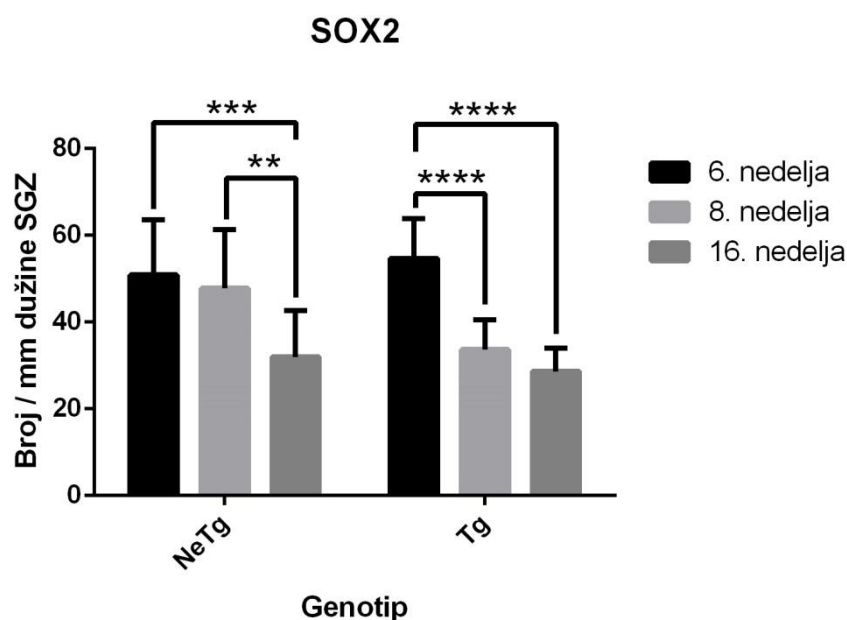
Analiza broja SOX2 imunoreaktivnih ćelija u SGZ hipokampusa tokom starenja pokazala je smanjenje broja ovih ćelija i kod mužjaka ($F = 47,82$, $p \leq 0,0001$) i kod ženki miševa ($F = 29,48$, $p \leq 0,0001$) oba genotipa, s tim što je kod ženki miševa pokazana i statistički značajna interakcija između genotipa i starosti ($F = 4,73$, $p \leq 0,05$).

Kod mužjaka miševa statistički značajna razlika otkrivena je između životinja starosti 6 i 8 nedelja (NeTg vs. NeTg: $49,86 \pm 9,34$ vs. $39,19 \pm 8,41$, $p \leq 0,05$; Tg vs. Tg: $50,85 \pm 11,43$ vs. $31,3 \pm 5,6$, $p \leq 0,0001$), 6 i 16 nedelja (NeTg vs. NeTg: $49,86 \pm 9,34$ vs. $25,68 \pm 4,29$, $p \leq 0,0001$; Tg vs. Tg: $50,85 \pm 11,43$ vs. $27,93 \pm 9,5$, $p \leq 0,0001$) i 8 i 16 nedelja (NeTg vs. NeTg: $39,19 \pm 8,41$ vs. $25,68 \pm 4,29$, $p \leq 0,01$) (Grafikon 12).

Slične promene zabeležene su i između ženki miševa starosti 6 i 16 nedelja oba genotipa (NeTg vs. NeTg: $50,88 \pm 12,75$ vs. $31,96 \pm 10,77$, $p \leq 0,001$; Tg vs. Tg: $54,69 \pm 9,13$ vs. $28,66 \pm 5,28$, $p \leq 0,0001$), između NeTg jedinki starosti 8 i 16 nedelja (NeTg vs. NeTg: $47,83 \pm 13,48$ vs. $31,96 \pm 10,77$, $p \leq 0,01$), kao i između Tg jedinki starosti 6 i 8 nedelja (Tg vs. Tg: $54,69 \pm 9,13$ vs. $33,73 \pm 6,81$, $p \leq 0,0001$) (Grafikon 13). Za razliku od SOX1 proteina kod koga je izraziti pad u broju imunoreaktivnih ćelija prisutan kod oba genotipa, kod SOX2 proteina ovaj izrazit pad uočeno je samo kod Tg jedinki oba pola i iznosio je oko 40%.



Grafikon 12. Broj SOX2 imunoreaktivnih ćelija u subgranularnoj zoni hipokampusa netransgenih i transgenih mužjaka 5xFAD miševa različite starosti. Skraćenice: SGZ – subgranularna zona; NeTg – netransgeni miševi; Tg – transgeni miševi. SOX2 – eng. *SRY Related High Mobility Group Box 2*. * $\leq 0,05$; ** $\leq 0,01$; **** $\leq 0,0001$.



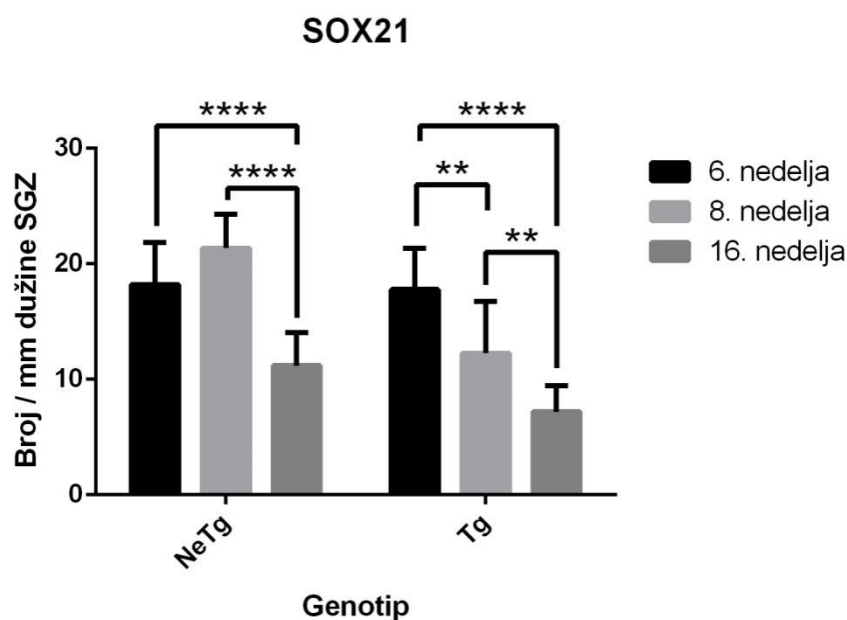
Grafikon 13. Broj SOX2 imunoreaktivnih ćelija u subgranularnoj zoni hipokampusa netransgenih i transgenih ženki 5xFAD miševa različite starosti. Skraćenice: SGZ – subgranularna zona; NeTg – netransgeni miševi; Tg – transgeni miševi. SOX2 – eng. *SRY Related High Mobility Group Box 2*. ** $\leq 0,01$; *** $\leq 0,001$; **** $\leq 0,0001$.

4.15. Poređenje broja SOX21 imunoreaktivnih ćelija između životinja različite starosti

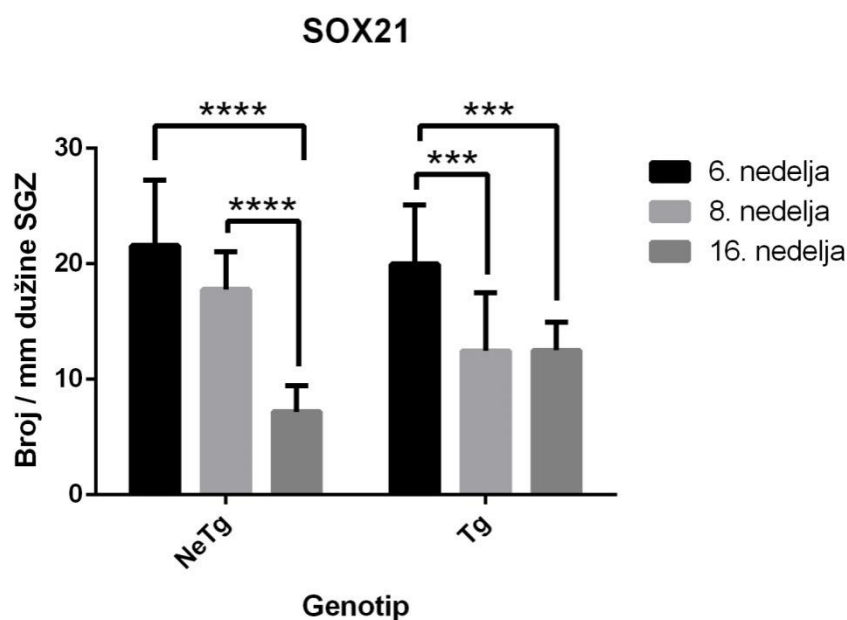
Analiza broja SOX21 imunoreaktivnih ćelija u SGZ hipokampusa tokom starenja pokazala je smanjenje broja ovih ćelija kako kod muških jedinki ($F = 48,55$, $p \leq 0,0001$), tako i kod ženki miševa ($F = 40,91$, $p \leq 0,0001$) oba genotipa. Kod oba pola pokazana je i statistički značajna interakcija između genotipa i starosti (mužjaci: $F = 10,13$, $p \leq 0,001$; ženke: $F = 10,01$, $p \leq 0,001$).

Kod analiziranih mužjaka miševa statistički značajna razlika utvrđena je između životinja starosti 6 i 16 nedelja (NeTg vs. NeTg: $18,21 \pm 3,63$ vs. $11,20 \pm 2,84$, $p \leq 0,0001$; Tg vs. Tg: $17,78 \pm 3,55$ vs. $7,20 \pm 2,25$, $p \leq 0,0001$), 8 i 16 nedelja (NeTg vs. NeTg: $21,36 \pm 2,95$ vs. $11,20 \pm 2,84$, $p \leq 0,0001$; Tg vs. Tg: $12,25 \pm 4,48$ vs. $7,20 \pm 2,25$, $p \leq 0,01$), kao i između Tg jedinki starosti 6 i 8 nedelja (Tg vs. Tg: $17,78 \pm 3,55$ vs. $12,25 \pm 4,48$, $p \leq 0,01$) (Grafikon 14).

Kod miševa ženskog pola statistički značajna razlika pokazana je između jedinki starosti 6 i 16 nedelja (NeTg vs. NeTg: $21,59 \pm 5,67$ vs. $7,19 \pm 2,25$, $p \leq 0,001$; Tg vs. Tg: $19,98 \pm 5,11$ vs. $12,52 \pm 2,41$, $p \leq 0,001$), između NeTg jedinki starosti 8 i 16 nedelja (NeTg vs. NeTg: $17,79 \pm 3,27$ vs. $7,19 \pm 2,25$, $p \leq 0,0001$), kao i između Tg jedinki starosti 6 i 8 nedelja (Tg vs. Tg: $19,98 \pm 5,11$ vs. $12,47 \pm 5,03$, $p \leq 0,001$) (Grafikon 15). Rezultati imunohistohemijske analize ekspresije SOX21 proteina kod Tg jedinki ženskog pola pokazuju rezultate koji odgovaraju imunohistohemijskoj ekspresiji SOX2 proteina kod jedinki istog pola i genotipa. Naime, i ovde je prisutan sličan stepen pada u broju SOX21 imunoreaktivnih neurona nakon 6. nedelje starosti (oko 40%) kod Tg jedinki, dok se u kasnijim uzrastima izraženiji pad SOX21 imunoreaktivnih neurona beleži kod NeTg jedinki oba pola.



Grafikon 14. Broj SOX21 imunoreaktivnih ćelija u subgranularnoj zoni hipokampusa netransgenih i transgenih mužjaka 5xFAD miševa različite starosti. Skraćenice: SGZ – subgranularna zona; NeTg – netransgeni miševi; Tg – transgeni miševi. SOX21 – eng. *SRY Related High Mobility Group Box 21*. ** $\leq 0,01$; **** $\leq 0,0001$.

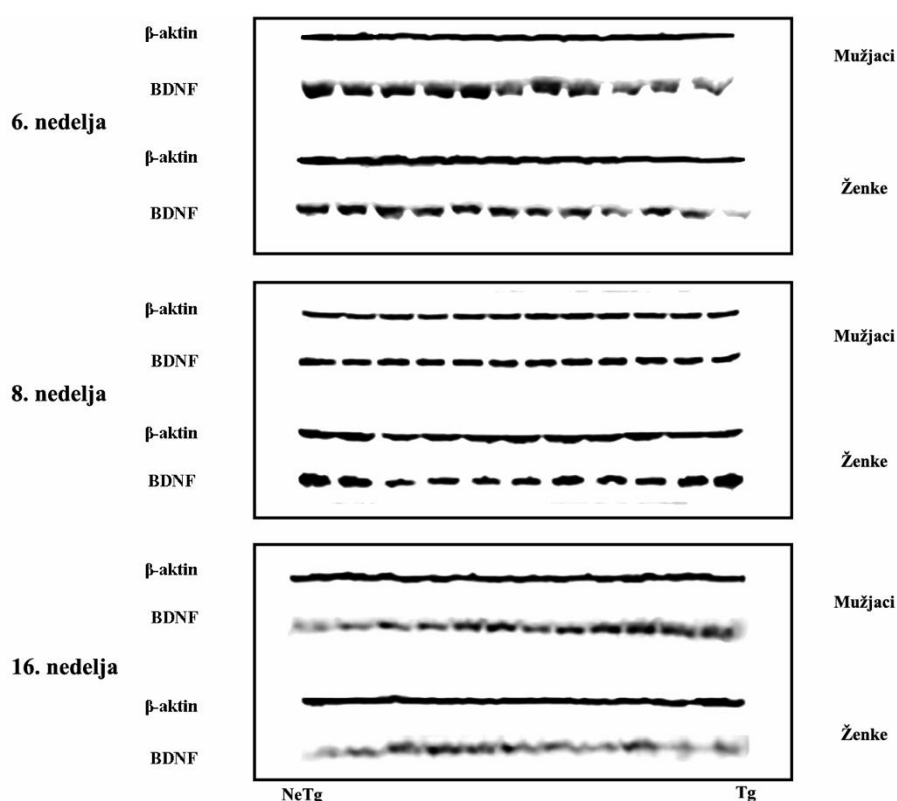


Grafikon 15. Broj SOX21 imunoreaktivnih ćelija u subgranularnoj zoni hipokampusa netransgenih i transgenih ženki 5xFAD miševa različite starosti. Skraćenice: SGZ – subgranularna zona; NeTg – netransgeni miševi; Tg – transgeni miševi. SOX21 – eng. *SRY Related High Mobility Group Box 21*. *** $\leq 0,001$; **** $\leq 0,0001$.

4.16. Imunoblot analiza BDNF proteina

BDNF je neurotrofički faktor uključen u regulaciju sinaptičke plastičnosti i dendritske arborizacije, kao i neurogeneze i preživljavanja neurona (Zaletel i saradnici, 2017). U cilju procene da li su nivoi ovog proteina promenjeni u hipokampusu 5xFAD Tg životinja, urađena je Western-Blot analiza homogenata hipokampusu.

Rezultat Western blot analize sugerise da kod miševa starosti 8 i 16 nedelja ne postoje razlike u nivou ekspresije BDNF proteina između NeTg i Tg jedinki (Slika 32). Takođe, rezultat analize miševa starosti 6 nedelja su ukazali na smanjen nivo ekspresije BDNF proteina kod Tg jedinki muškog pola u odnosu na kontrolne NeTg životinje (Slika 32).



Slika 32. Analiza ekspresije BDNF proteina u hipokampusu mužjaka i ženki 5xFAD miševa i njihovih netransgenih kontrola starosti 6, 8 i 16 nedelja primenom Western blot metode. Skraćenice: BDNF – eng. *brain-derived neurotrophic factor*; neurotrofički faktor poreklom iz mozga.

5. DISKUSIJA

Adultna neurogeneza u hipokampusu je dinamičan i veoma precizno organizovan proces, koji je podložan dejstvu različitih fizioloških, patoloških i farmakoloških stimulusa (Ming i Song, 2011). Produkcija novih neurona u direktnoj je vezi sa aktivnošću NSPCs u SGZ, a njihova proliferacija i diferencijacija nalazi se pod kontrolom brojnih proteina, među kojima važno mesto zauzimaju SOX transkripcioni faktori.

U ovoj studiji je po prvi put pokazano da se nivo ekspresije SOX1, SOX2 i SOX21 transkripcionih faktora u ćelijama SGZ hipokampusa 5xFAD miševa animalnog modela AB, menja u zavisnosti od pola i uzrasta ispitivanih životinja. Statistički značajno smanjenje u broju imunoreaktivnih SOX1, SOX2 i SOX21 ćelija utvrđeno je kod 8 nedelja starih 5xFAD Tg životinja oba pola u odnosu na njihove NeTg kontrole. U ovoj starosnoj grupi je, naime, kod Tg mužjaka, zabeležen izraziti pad u broju SOX1 i SOX21 imunoreaktivnih ćelija, koji je bio praćen smanjenjem broja DCX imunoreaktivnih neuroblasta, tj. nezrelih neurona. Sa druge strane, kod ženki miševa zabeleženo je statistički značajno smanjenje u broju SOX1, SOX2 i SOX21 imunoreaktivnih ćelija, dok je broj DCX imunoreaktivnih nezrelih neurona ostao nepromenjen između dva genotipa ženskih miševa. Iako je broj SOXB imunoreaktivnih ćelija bio značajno niži kod Tg životinja starosti 8 nedelja, proliferativni kapacitet ćelija koji je detektovan ekspresijom Ki-67 proteina ostao je nepromenjen kod Tg u odnosu na NeTg miševa oba pola. Kod životinja starosti 6 i 16 nedelja statistički značajna razlika u broju DCX i Ki-67 imunoreaktivnih ćelija nije detektovana između jedinki različitog pola i genotipa, dok su promene u broju SOXB imunoreaktivnih ćelija zabeležene samo za SOX21 transkripcioni faktor i to u vidu statistički značajnog smanjenja kod Tg mužjaka. Daljim analiziranjem promena u neurogenezi kod životinja različite starosti pokazano je da se proliferativni kapacitet, kao i broj nezrelih novoformiranih DCX imunoreaktivnih neurona, smanjuje kod starijih životinja, kao i da su ove promene prisutne kako kod NeTg, tako i kod Tg jedinki oba pola. Slični rezultati dobijeni su i kada je analizirana ekspresija SOXB transkripcionih faktora, gde je pokazano uzrasno-zavisno smanjenje u broju SOX1, SOX2 i SOX21 imunoreaktivnih ćelija u SGZ hipokampusa, nezavisno od pola i genotipa.

5xFAD miševi su Tg animalni model AB koji imitira asimptomatsku, prodromalnu, ali i simptomatsku fazu AB, u zavisnosti od starosti jedinke koja se koristi za potrebe eksperimentalnog istraživanja (Landel i saradnici, 2014). Poznato je, naime, da se depoziti A β kod ovog modela najpre javljaju u predelu subikuluma, nakon čega se ove promene javljaju u 5. lamini kore velikog mozga između 8. i 16. nedelje života (Oakley i saradnici, 2006). Upravo je kod 5xFAD miševa starih 16 nedelja opisana pojava i prvih promena u ponašanju, dok do gubitka neurona dolazi znatno kasnije, u 9. mesecu života (Oakley i saradnici, 2006). Naše istraživanje je potvrdilo prethodno publikovane rezultate (Oakley i saradnici, 2006; Moon i saradnici, 2014) da su amiloidni depoziti u velikom broju prisutni u hipokampusu, kao i dubokim slojevima kore velikog mozga životinja starih 16 nedelja. Detaljnija analiza distribucije plakova unutar DG hipokampusa miševa starosti 16 nedelja ukazala je da su plakovi predominantno bili lokalizovani u molekularnom sloju i hilusu, dok su u granularnom sloju i SGZ zabeleženi sporadični depoziti.

Eksperimentalni podaci pokazuju takođe da su amiloidna patologija i bihejvioralni deficiti izraženiji kod jedinki ženskog pola, što predstavlja važan podatak za istraživače koji se bave proučavanjem polno-zavisnih razlika kod AB (Oakley i saradnici, 2006; Devi i saradnici, 2010). Rezultati analize transkriptoma na 5xFAD modelu miševa pokazali su da se životinje 1. i 4. meseca života razlikuju u 2699 transkripta u hipokampusu, među kojima najveći broj kodira proteine koji učestvuju u neurorazvojn timer procesima (Bundy i saradnici, 2017). Od ovog broja 198 transkripta se razlikuje između mužjaka i ženki, pri čemu je ova varijacija izraženija kod starijih jedinki. Usporedna analiza transkriptoma koja je sproveo isti istraživački tim pokazala su da se u uzrastu od 2 meseca 5xFAD Tg i NeTg kontrolne životinje razlikuju u ekspresiji 42 gena, kao i da se ovaj broj povećava na 1316 različitih transkripta kod životinja starosti 4 meseca (Bundy i saradnici, 2018). Njihove varijacije su mnogo izraženije kod 5xFAD ženki, kod kojih je takođe pokazana i veća ekspresija transgenih gena koji su odgovorni za nastanak patologije 5xFAD modela. Prethodni rezultat upravo može objasniti postojanje polno-uzrokovanih razlika kod 5xFAD modela, kao i izraženije patologije koja se uočava kod ženskih jedinki. Takođe, ovi podaci ukazuju na značajnost polnih razlika koje postoje u postnatalnom razvoju hipokampusa i neophodnost da se u istraživanja molekularnih promena u hipokampusu uključe jedinke oba pola.

Značajnost korišćenja 5xFAD modela u istraživanju AB leži u činjenici da model omogućava proučavanje uticaja A β na gubitak neurona, kao i efekata neuroinflamacije na razvoj AB (Oakley i saradnici, 2006; Ardestani i saradnici, 2017). Kod 5xFAD životinja gubitak neurona nastaje znatno kasnije u životu jedinke, pa se prvi podaci o značajnoj redukciji piramidalnih neurona beleže u petoj lamini korteksa miševa starosti 9 meseci. U istom uzrastu, uočava se i gubitak neurona u hipokampusu, u regionu subikuluma. Smatra se da je ovaj gubitak neurona posledica intraneuralnog deponovanja A β i posledične aktivacije kaspaze-3 koja indukuje apoptozu neurona (Eimer i Vassar, 2013). Iako se u skladu sa patologijom AB može očekivati izražen gubitak neurona u različitim delovima mozga obolelih pacijenata, gubitak se dominantno uočava u korteksu i određenim regionima hipokampusa, kao što su subikulum i CA1 region (West i saradnici, 1994; Rössler i saradnici, 2002; Zarow i saradnici, 2005; Padurariu i saradnici, 2012). Gubitak neurona u CA1 regionu hipokampusa dovodi se i u vezu sa pojavom epileptičnih napada kod određenih tipova FAD (Velez-Pardo i saradnici, 2004). U našem radu nisu pokazane statistički značajne razlike u broju granularnih ćelija DG između NeTg i Tg životinja različitih starosti koje su ispitivane. Ovi rezultati su u skladu sa do sada dostupnim podacima, koji ukazuju da je gubitak neurona dominantan u CA regionu hipokampusa, odnosno da promene u drugim regionima, a pre svega u DG, nisu zabeležene. Jedno od retkih istraživanja u kome se analizirao broj granularnih neurona u DG hipokampusa kod Tg2576 miševa pokazalo je da ukupan broj ćelija u jednoj hemisferi hipokampusa ovog animalnog modela AB iznosi 445280 (Ihunwo i Schliebs, 2010). Ovaj broj neurona značajno je niži u odnosu na broj granularnih neurona koji se može pronaći kod genetski nemođifikovanih sojeva laboratorijskih miševa i drugih glodara. Međutim, rezultat je dobijen kod životinja starosti 16–18 meseci, što još jednom govori u prilog da neurodegenerativne promene u vidu gubitka neurona hipokampusa nastaju znatno kasnije u toku života jedinke.

Proces adultne neurogeneze je ispitivan kod različitih animalnih modela AB (Demars i saradnici, 2010; Unger i saradnici, 2016). U skladu sa rezultatima ovih studija, rani poremećaj neurogeneze na nivou hipokampusa, a pre pojave vidljivih A β agregata u DG, pokazan je i kod 5xFAD miševa (Moon i saradnici, 2014; Ziegler-Waldkirch i saradnici, 2018). Moon i saradnici (2014) pokazali su da kod Tg 5xFAD mužjaka, broj imunoreaktivnih DCX ćelija progresivno opada sa starenjem, počevši od 8. nedelje

života. Ovo smanjenje praćeno je istovremenim povećanjem amiloidnih depozita unutar hipokampusa, za koje se smatra da predstavljaju ključni faktor koji ometa normalno odvijanje procesa adultne neurogeneze (Martinez-Canabal, 2014). Novije studije na 5xFAD Tg životinjama dobijenim na drugačijoj C57BL/6J genetskoj osnovi, pokazale su, međutim, suprotne rezultate o promeni nivoa neurogeneze tokom starenja (Ziegler-Walldkirch i saradnici, 2018). Naime, kod Tg životinja starosti 4 meseca zabeleženo je statistički značajno povećanje broja DCX imunoreaktivnih nezrelih neurona na nivou SGZ hipokampusa, u odnosu na njihove NeTg kontrole. Sa druge strane, kod starijih životinja (8 meseci) broj DCX imunoreaktivnih neurona bio je izrazito smanjen kod Tg jedinki u odnosu na njihove kontrole (Ziegler-Walldkirch i saradnici, 2018). Određene studije na Tg animalnim modelima pokazale su, međutim, da amiloidni depoziti mogu čak i da povećaju proces neurogeneze (Jin i saradnici, 2004b; Yu i saradnici, 2009), dok druga istraživanja, uključujući i ovu studiju, ukazuju da je proces neurogeneze oštećen čak i pre pojave mikroskopski vidljivih depozita u hipokampusu (Unger i saradnici, 2016; Zaletel i saradnici, 2018). Samim tim, može se zaključiti da poremećaj procesa neurogeneze u najvećoj meri zavisi od samog modela na kome se fenomen ispituje, odnosno vrste mutacija koje su prisutne u određenom Tg modelu.

Rezultati našeg istraživanja stoga govore u prilog prethodno objavljenim rezultatima o smanjenju broja DCX imunoreaktivnih neurona kod Tg 5xFAD mužjaka, a u odnosu na NeTg kontrolne miševne starosti 8 nedelja. Analizom broja DCX imunoreaktivnih neurona kod životinja starih 6 i 16 nedelja nije pokazana statistički značajna razlika u broju nezrelih novoformiranih neurona između NeTg i Tg jedinki. Naše istraživanje je po prvi put ispitalo potencijalno oštećenje neurogeneze kod jedinki starosti 6 nedelja, što predstavlja period života u kome ne dolazi do formiranja mikroskopski vidljivih agregata A β na nivou hipokampusa. Može se zaključiti da u ovom periodu života jedinki proces adultne neurogeneze i dalje nije oštećen, ali da se već nakon dve nedelje života smanjenje broja DCX imunoreaktivnih neurona može detektovati kod Tg mužjaka. Sa druge strane, kod jedinki starih 16 nedelja takođe nije pokazana statistički značajna razlika između životinja različitog pola i genotipa. U svom radu Ziegler-Walldkirch i saradnici (2018) pokazali su da kod 5xFAD životinja starosti 6. nedelja ne postoji smanjenje nivoa neurogeneze, ali da u 4. mesecu dolazi do povećanja broja Ki-67 i DCX imunoreaktivnih neurona kod Tg u odnosu na NeTg životinje. Ovi rezultati su

u suprotnosti sa rezultatima Moon i saradnika (2014) koji su pokazali smanjenje broja DCX imunoreaktivnih neurona u uzrastu od 4. meseca, kao i sa našim rezultatima analize DCX i Ki-67 imunoreaktivnosti, gde statistički značajna razlika u ovom uzrasnom periodu nije detektovana. Prema Ziegler-Walldkirch i saradnicima (2018), ovo povećanje neurogeneze može da predstavlja kompenzatorni mehanizam zbog posledičnog gubitka neurona, što se viđa i kod ljudi obolelih od AB (Jin i saradnici, 2004a). Sa druge strane, redukcija ćelijske proliferacije i neurogeneze u uzrastu od 8 meseci je, prema autorima, u skladu sa povećanim A β opterećenjem, koje tokom vremena narušava proces adultne neurogeneze. Potencijalno objašnjenje za ove suprotnosti u rezultatima trebati tražiti u metodološkom pristupu, tj. razlici u genotipu miševa na kojima je 5xFAD linija napravljena, kao i imunohistohemijskoj metodologiji i načinima kvantifikacije imunoreaktivnih ćelija, koja se razlikovala između navedenih studija. U obzir svakako treba uzeti i postojanje varijacija između samih jedinki, tj. potencijalni uticaj epigenetskih faktora na razvoj adultne neurogeneze, a koji još nisu dovoljno proučeni. Izostanak razlike u broju Ki-67 imunoreaktivnih proliferišućih ćelija, uz postojanje razlike u broju novoformiranih neurona kod jedinki muškog pola starosti 8. nedelja može na prvi pogled delovati kao kontradiktoran rezultat. Međutim, treba imati na umu da Ki-67 imunoreaktivne ćelije predstavljaju heterogenu ćelijsku populaciju unutar SGZ hipokampusa koja se sastoji od glijalnih prekursornih ćelija i drugih ćelija prisutnih u nervnom sistemu (Nowak i saradnici, 2010). Iako se ove ćelije nalaze u stanju proliferacije, samo mali deo njih će svoj razvoj nastaviti u pravcu budućih granularnih neurona i time postati DCX imunoreaktivne. Tako proces ćelijske proliferacije unutar hipokampusa kod pacijenata obolelih od AB uglavnom dovodi do stvaranja mikroglije i astrocita lokalizovanih u blizini amiloidnih plakova (Marlatt i saradnici, 2014; Dard i saradnici, 2018). Moguće je da je kod 5xFAD modela oštećenje procesa proliferacije i diferencijacije NSPCs, praćeno kompenzatornom proliferacijom glija ćelija (Moon i saradnici, 2014; Toda i saradnici, 2018), do koje najverovatnije dolazi na mestima deponovanja amiloida (Marlatt i saradnici, 2014). U prilog ovome govore i studije u kojima su korišćeni knock-out modeli za *apoE* i *apoE4* gene, a kod kojih je zabeležena redukcija u neurogenezi, praćena kompenzatornim povećanjem gliogeneze (Li i saradnici, 2009; Toda i saradnici, 2018).

Rezultati dobijeni na različitim sojevima 5xFAD miševa govore u prilog da detektovane promene, smanjenje ili kompenzatorno povećanje procesa adultne neurogeneze kod animalnih modela AB, zavise od eksperimentalnih uslova postavljenih eksperimenata (Demars i saradnici, 2010; Unger i saradnici, 2016; Wirths, 2017). Takođe, imajući u vidu da se razvoj patologije AB razlikuje kod jedinki muškog i ženskog pola u naše istraživanje su uključene i ženke miševa. Suprotno očekivanjima, naši rezultati nisu pokazali očekivano smanjenje u broju nezrelih neurona na nivou DG u bilo kom ispitivanom uzrastu. Rezultati imunohistohemijske analize ekspresije DCX proteina ukazuju na postojanje polno-zavisnih karateristika u morfologiji ovih nezrelih neurona. Naime, lokalizacija DCX proteina razlikovala se kod ženki miševa u odnosu na mužjake, kod kojih je pokazano postojanje znatno dužih dendrita koji bi po svojim karakteristika odgovarali klasi II DCX nezrelih postmitotskih neurona (Plümpe i saradnici, 2006; Van Bokhoven i saradnici, 2011). Detektovane promene bile su najizraženije kod životinja starosti 8 nedelja, kod kojih su istovremeno i zabeležene najintenzivnije promene u procesu adultne neurogeneze. Dobijena morfološka razlika može objasniti izostanak smanjenja neurogeneze kod Tg ženki ovog uzrasta, tj. ukazati na polno-zavisnu razliku u osetljivosti klase I i klase II DCX imunoreaktivnih neurona.

Analizom Ki-67 i DCX imunoreaktivnih ćelija kod životinja istog pola i genotipa, a različite starosti ustanovili smo vremenski zavisno smanjenje broja ovih ćelija, kako kod NeTg, tako i kod Tg jedinki. Kada govorimo o stepenu ćelijske proliferacije na nivou SGZ hipokampusa, statistički značajna razlika između životinja starosti 6 i 8 nedelja nije zabeležena, već je broj proliferišućih ćelija bio na približno jednakim vrednostima. Međutim, analizirajući broj Ki-67 imunoreaktivnih ćelija u kasnijem uzrastu može se primetiti njihov izrazit pad kod životinja starosti 16 nedelja, koji je iznosio čak oko 70% u odnosu na broj ćelija koji je prisutan kod jedinki starosti 6 i 8 nedelja. Za razliku od broja Ki-67 imunoreaktivnih ćelija, čiji se pad detektuje tek u 16. nedelji života, nagli pad u broju DCX imunoreaktivnih ćelija prisutan je već u 8. nedelji starosti i kod jedinki muškog pola kreće se čak do 80%. U 16. nedelji starosti detektuje se dalji pad u broju ovih ćelija, ali statistički značajna razlika detektuje se samo kod jedinki ženskog pola gde ovaj pad iznosi oko 50% u odnosu na jedinke starosti 8. nedelja. Ovi podaci ukazuju da su procesi ćelijske proliferacije i adultne neurogeneze uzrasno-zavisni, tj. da se intenzitet ćelijskog samoobnavljanja i stvaranja novih neurona smanjuje kod starijih

životinja. U radu Moon-a i saradnika (2014), koji su koristili životinje uzrasta od 2. do 7. meseci, broj DCX imunoreaktivnih neurona sa starenjem se smanjuje kako kod NeTg, tako i kod Tg miševa. Istraživanja na drugim animalnim modelima AB, kao što je Tg2576 mišji model pokazala su da se Ki-67 i DCX imunoreaktivne ćelije ne mogu detektovati u SGZ hipokampusa kod životinja starosti 18. nedelja, za razliku od subventrikularne zone bočnih komora unutar koje je postojalo prisustvo retkih imunoreaktivnih ćelija (Ihunwo i Schliebs, 2010). Pad u intenzitetu adultne neurogeneze je fenomen koji nije ograničen samo na određena neurodegenerativna oboljenja, već je on fiziološki proces koji se događa i kod zdravih jedinki. Tako su Kuipers i saradnici (2015) pokazali da je broj DCX imunoreaktivnih ćelija u SGZ hipokampusa kod miševa starih 12 meseci niži za skoro 90% u odnosu na isti soj miševa starosti 3 meseca. Ispitivanje procesa adultne neurogeneze kod dugoživećih Ames patuljastih miševa takođe je pokazalo izrazit pad u broju proliferišućih, BrdU markiranih ćelija, na nivou SGZ hipokampusa (Sun i Bartke, 2007). Skorašnja istraživanja na humanom materijalu potvrđuju da se intenzitet adultne neurogeneze u hipokampusu smanjuje sa starenjem i da je nakon detinjstva njen nivo nedetektabilan i praktično zanemarljiv (Dennis i saradnici, 2016; Sorrells i saradnici, 2018).

Ćelijski mehanizmi uključeni u usporavanje procesa neurogeneze sa starenjem, koje je detektovano u našem i drugim istraživanjima, i dalje predstavljaju veliku nepoznanicu. Kao potencijalni uzroci navode se smanjenje mitotske aktivnosti NSPCs, promena njihovog fenotipa koji će uzrokovati njihovu diferencijaciju primarno u pravcu glija ćelija, kao i izostanak stimulusa sredine koji treba da obezbedi faktore neophodne za proliferaciju i diferencijaciju NSPCs (Sun i Bartke, 2007).

Razvoj dendrita kod adultno nastalih granularnih ćelija je vezan za njihovu aktivnost i regulisan je autokrinim efektima BDNF-a (Wang i saradnici, 2015). BDNF je neurotrofički faktor čija je primarna uloga regulacija sinaptičke plastičnosti, ali su njegove funkcije bitne i za proces neurogeneze i preživljavanje neurona (Zaletel i saradnici, 2017). Otuda i veliko interesovanje za ulogu ovog neurotrofičkog faktora u neurodegenerativnim oboljenjima, jer se smatra da poremećaj njegovog nivoa u različitim delovima mozga, a pre svega hipokampusu, utiče na kognitivnu disfunkciju koja se viđa kod pacijenata obolelih od AB (Budni i saradnici, 2015; Jiao i saradnici,

2016). Rezultati prethodnih studija na 5xFAD miševima pokazali su da nivoi BDNF proteina u hipokampusu mogu biti niži ili nepromenjeni u odnosu na kontrolne NeTg životinje i da zavise od starosti i pola životinja koje su korišćene u studiji. Tako su Kimura i saradnici (2010) pokazali statistički značajno smanjenje u nivou BDNF-a u hipokampusu (~35%) kod 5xFAD miševa starosti 6 meseci u odnosu na kontrolne životinje. Ovaj rezultat potvrđen je od strane Devi i Ohno (2012) koji su zabeležili smanjenje od 49% kod 5xFAD jedinki starosti 12–15 meseci. Različiti rezultati dobijeni su u drugim studijama u kojima je pokazano da ne postoji statistička razlika između NeTg i 5xFAD Tg ženki miševa starosti 7,5 meseci (Fragkouli i saradnici, 2014), dok je novija studija pokazala da su nivoi BDNF proteina u homogenatu hipokampusa dobijenom od 5xFAD miševa starosti 3 meseca statistički značajno niži nego kod njihovih NeTg kontrola (Kaminari i saradnici, 2017). Iako analiza nivoa ukupnog BDNF proteina u hipokampusu NeTg i Tg miševa oba pola sugerise da se razlika u nivou ovog proteina u hipokampusu može uočiti samo kod 5xFAD miševa starih 6 nedelja u odnosu na NeTg kontrole, njegova uloga u regulaciji i nastanku prominentnije dendritske arborizacije kod ženki miševa ne može biti isključena. Takođe, izostanak razlika u nivou BDNF između životinja različitog genotipa i pola kod životinja starih 8 i 16 nedelja sugerise da se ukupan nivo ovog proteina unutar celog homogenata hipokampusa ne menja. Zbog tehničkih ograničenja koja su nama i drugim istraživačima onemogućila izolaciju i analizu isključivo SGZ hipokampusa, mi ne možemo sa sigurnošću tvrditi da unutar SGZ nije došlo do poremećaja nivoa BDNF-a, a koji bi mogao uticati na poremećaj neurogeneze i dendritske arborizacije koji je zabeležen kod životinja starosti 8 nedelja. Međutim, navedeni rezultat koji ukazuje na pad nivoa BDNF proteina kod muških Tg jedinki, ipak može ukazati na povezanost sa oštećenjem neurogeneze kod Tg mužjaka starosti 8 nedelja. Takođe, navedeni rezultat govori u prilog teoriji da poremećaj u regulaciji BDNF direktno prethodni kasnijem poremećaju u sazrevanju i arborizaciji novostvorenih neurona hipokampusa.

Kao što je navedeno u uvodu, poremećaji u stopi ćelijske proliferacije i diferencijacije detektovani su kod različitih patoloških stanja (Fantes i saradnici, 2003; Zhao i saradnici, 2008). Tako su i male promene u nivou ekspresije SOXB1 transkripcionih faktora povezane sa nastankom teških patoloških promena u humanoju populaciji, kao što su udružene anomalije očiju, urogenitalnog trakta i jednjaka (Fantes i saradnici, 2003;

Ferri i saradnici, 2004; Williamson i saradnici, 2006). Veliki broj dokaza ukazuje i na značaj SOX proteina, a pre svega SOX2 i SOX21 transkripcionih regulatora u patogenezi tumora mozga (de la Rocha i saradnici, 2014; Yang i saradnici, 2016). Međutim, iako su ovi transkripcioni faktori otkriveni pre više od 20 godina, primarni fokus istraživača bio je usmeren na njihovu ulogu u embrionalnom razvoju i nastanku tumora (Castillo i Sanchez-Cespedes, 2012). Zbog toga njihova uloga u nastanku AB, kao i drugih neurodegenerativnih oboljenja, i dalje nije poznata. Jedan od glavnih razloga zbog koga uloga ovih faktora nije dovoljno proučena u patologiji oboljenja nervnog sistema jeste nepostojanje dovoljno podataka o njihovoj ulozi u fiziološkim uslovima u adultnom mozgu (Chew i Gallo, 2009).

U SGZ adultnih miševa, ekspresija transkripcionog faktora SOX2 se detektovala u radijalnim glija ćelijama (tip 1), intermedijarnim progenitornim ćelijama tipa 2a i donekle u intermedijarnim progenitornim ćelijama tipa 2b (Steiner i saradnici, 2006). Pojedinačna imunohistohemijska analiza specifičnim antitelima za SOX1, SOX2 ili SOX21 kod životinja uključenih u ovu studiju pokazala je da najveći broj ćelija u SGZ hipokampusa eksprimira ovaj transkripcioni faktor, što je u skladu sa prethodnim rezultatima. Rezultati imunofluorescentne analize koekspresije pokazali su da se nivo ekspresije SOX2 proteina razlikuje između ćelija, kao i da je visok nivo ovog proteina detektovan u mitotski aktivnim (PCNA imunoreaktivnim) ćelijama. Ova zapažanja su u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima koji su pokazali da ćelije u različitim fazama diferencijacije ekspimiraju različit nivo SOX2 proteina (Pevny i Placzek, 2005; Steiner i saradnici, 2006). Uporedna analiza imunoreaktivnih ćelija u SGZ 5xFAD miševa i njihovih kontrola pokazala je statistički značajno smanjenje broja ćelija koje ekspimiraju SOX2 kod Tg ženki starosti 8 nedelja, ali ne i kod Tg mužjaka. Takođe, statistički značajna razlika u broju SOX2 pozitivnih ćelija nije zabeležena između nijedne grupe životinja starosti 6 ili 16 nedelja.

Brojna istraživanja pokazala su da je precizno regulisan nivo ekspresije SOX2 proteina neophodan za pravilno odvijanje procesa diferencijacije NSPCs. Ferri i saradnici (2014) pokazali su da utišana ekspresija SOX2 transkripcionog faktora remeti proces neurogeneze i indukuje neurodegeneraciju u mozgu adultnih miševa. Rezultati novijih studija su pokazala da utišavanje ekspresije SOX2 proteina u adultnom hipokampusu

dovodi do apoptoze ćelija neuroblasta i usporenog sazrevanja novoformiranih granularnih ćelija DG (Amador-Arjona i saradnici, 2015). Od velikog značaja je i rezultat studije u kojima je stepen utišavanja SOX2 ekspresije u Tg mišjim modelima AB kao i u mozgu pacijenata obolelih od AB, direktno korelisao sa stepenom bolesti i/ili pacijentovim kognitivnim kapacitetom (Crews i saradnici, 2010; Briley i saradnici, 2016). Treba napomenuti i da nekoliko istraživanja pokazuje da je funkcija SOX2 proteina u bliskoj vezi sa funkcijom proteina uključenih u patologiju AB i da ovaj transkripcioni faktor može imati važnu ulogu u neuroprotektivnim mehanizmima (Freude i saradnici, 2011; Sarlak i Vincent, 2016). Skorašnja *in vitro* studija Fu i saradnika (2018) pokazala je da mikroRNK 429 svoju funkciju obavlja preko SOX2 i BCL2 proteina i da se njenim isključivanjem smanjuje A β -indukovano neuronsko oštećenje. Ovi podaci ukazuju da SOX2 može imati neuroprotektivnu funkciju u patogenezi AB i da samim tim predstavlja ciljni protein u budućim strategijama lečenja. Pad u broju SOX2 imunoreaktivnih ćelija, koji je u našoj studiji zabeležen samo kod 5xFAD Tg ženki starosti 8 nedelja, može predstavljati prolazni pad u nivou ekspresije ovog proteina, koji se sa starenjem normalizuje. Sa druge strane, on može predstavljati i još jedan od dokaza koji govori u prilog da se prve i intezivnije promene kod ovog modela upravo viđaju kod jedinki ženskog pola.

Rezultati našeg istraživanja takođe po prvi put pokazuju i da je ekspresija SOX1 proteina u SGZ hipokampusa smanjena kod 5xFAD modela AB u poređenju sa kontrolama. Imunofluorescentna analiza na presecima hipokampusa miševa starih 8 nedelja pokazala je da je ekspresija SOX1 proteina prisutna u različitim ćelijskim populacijama duž čitave SGZ, uključujući tu i proliferativne (PCNA imunoreaktivne) tip 1 i tip 2 progenitorne ćelije, neuroblaste (DCX imunoreaktivne) i nezrele (DCX imunoreaktivne) neurone. Na osnovu prethodno publikovanih rezultata analize SOX1 ekspresije u hipokampusu (Venere i saradnici, 2012; Kuipers i saradnici, 2015) možemo pretpostaviti da ćelije koje eksprimiraju SOX1 predstavljaju populaciju ćelija tipa 1 koje se nalaze u stanju mirovanja (eng. *quiescent cells*) i delimično još nedovoljno okarakterisanih ćelija unutar SGZ, koje predstavljaju prelaznu fazu u procesu neuralne diferencijacije. Za razliku od SOX2 transkripcionog faktora, čija je uloga u procesu neurogeneze detaljno opisana, uloga SOX1 transkripcionog faktora u održavanju karakteristika progenitornih ćelija i/ili u procesu njihove diferencijacije je i dalje

nedovoljno ispitana (Karnavas i saradnici, 2013). Incijalne studije pokazale su da ekspresija SOX1 stimuliše *in vitro* neuronalnu diferencijaciju P19 ćelija (Pevny i saradnici, 1998) i ima sposobnost da dovodi do diferencijacije ektodermalnog tkiva *Xenopusa* u nervno tkivo (Nitta i saradnici, 2006). Sa druge strane, pokazano je da u toku razvoja mišjeg korteksa SOX1 reguliše održavanje nediferentovanog stanja progenitornih ćelija preko mehanizma koji uključuje supresiju Prox1. Ovaj protein učestvuje u regulaciji izlaska ćelije iz ćelijskog ciklusa i time utiče na njenu posledičnu diferencijaciju u pravcu neurona (Elkouris i saradnici, 2011). Dodatna istraživanja u kojima je ekspresija ovog proteina ektopično regulisana, u smislu smanjenja ili povećanja njegove ekspresije, potvrdila su saznanja da svi članovi SOXB1 familije transkripcionih faktora blokiraju neurogenezu i održavaju neuronalne ćelije u stanju nediferentovanih prekursora (Bylund i saradnici, 2003; Holmberg i saradnici, 2008). Naše istraživanje po prvi put pokazuje da postoji razlika u broju SOX1 imunoreaktivnih ćelija kako između Tg i NeTg jedinki istog pola, tako i između životinja različitog pola, a istog genotipa. Kao i u slučaju SOX2 proteina, statistički značajna razlika u ekspresiji SOX1 transkripcionog faktora između Tg i NeTg životinja pokazana je samo kod miševa starosti 8 nedelja. O uzrocima potencijalnih razlika u broju SOX1 imunoreaktivnih ćelija između životinja različitog pola može se spekulirati, pri čemu jedno od potencijalnih objašnjenja mogu biti različiti epigenetski mehanizmi koji utiču na diferencijaciju nervnog sistema kod muških i ženskih jedinki (McCarthy i Nugent, 2015). Međutim, neophodno je sprovesti dodatne molekularne studije kako bi se detaljnije razjasnio ovaj fenomen.

Rezultati našeg istraživanja, takođe, po prvi put pokazuju promenu ekspresije SOX21 proteina u SGZ hipokampusa kod mišjeg modela AB. Od svih ispitivanih SOXB proteina, ćelije koje eksprimiraju SOX21 protein pokazale su najveće smanjenje brojnosti. Dosadašnji rezultati dobijeni od strane nekoliko studija koje su ispitivale ekspresiju i funkcije SOX21 proteina u regulaciji embrionalne i adultne neurogeneze su kontradiktorni. Studije na miševima su pokazale da je SOX21 transkripcioni faktor neophodan za normalno odvijanje procesa neuralne diferencijacije u adultnom hipokampusu jer stimuliše prelazak progenitornih ćelija tipa 2a u stadijum 2b (Matsuda i saradnici, 2012). Međutim, neke druge studije navode da SOX21, slično SOXB1 grupi proteina, reguliše održavanje progenitorskih karakteristika i da je smanjenje njegove

ekspresije neophodno kako bi se proces diferencijacije započeo (Mallanna i saradnici, 2010; Chakravarthy i saradnici, 2011; Kuzmichev i saradnici, 2012). Iz prethodnih rezultata je i proistekao zaključak da SOX21 ove različite uloge obavlja na dozno-zavisian način. Po ovom modelu ektopično povećanje nivoa ekspresije SOX21 transkripcionog faktora stimuliše održavanje progenitornih karakteristika ćelija i inhibiciju diferencijacije, tj. formiranje neurona (Whittington i saradnici, 2015). Jedini rad koji dovodi u moguću vezu gen *Sox21* i AB patologiju pokazao je da utišavanje duge nekodirajuće ribonukleinske kiseline (eng. *long non-coding RNA*, lncRNA) SOX21-AS može da ublaži efekte neuroinflamacije i da smanji stepen apoptoze neurona kod pacijenata sa AB (Zhang i saradnici, 2018). Ovaj podatak predstavlja potencijalno važno otkriće jer lncRNA SOX21-AS može predstavljati novu terapijsku metu u lečenju AB.

Ispitivanjem broja SOX1, SOX2 i SOX21 imunoreaktivnih ćelija u SGZ hipokampusa životinja različite starosne dobi utvrđeno je da se broj imunoreaktivnih ćelija smanjuje tokom starenja, kako kod NeTg, tako i kod Tg jedinki. Kod većine grupa evidentan je pad u broju ovih ćelija već nakon 6. nedelje starosti, dok je najveća razlika u broju ispitivanih SOXB imunoreaktivnih ćelija detektovana između životinja starosti 6 i 16. nedelja. Kada se analizira promena imunohistoheмиjske ekspresije SOX1, SOX2 i SOX21 proteina tokom starenja može se uočiti da kod SOX2 i delimično kod SOX21 transkripcionog faktora postoji pravilno opadanje broja imunoreaktivnih ćelija sa starenjem. Zanimljivo je da kod SOX1 transkripcionog faktora ne postoji statistički značajna razlika između životinja starosti 8 i 16 nedelja. Naime, nakon 6. nedelje starosti evidentan je izrazit pad u broju SOX1 imunoreaktivnih ćelija pri čemu se ovaj pad kreće u rasponu od 40 do 60% u odnosu na životinje starijeg uzrasta. Kod životinja starosti 8 i 16 nedelja broj SOX1 imunoreaktivnih ćelija ostaje nepromenjen, što ukazuje da je SOX1 transkripcioni faktor najmanje podložan promenama tokom procesa starenja.

Uočene promene u neurogenezi i ekspresiji SOX1, SOX2 i SOX21 transkripcionih faktora kod 5xFAD životinja koje pripadaju samo jednoj starosnoj grupi, još jednom potvrđuju zapažanja brojnih autora o dinamičnosti procesa adultne neurogeneze koji u velikoj meri zavisi od vrste animalnog modela, pola i starosti životinje. Ovi rezultati otvaraju polje za veliki broj daljih istraživanja, koja bi pratila promenu ekspresije ovih transkripcionih faktora tokom dužeg vremenskog perioda, ali koji bi u obzir uzeli i ispitivanje dodatnih molekularnih mehanizama koji utiču na kontrolu SOXB transkripcionih faktora, a samim tim i na ceo proces adultne neurogeneze.

6. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima istraživanja adultne neurogeneze u AB model sistemu, a na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvući sledeći zaključci:

- Ukupan broj granularnih neurona u DG hipokampusa ostaje nepromenjen tokom prva četiri meseca života i ne razlikuje se između neTg i Tg jedinki.
- Broj ćelija u aktivnim fazama ćelijskog ciklusa unutar SGZ hipokampusa je nepromenjen kod kontrolnih životinja starih 6 i 8 nedelja, dok se značajan pad u obimu proliferacije uočava tek kod životinja starosti 16 nedelja. Rezultati uporedne analize broja ćelija u aktivnim fazama ćelijskog ciklusa pokazali su da nema značajnih razlika u obimu proliferacije između 5xFAD životinja i njihovih kontrola starosti 6, 8 i 16 nedelja;
- Uprkos očuvanoj proliferativnoj aktivnosti, već u 8. nedelji starosti značajno se smanjuje broj nezrelih neurona kod svih životinja oba pola u odnosu na životinje starosti 6 nedelja. Rezultati uporedne analize pokazali su i statistički značajan pad u broju nezrelih neurona kod 5xFAD Tg mužjaka u odnosu na NeTg kontrole, što ukazuje na rani poremećaj neurogeneze kod Tg mužjaka starosti 8 nedelja. Nasuprot mužjacima, kod ženki oba genotipa se trend značajnog pada broja mladih nezrelih neurona može detektovati i u 16. nedelji u odnosu na životinje starosti 8 nedelja;
- U hipokampusu Tg i NeTg životinja starih 8 nedelja uočava se razlika i u morfologiji DCX pozitivnih ćelija, u korist klase I kod mužjaka, a klase II kod ženki;
- Broj ćelija u kojima je detektovana ekspresija SOX1 proteina je značajno manji u hipokampusu svih životinja starosti 8 i 16 nedelja u odnosu na grupe životinja starosti 6 nedelja i time prati promene u broju DCX pozitivnih ćelija. Uporedna analiza pokazala je statistički značajno manji broj SOX1 imunoreaktivnih ćelija kod NeTg mužjaka u odnosu na NeTg ženke starosti 6 nedelja, kao i smanjenje broja SOX1 imunoreaktivnih ćelija kod mužjaka oba genotipa starosti 8 nedelja u odnosu na ženke. Kod Tg životinja oba pola starosti 8 nedelja detektovan je značajno manji broj SOX1 pozitivnih ćelija u odnosu na njihove NeTg kontrole;
- Broj ćelija u kojima je detektovana ekspresija SOX2 proteina je značajno manji u hipokampusu svih životinja starosti 8 i 16 nedelja u odnosu na grupe životinja starosti 6 nedelja i time SOX2, kao i SOX1, prati promene u broju DCX

pozitivnih ćelija. Uporedna analiza je pokazala statistički značajno manji broj SOX2 imunoreaktivnih ćelija samo kod Tg ženki starosti 8 nedelja u odnosu na njihove NeTg kontrole;

- Broj ćelija u kojima je detektovana ekspresija SOX21 proteina je značajno manji u hipokampusu kontrolnih životinja oba pola starosti 16 nedelja u odnosu na grupe životinja starosti 6 i 8 nedelja. Kod Tg životinja oba pola, značajan pad u broju SOX21 pozitivnih ćelija se detektuje znatno ranije, već u 8. nedelji, u odnosu na grupe životinja starosti 6 nedelja. Takođe, Tg životinje oba pola u 8. nedelji starosti, kao i Tg mužjaci u 16. nedelji starosti eksprimiraju značajno manji broj SOX21 imunoreaktivnih ćelija u odnosu na svoje NeTg kontrole;
- Rezultati Western blot analize sugerišu da je ukupna količina BDNF proteina u hipokampusu Tg miševa starih 6 nedelja niža u odnosu na kontrolne životinje. U ostalim analiziranim uzrastima nije uočena razlika u nivou BDNF proteina ni u jednoj od ispitivanih eksperimentalnih grupa.

Na osnovu navedenih možemo izvesti i tri glavna zaključka:

- Proliferativni kapacitet, broj novoformiranih, nezrelih neurona i broj SOX1, SOX2 i SOX21 imunoreaktivnih ćelija u SGZ hipokampusa značajno se smanjuju tokom starenja, pri čemu su ove promene prisutne kako kod NeTg, tako i kod Tg jedinki oba pola. Istovremeno, ukupan broj granularnih neurona u DG kod ispitanih životinja ostao je nepromenjen;
- Imajući u vidu činjenicu da do ranog poremećaja neurogeneze dolazi kod 5xFAD Tg mužjaka, možemo pretpostaviti da izvesni polno-specifični faktori imaju uticaj kako na sam proces neurogeneze, tako i na kompenzatornu reakciju neurogene niše kojom se sprečava propadanje i/ili produžava preživljavanje pojedinih DCX pozitivnih ćelija u SGZ ženki u 5xFAD modelu AB;
- Smanjenje u broju ćelija koje eksprimiraju SOX1, SOX2 i SOX21 protein detektovano je kod 5xFAD Tg životinja starosti 8 nedelja u odnosu na njihove NeTg kontrole što, zajedno sa prethodnima zaključcima, ove transkripcione faktore čini i vrlo pouzdanim markerima ranih promena u neurogenezi.

7. LITERATURA

1. Allen KM, Fung SJ, Weickert CS. Cell proliferation is reduced in the hippocampus in schizophrenia. *Aust N Z J Psychiatry*. 2016; 50(5):473–80.
2. Alonso M, Vianna MRM, Depino AM, Mello e Souza T, Pereira P, Szapiro G, et al. BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short- and long-term memory formation. *Hippocampus*. 2002; 12(4):551–60.
3. Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*. 1965; 124(3):319–35.
4. Amador-Arjona A, Cimadamore F, Huang C-T, Wright R, Lewis S, Gage FH, et al. SOX2 primes the epigenetic landscape in neural precursors enabling proper gene activation during hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015; 112(15):E1936-1945.
5. Anand KS, Dhikav V. Hippocampus in health and disease: An overview. *Ann Indian Acad Neurol*. 2012; 15(4):239–46.
6. Ardestani PM, Evans AK, Yi B, Nguyen T, Coutellier L, Shamloo M. Modulation of neuroinflammation and pathology in the 5XFAD mouse model of Alzheimer’s disease using a biased and selective beta-1 adrenergic receptor partial agonist. *Neuropharmacology*. 2017; 116:371–86.
7. Avila J, Insausti R, Del Rio J. Memory and neurogenesis in aging and Alzheimer’s disease. *Aging Dis*. 2010; 1(1):30–6.
8. Baglietto-Vargas D, Sánchez-Mejias E, Navarro V, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Gómez-Arboledas A, et al. Dual roles of A β in proliferative processes in an amyloidogenic model of Alzheimer’s disease. *Sci Rep*. 2017; 7(1):10085.
9. Bagyinszky E, Youn YC, An SSA, Kim S. The genetics of Alzheimer’s disease. *Clin Interv Aging*. 2014; 9:535–51.
10. Beason-Held LL, Goh JO, An Y, Kraut MA, O’Brien RJ, Ferrucci L, et al. Changes in brain function occur years before the onset of cognitive impairment. *J Neurosci*. 2013; 33(46):18008–14.
11. Bell KFS, Bennett DA, Cuello AC. Paradoxical upregulation of glutamatergic presynaptic boutons during mild cognitive impairment. *J Neurosci*. 2007; 27(40):10810–7.

12. Bierer LM, Hof PR, Purohit DP, Carlin L, Schmeidler J, Davis KL, et al. Neocortical neurofibrillary tangles correlate with dementia severity in Alzheimer's disease. *Arch Neurol.* 1995; 52(1):81–8.
13. Boekhoorn K, Joels M, Lucassen PJ. Increased proliferation reflects glial and vascular-associated changes, but not neurogenesis in the presenile Alzheimer hippocampus. *Neurobiol Dis.* 2006; 24(1):1–14.
14. Boldrini M, Fulmore CA, Tartt AN, Simeon LR, Pavlova I, Poposka V, et al. Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell Stem Cell.* 2018; 22(4):589-599.e5.
15. Bowles J, Schepers G, Koopman P. Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev Biol.* 2000; 227(2):239–55.
16. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 1991; 82(4):239–59.
17. Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretschmar H, Del Tredici K. Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol.* 2006; 112(4):389–404.
18. Briley D, Ghirardi V, Woltjer R, Renck A, Zolochovska O, Tagliatela G, et al. Preserved neurogenesis in non-demented individuals with AD neuropathology. *Sci Rep.* 2016; 6:27812.
19. Brown JP, Couillard-Després S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kuhn HG. Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol.* 2003; 467(1):1–10.
20. Budni J, Bellettini-Santos T, Mina F, Garcez ML, Zugno AI. The involvement of BDNF, NGF and GDNF in aging and Alzheimer's disease. *Aging Dis.* 2015; 6(5):331–41.
21. Bundy JL, Vied C, Nowakowski RS. Sex differences in the molecular signature of the developing mouse hippocampus. *BMC Genomics.* 2017; 18(1):237.
22. Bundy JL, Vied C, Badger C, Nowakowski RS. Sex-biased hippocampal pathology in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease: a multi-omic analysis. *J Comp Neurol.* 2018; [ahead of print].

23. Bussi re T, Bard F, Barbour R, Grajeda H, Guido T, Khan K, et al. Morphological characterization of Thioflavin-S-positive amyloid plaques in transgenic Alzheimer mice and effect of passive Aβ immunotherapy on their clearance. *Am J Pathol.* 2004; 165(3):987–95.
24. Bylund M, Andersson E, Novitsch BG, Muhr J. Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nat Neurosci.* 2003; 6(11):1162–8.
25. Candela S, Giubilei F, Orzi F. Heterogeneous pathologies associated with dementia in Parkinsonism share a prion-like spreading mechanism. *Arch Ital Biol.* 2013; 151(4):169–78.
26. Carreiras MC, Mendes E, Perry MJ, Francisco AP, Marco-Contelles J. The multifactorial nature of Alzheimer’s disease for developing potential therapeutics. *Curr Top Med Chem.* 2013; 13(15):1745–70.
27. Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA. Alzheimer Disease. *Dis Mon.* 2010; 56(9):484–546.
28. Castillo SD, Sanchez-Cespedes M. The SOX family of genes in cancer development: biological relevance and opportunities for therapy. *Expert Opin Ther Targets.* 2012; 16(9):903–19.
29. Chakravarthy H, Ormsbee BD, Mallanna SK, Rizzino A. Rapid activation of the bivalent gene Sox21 requires displacement of multiple layers of gene-silencing machinery. *FASEB J.* 2011; 25(1):206–18.
30. Chen Q, Nakajima A, Choi SH, Xiong X, Sisodia SS, Tang Y-P. Adult neurogenesis is functionally associated with AD-like neurodegeneration. *Neurobiol Dis.* 2008; 29(2):316–26.
31. Chevallier NL, Soriano S, Kang DE, Masliah E, Hu G, Koo EH. Perturbed neurogenesis in the adult hippocampus associated with presenilin-1 A246E mutation. *Am J Pathol.* 2005; 167(1):151–9.
32. Chew L-J, Gallo V. The Yin and Yang of Sox proteins: Activation and repression in development and disease. *J Neurosci Res.* 2009; 87(15):3277–87.
33. Couillard-Despres S, Winner B, Schaubeck S, Aigner R, Vroemen M, Weidner N, et al. Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur J Neurosci.* 2005; 21(1):1–14.

34. Crews L, Adame A, Patrick C, Delaney A, Pham E, Rockenstein E, et al. Increased BMP6 levels in the brains of Alzheimer's disease patients and APP transgenic mice are accompanied by impaired neurogenesis. *J Neurosci*. 2010; 30(37):12252–62.
35. Cuadrado-Tejedor M, García-Osta A. Current animal models of Alzheimer's disease: challenges in translational research. *Front Neurol*. 2014; 5:182.
36. Cummings J, Lee G, Ritter A, Zhong K. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2018. *Alzheimers Dement (N Y)*. 2018; 4:195–214.
37. Dard RF, Dahan L, Rampon C. Targeting hippocampal adult neurogenesis using transcription factors to reduce Alzheimer's disease-associated memory impairments. *Hippocampus*. 2018; [ahead of print].
38. de la Rocha AMA, Sampron N, Alonso MM, Matheu A. Role of SOX family of transcription factors in central nervous system tumors. *Am J Cancer Res*. 2014; 4(4):312–24.
39. Demars M, Hu Y-S, Gadadhar A, Lazarov O. Impaired neurogenesis is an early event in the etiology of familial Alzheimer's disease in transgenic mice. *J Neurosci Res*. 2010; 88(10):2103–17.
40. Dennis CV, Suh LS, Rodriguez ML, Kril JJ, Sutherland GT. Human adult neurogenesis across the ages: An immunohistochemical study. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2016; 42(7):621–38.
41. Devi L, Alldred MJ, Ginsberg SD, Ohno M. Sex- and brain region-specific acceleration of β -amyloidogenesis following behavioral stress in a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Brain*. 2010; 3:34.
42. Devi L, Ohno M. 7,8-dihydroxyflavone, a small-molecule TrkB agonist, reverses memory deficits and BACE1 elevation in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology*. 2012; 37(2):434–44.
43. Dickson DW, Wertkin A, Mattiace LA, Fier E, Kress Y, Davies P, et al. Ubiquitin immunoelectron microscopy of dystrophic neurites in cerebellar senile plaques of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 1990; 79(5):486–93.
44. Dong S, Duan Y, Hu Y, Zhao Z. Advances in the pathogenesis of Alzheimer's disease: a re-evaluation of amyloid cascade hypothesis. *Transl Neurodegener*. 2012; 1(1):18.

45. Donohue MC, Sperling RA, Petersen R, Sun C-K, Weiner MW, Aisen PS, et al. Association Between Elevated Brain Amyloid and Subsequent Cognitive Decline Among Cognitively Normal Persons. *JAMA*. 2017; 317(22):2305–16.
46. Donovan MH, Yazdani U, Norris RD, Games D, German DC, Eisch AJ. Decreased adult hippocampal neurogenesis in the PDAPP mouse model of Alzheimer's disease. *J Comp Neurol*. 2006; 495(1):70–83.
47. Edison P, Archer HA, Hinz R, Hammers A, Pavese N, Tai YF, et al. Amyloid, hypometabolism, and cognition in Alzheimer disease: an [11C]PIB and [18F]FDG PET study. *Neurology*. 2007; 68(7):501–8.
48. Eimer WA, Vassar R. Neuron loss in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease correlates with intraneuronal A β 42 accumulation and Caspase-3 activation. *Mol Neurodegener*. 2013; 8:2.
49. Ellis P, Fagan BM, Magness ST, Hutton S, Taranova O, Hayashi S, et al. SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. *Dev Neurosci*. 2004; 26(2–4):148–65.
50. Elkouris M, Balaskas N, Poulou M, Politis PK, Panayiotou E, Malas S, et al. Sox1 maintains the undifferentiated state of cortical neural progenitor cells via the suppression of Prox1-mediated cell cycle exit and neurogenesis. *Stem Cells*. 2011; 29(1):89–98.
51. Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*. 1998; 4(11):1313–7.
52. Evin G, Beyreuther K, Masters CL. Alzheimer's disease amyloid precursor protein (A β PP): proteolytic processing, secretases and β A4 amyloid production. *Amyloid*. 1994; 1(4):263–80.
53. Fantes J, Ragge NK, Lynch S-A, McGill NI, Collin JRO, Howard-Peebles PN, et al. Mutations in SOX2 cause anophthalmia. *Nat Genet*. 2003; 33(4):461–3.
54. Ferrer I, Marín C, Rey MJ, Ribalta T, Goutan E, Blanco R, et al. BDNF and full-length and truncated TrkB expression in Alzheimer disease. Implications in therapeutic strategies. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1999; 58(7):729–39.

55. Ferri ALM, Cavallaro M, Braida D, Di Cristofano A, Canta A, Vezzani A, et al. Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development*. 2004; 131(15):3805–19.
56. Filippov V, Kronenberg G, Pivneva T, Reuter K, Steiner B, Wang LP, et al. Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol Cell Neurosci*. 2003; 23(3):373–82.
57. Fragkouli A, Tsilibary EC, Tzinia AK. Neuroprotective role of MMP-9 overexpression in the brain of Alzheimer's 5xFAD mice. *Neurobiol Dis*. 2014; 70:179–89.
58. Freude KK, Penjwini M, Davis JL, LaFerla FM, Blurton-Jones M. Soluble amyloid precursor protein induces rapid neural differentiation of human embryonic stem cells. *J Biol Chem*. 2011; 286(27):24264–74.
59. Fu S, Zhang J, Zhang S. Knockdown of miR-429 Attenuates A β -Induced Neuronal Damage by Targeting SOX2 and BCL2 in Mouse Cortical Neurons. *Neurochem Res*. 2018; [ahead of print].
60. Funk KE, Mrak RE, Kuret J. Granulovacuolar degeneration (GVD) bodies of Alzheimer's disease (AD) resemble late-stage autophagic organelles. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2011; 37(3):295–306.
61. Gould E, Reeves AJ, Fallah M, Tanapat P, Gross CG, Fuchs E. Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96(9):5263–7.
62. Gould E. How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nat Rev Neurosci*. 2007 Jun;8(6):481–8.
63. Götz J, Schild A, Hoernkli F, Pennanen L. Amyloid-induced neurofibrillary tangle formation in Alzheimer's disease: insight from transgenic mouse and tissue-culture models. *Int J Dev Neurosci*. 2004; 22(7):453–65.
64. Götz J, Ittner LM. Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurosci*. 2008; 9(7):532–44.
65. Guo T, Noble W, Hanger DP. Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathol*. 2017; 133(5):665–704.

66. Hall J, Thomas KL, Everitt BJ. Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. *Nat Neurosci.* 2000; 3(6):533–5.
67. Haughey NJ, Nath A, Chan SL, Borchard AC, Rao MS, Mattson MP. Disruption of neurogenesis by amyloid beta-peptide, and perturbed neural progenitor cell homeostasis, in models of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2002; 83(6):1509–24.
68. Henneman WJP, Sluimer JD, Barnes J, van der Flier WM, Sluimer IC, Fox NC, et al. Hippocampal atrophy rates in Alzheimer disease: added value over whole brain volume measures. *Neurology.* 2009; 72(11):999–1007.
69. Hollands C, Bartolotti N, Lazarov O. Alzheimer's Disease and Hippocampal Adult Neurogenesis; Exploring Shared Mechanisms. *Front Neurosci.* 2016; 10:178.
70. Holmberg J, Hansson E, Malewicz M, Sandberg M, Perlmann T, Lendahl U, et al. SoxB1 transcription factors and Notch signaling use distinct mechanisms to regulate proneural gene function and neural progenitor differentiation. *Development.* 2008; 135(10):1843–51.
71. Hoozemans JJM, van Haastert ES, Nijholt DAT, Rozemuller AJM, Eikelenboom P, Scheper W. The unfolded protein response is activated in pretangle neurons in Alzheimer's disease hippocampus. *Am J Pathol.* 2009; 174(4):1241–51.
72. Howells DW, Porritt MJ, Wong JY, Batchelor PE, Kalnins R, Hughes AJ, et al. Reduced BDNF mRNA expression in the Parkinson's disease substantia nigra. *Exp Neurol.* 2000; 166(1):127–35.
73. Ihunwo AO, Schliebs R. Cell proliferation and total granule cell number in dentate gyrus of transgenic Tg2576 mouse. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2010; 70(4):362–9.
74. Jiao S-S, Shen L-L, Zhu C, Bu X-L, Liu Y-H, Liu C-H, et al. Brain-derived neurotrophic factor protects against tau-related neurodegeneration of Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry.* 2016; 6(10):e907.
75. Jin K, Peel AL, Mao XO, Xie L, Cottrell BA, Henshall DC, et al. Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004a; 101(1):343–7.
76. Jin K, Galvan V, Xie L, Mao XO, Gorostiza OF, Bredesen DE, et al. Enhanced neurogenesis in Alzheimer's disease transgenic (PDGF-APP^{Sw,Ind}) mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004b; 101(36):13363–7.

77. Jortner BS. The return of the dark neuron. A histological artifact complicating contemporary neurotoxicologic evaluation. *Neurotoxicology*. 2006; 27(4):628–34.
78. Kamachi Y, Kondoh H. Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation. *Development*. 2013; 140(20):4129–44.
79. Kametani F, Hasegawa M. Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Front Neurosci*. 2018; 12:25.
80. Kaminari A, Giannakas N, Tzinia A, Tsilibary EC. Overexpression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) rescues insulin-mediated impairment in the 5XFAD model of Alzheimer's disease. *Sci Rep*. 2017; 7(1):683.
81. Kan L, Jalali A, Zhao L-R, Zhou X, McGuire T, Kazanis I, et al. Dual function of Sox1 in telencephalic progenitor cells. *Dev Biol*. 2007; 310(1):85–98.
82. Karnavas T, Mandalos N, Malas S, Remboutsika E. SoxB, cell cycle and neurogenesis. *Front Physiol*. 2013; 4:298
83. Kee N, Sivalingam S, Boonstra R, Wojtowicz JM. The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *J Neurosci Methods*. 2002; 115(1):97–105.
84. Kempermann G. Adult Neurogenesis: An Evolutionary Perspective. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015; 8(2):a018986.
85. Kempermann G. Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci*. 2002; 22(3):635–8.
86. Kim J, Chakrabarty P, Hanna A, March A, Dickson DW, Borchelt DR, et al. Normal cognition in transgenic BRI2-A β mice. *Mol Neurodegener*. 2013; 8:15.
87. Kimura R, Ohno M. Impairments in remote memory stabilization precede hippocampal synaptic and cognitive failures in 5XFAD Alzheimer mouse model. *Neurobiol Dis*. 2009; 33(2):229–35.
88. Kimura R, Devi L, Ohno M. Partial reduction of BACE1 improves synaptic plasticity, recent and remote memories in Alzheimer's disease transgenic mice. *J Neurochem*. 2010; 113(1):248–61.
89. Knoth R, Singec I, Ditter M, Pantazis G, Capetian P, Meyer RP, et al. Murine features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 years. *PLoS ONE*. 2010; 5(1):e8809.

90. Kornack DR, Rakic P. Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96(10):5768–73.
91. Kuipers SD, Schroeder JE, Trentani A. Changes in hippocampal neurogenesis throughout early development. *Neurobiol Aging*. 2015; 36(1):365–79.
92. Kuzmichev AN, Kim S-K, D'Alessio AC, Chenoweth JG, Wittko IM, Campanati L, et al. Sox2 acts through Sox21 to regulate transcription in pluripotent and differentiated cells. *Curr Biol*. 2012; 22(18):1705–10.
93. Lafenêtre P, Leske O, Ma-Högemeie Z, Haghikia A, Bichler Z, Wahle P, et al. Exercise can rescue recognition memory impairment in a model with reduced adult hippocampal neurogenesis. *Front Behav Neurosci*. 2010; 3:34.
94. LaFerla FM, Green KN. Animal models of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012; 2(11).
95. Landel V, Baranger K, Virard I, Loriol B, Khrestchatisky M, Rivera S, et al. Temporal gene profiling of the 5XFAD transgenic mouse model highlights the importance of microglial activation in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2014; 9:33.
96. Lanoiselée H-M, Nicolas G, Wallon D, Rovelet-Lecrux A, Lacour M, Rousseau S, et al. APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: A genetic screening study of familial and sporadic cases. *PLoS Med*. 2017; 14(3):e1002270.
97. Lee J, Duan W, Mattson MP. Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem*. 2002; 82(6):1367–75.
98. Lefebvre V, Dumitriu B, Penzo-Méndez A, Han Y, Pallavi B. Control of cell fate and differentiation by Sry-related high-mobility-group box (Sox) transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007; 39(12):2195–214.
99. Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, Ayres M, Bensinger A, Bernard A, et al. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*. 2007; 445:168–176.

100. Li B, Yamamori H, Tatebayashi Y, Shafit-Zagardo B, Tanimukai H, Chen S, et al. Failure of neuronal maturation in Alzheimer disease dentate gyrus. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2008; 67(1):78–84.
101. Li G, Bien-Ly N, Andrews-Zwilling Y, Xu Q, Bernardo A, Ring K, et al. GABAergic interneuron dysfunction impairs hippocampal neurogenesis in adult apolipoprotein E4 knockin mice. *Cell Stem Cell.* 2009; 5(6):634–45.
102. Linnarsson S, Björklund A, Ernfors P. Learning deficit in BDNF mutant mice. *Eur J Neurosci.* 1997; 9(12):2581–7.
103. Liu PZ, Nusslock R. Exercise-Mediated Neurogenesis in the Hippocampus via BDNF. *Front Neurosci.* 2018; 12:52.
104. Ma H, Lesné S, Kotilinek L, Steidl-Nichols JV, Sherman M, Younkin L, et al. Involvement of beta-site APP cleaving enzyme 1 (BACE1) in amyloid precursor protein-mediated enhancement of memory and activity-dependent synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104(19):8167–72.
105. Maarouf CL, Kokjohn TA, Whiteside CM, Macias MP, Kalback WM, Sabbagh MN, et al. Molecular Differences and Similarities Between Alzheimer’s Disease and the 5XFAD Transgenic Mouse Model of Amyloidosis. *Biochem Insights.* 2013; 6:1–10.
106. Mallanna SK, Ormsbee BD, Iacovino M, Gilmore JM, Cox JL, Kyba M, et al. Proteomic analysis of Sox2-associated proteins during early stages of mouse embryonic stem cell differentiation identifies Sox21 as a novel regulator of stem cell fate. *Stem Cells.* 2010; 28(10):1715–27.
107. Marlatt MW, Bauer J, Aronica E, van Haastert ES, Hoozemans JJM, Joels M, et al. Proliferation in the Alzheimer hippocampus is due to microglia, not astroglia, and occurs at sites of amyloid deposition. *Neural Plast.* 2014; 2014:693851.
108. Martinez-Canabal A. Reconsidering hippocampal neurogenesis in Alzheimer’s disease. *Front Neurosci.* 2014; 8:147.
109. Marucci G. Commentary on human adult neurogenesis across the ages: An immunohistochemical study. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2017; 43(5):450–1.
110. Masliah E, Alford M, Adame A, Rockenstein E, Galasko D, Salmon D, et al. Abeta1-42 promotes cholinergic sprouting in patients with AD and Lewy body variant of AD. *Neurology.* 2003; 61(2):206–11.

111. Matsuda S, Kuwako K, Okano HJ, Tsutsumi S, Aburatani H, Saga Y, et al. Sox21 promotes hippocampal adult neurogenesis via the transcriptional repression of the Hes5 gene. *J Neurosci*. 2012; 32(36):12543–57.
112. Maurer K, Volk S, Gerbaldo H, Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet*. 1997; 349(9064):1546–9.
113. McCarthy MM, Nugent BM. At the frontier of epigenetics of brain sex differences. *Front Behav Neurosci*. 2015; 9:221.
114. Ming G-L, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*. 2011; 70(4):687–702.
115. Miyasaka T, Watanabe A, Saito Y, Murayama S, Mann DMA, Yamazaki M, et al. Visualization of newly deposited tau in neurofibrillary tangles and neuropil threads. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2005; 64(8):665–74.
116. Mogi M, Togari A, Kondo T, Mizuno Y, Komure O, Kuno S, et al. Brain-derived growth factor and nerve growth factor concentrations are decreased in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 1999; 270(1):45–8.
117. Moon M, Cha M-Y, Mook-Jung I. Impaired hippocampal neurogenesis and its enhancement with ghrelin in 5XFAD mice. *J Alzheimers Dis*. 2014; 41(1):233–41.
118. Mu Y, Gage FH. Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2011; 6:85.
119. Navarro V, Sanchez-Mejias E, Jimenez S, Muñoz-Castro C, Sanchez-Varo R, Davila JC, et al. Microglia in Alzheimer's Disease: Activated, Dysfunctional or Degenerative. *Front Aging Neurosci*. 2018; 10:140.
120. Nitta KR, Takahashi S, Haramoto Y, Fukuda M, Onuma Y, Asashima M. Expression of Sox1 during *Xenopus* early embryogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 351(1):287–93.
121. Nowak B, Zadrożna M, Ossowska G, Sowa-Kućma M, Gruca P, Papp M, et al. Alterations in hippocampal calcium-binding neurons induced by stress models of depression: a preliminary assessment. *Pharmacol Rep*. 2010; 62(6):1204–10.
122. Nowakowski RS, Lewin SB, Miller MW. Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *J Neurocytol*. 1989; 18(3):311–8.

123. Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, et al. Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci.* 2006; 26(40):10129–10140.
124. Orta-Salazar E, Vargas-Rodríguez I, Castro-Chavira SA, Feria-Velasco AI, Díaz-Cintra S. Alzheimer's Disease: From Animal Models to the Human Syndrome. U: Update on Dementia; Moretti D, Urednik.; Intech: Rijeka, Croatia, 2016; ISBN 978-953-51-2654-6.
125. Padurariu M, Ciobica A, Mavroudis I, Fotiou D, Baloyannis S. Hippocampal neuronal loss in the CA1 and CA3 areas of Alzheimer's disease patients. *Psychiatr Danub.* 2012; 24(2):152–8.
126. Pérez-Gracia E, Torrejón-Escribano B, Ferrer I. Dystrophic neurites of senile plaques in Alzheimer's disease are deficient in cytochrome c oxidase. *Acta Neuropathol.* 2008; 116(3):261–8.
127. Perl DP. Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med.* 2010; 77(1):32–42.
128. Pevny LH, Lovell-Badge R. Sox genes find their feet. *Curr Opin Genet Dev.* 1997; 7(3):338–44.
129. Pevny LH, Sockanathan S, Placzek M, Lovell-Badge R. A role for SOX1 in neural determination. *Development.* 1998; 125(10):1967–78.
130. Pevny L, Placzek M. SOX genes and neural progenitor identity. *Curr Opin Neurobiol.* 2005; 15(1):7–13.
131. Plümpe T, Ehniger D, Steiner B, Klempin F, Jessberger S, Brandt M, et al. Variability of doublecortin-associated dendrite maturation in adult hippocampal neurogenesis is independent of the regulation of precursor cell proliferation. *BMC Neurosci.* 2006; 7:77.
132. Popovic J, Stanisavljevic D, Schwirtlich M, Klajn A, Marjanovic J, Stevanovic M. Expression analysis of SOX14 during retinoic acid induced neural differentiation of embryonal carcinoma cells and assessment of the effect of its ectopic expression on SOXB members in HeLa cells. *PLoS ONE.* 2014; 9(3):e91852.

133. Priller C, Bauer T, Mitteregger G, Krebs B, Kretschmar HA, Herms J. Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J Neurosci.* 2006; 26(27):7212–21.
134. Prince M, Comas-Herrera A, Knapp M, Guerchet M, Karagiannidou, M. World Alzheimer Report 2016: improving healthcare for people living with dementia: coverage, quality and costs now and in the future. Alzheimer's Disease International (ADI), London, UK. Onlajn verzija. Pristupljeno u avgustu 2018. (<http://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2016.pdf>)
135. Reiprich S, Wegner M. Sox2: A multitasking networker. *Neurogenesis (Austin).* 2014; 1(1):e962391.
136. Reiprich S, Wegner M. From CNS stem cells to neurons and glia: Sox for everyone. *Cell Tissue Res.* 2015; 359(1):111–24.
137. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science.* 1992; 255(5052):1707–10.
138. Rodríguez JJ, Verkhratsky A. Neurogenesis in Alzheimer's disease. *J Anat.* 2011; 219(1):78–89.
139. Rossi C, Angelucci A, Costantin L, Braschi C, Mazzantini M, Babbini F, et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. *Eur J Neurosci.* 2006; 24(7):1850–6.
140. Rössler M, Zarski R, Bohl J, Ohm TG. Stage-dependent and sector-specific neuronal loss in hippocampus during Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2002; 103(4):363–9.
141. Sanabria-Castro A, Alvarado-Echeverría I, Monge-Bonilla C. Molecular Pathogenesis of Alzheimer's Disease: An Update. *Ann Neurosci.* 2017; 24(1):46–54.
142. Sandberg M, Källström M, Muhr J. Sox21 promotes the progression of vertebrate neurogenesis. *Nat Neurosci.* 2005; 8(8):995–1001.
143. Sarlak G, Vincent B. The Roles of the Stem Cell-Controlling Sox2 Transcription Factor: from Neuroectoderm Development to Alzheimer's Disease? *Mol Neurobiol.* 2016; 53(3):1679–98.

144. Saxena S, Caroni P. Selective neuronal vulnerability in neurodegenerative diseases: from stressor thresholds to degeneration. *Neuron*. 2011;71(1):35–48.
145. Schieb H, Kratzin H, Jahn O, Möbius W, Rabe S, Staufenbiel M, et al. Beta-amyloid peptide variants in brains and cerebrospinal fluid from amyloid precursor protein (APP) transgenic mice: comparison with human Alzheimer amyloid. *J Biol Chem*. 2011; 286(39):33747–58.
146. Schuff N, Woerner N, Boreta L, Kornfield T, Shaw LM, Trojanowski JQ, et al. MRI of hippocampal volume loss in early Alzheimer’s disease in relation to ApoE genotype and biomarkers. *Brain*. 2009; 132(Pt 4):1067–77.
147. Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2011; 1(1):a006189.
148. Shohayeb B, Diab M, Ahmed M, Ng DCH. Factors that influence adult neurogenesis as potential therapy. *Transl Neurodegener*. 2018; 7:4.
149. Sorrells SF, Paredes MF, Cebrian-Silla A, Sandoval K, Qi D, Kelley KW, et al. Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature*. 2018; 555(7696):377–81.
150. Spalding KL, Bergmann O, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Huttner HB, et al. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell*. 2013; 153(6):1219–27.
151. Spears W, Furgerson M, Sweetnam JM, Evans P, Gearing M, Fechtmeier M, et al. Hirano bodies differentially modulate cell death induced by tau and the amyloid precursor protein intracellular domain. *BMC Neurosci*. 2014; 15:74.
152. Steiner B, Klempin F, Wang L, Kott M, Kettenmann H, Kempermann G. Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis. *Glia*. 2006; 54(8):805–14.
153. Sun LY, Bartke A. Adult neurogenesis in the hippocampus of long-lived mice during aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2007; 62(2):117–25.
154. Swerdlow RH. Pathogenesis of Alzheimer’s disease. *Clin Interv Aging*. 2007; 2(3):347–59.

155. Teixeira CM, Pallas-Bazarra N, Bolós M, Terreros-Roncal J, Ávila J, Llorens-Martín M. Untold New Beginnings: Adult Hippocampal Neurogenesis and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2018; 64(s1):S497–505.
156. Thal DR, Rüb U, Orantes M, Braak H. Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology.* 2002; 58(12):1791–800.
157. Toda T, Parylak SL, Linker SB, Gage FH. The role of adult hippocampal neurogenesis in brain health and disease. *Mol Psychiatry.* 2019; 24(1):67-87.
158. Uchikawa M, Kamachi Y, Kondoh H. Two distinct subgroups of Group B Sox genes for transcriptional activators and repressors: their expression during embryonic organogenesis of the chicken. *Mech Dev.* 1999; 84(1–2):103–20.
159. Unger MS, Marschallinger J, Kaindl J, Höfling C, Rossner S, Heneka MT, et al. Early Changes in Hippocampal Neurogenesis in Transgenic Mouse Models for Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol.* 2016; 53(8):5796–806.
160. Van Bokhoven P, Oomen CA, Hoogendijk WJG, Smit AB, Lucassen PJ, Spijker S. Reduction in hippocampal neurogenesis after social defeat is long-lasting and responsive to late antidepressant treatment. *Eur J Neurosci.* 2011;33(10):1833–40.
161. van Dyck CH. Anti-Amyloid- β Monoclonal Antibodies for Alzheimer's Disease: Pitfalls and Promise. *Biol Psychiatry.* 2018; 83(4):311–9.
162. van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci.* 1999; 2(3):266–70.
163. Varela-Nallar L, Aranguiz FC, Abbott AC, Slater PG, Inestrosa NC. Adult hippocampal neurogenesis in aging and Alzheimer's disease. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2010; 90(4):284–96.
164. Velez-Pardo C, Arellano JI, Cardona-Gomez P, Jimenez Del Rio M, Lopera F, De Felipe J. CA1 hippocampal neuronal loss in familial Alzheimer's disease presenilin-1 E280A mutation is related to epilepsy. *Epilepsia.* 2004; 45(7):751–6.
165. Venere M, Han Y-G, Bell R, Song JS, Alvarez-Buylla A, Blesch R. Sox1 marks an activated neural stem/progenitor cell in the hippocampus. *Development.* 2012; 139(21):3938–49.

166. Wang P, Yang G, Mosier DR, Chang P, Zaidi T, Gong Y-D, et al. Defective neuromuscular synapses in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-Like protein 2. *J Neurosci*. 2005; 25(5):1219–25.
167. Wang L, Chang X, She L, Xu D, Huang W, Poo M. Autocrine action of BDNF on dendrite development of adult-born hippocampal neurons. *J Neurosci*. 2015; 35(22):8384–93.
168. Waterhouse EG, An JJ, Orefice LL, Baydyuk M, Liao G-Y, Zheng K, et al. BDNF promotes differentiation and maturation of adult-born neurons through GABAergic transmission. *J Neurosci*. 2012; 32(41):14318–30.
169. Wegiel J, Bobinski M, Tarnawski M, Dziewiatkowski J, Popovitch E, Miller DC, et al. Fibrillar amyloid-beta affects neurofibrillary changes but only in neurons already involved in neurofibrillary degeneration. *Acta Neuropathol*. 2001; 101(6): 585–90.
170. Wegner M. From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res*. 1999; 27(6):1409–20.
171. Wegner M. SOX after SOX: SOXession regulates neurogenesis. *Genes Dev*. 2011; 25(23):2423–8.
172. Wen PH, Hof PR, Chen X, Gluck K, Austin G, Younkin SG, et al. The presenilin-1 familial Alzheimer disease mutant P117L impairs neurogenesis in the hippocampus of adult mice. *Exp Neurol*. 2004; 188(2):224–37.
173. West MJ, Coleman PD, Flood DG, Troncoso JC. Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet*. 1994; 344(8925):769–72.
174. Whittington N, Cunningham D, Le T-K, De Maria D, Silva EM. Sox21 regulates the progression of neuronal differentiation in a dose-dependent manner. *Dev Biol*. 2015; 397(2):237–47.
175. Williamson KA, Hever AM, Rainger J, Rogers RC, Magee A, Fiedler Z, et al. Mutations in SOX2 cause anophthalmia-esophageal-genital (AEG) syndrome. *Hum Mol Genet*. 2006; 15(9):1413–22.
176. Wimo A, Guerchet M, Ali G-C, Wu Y-T, Prina AM, Winblad B, et al. The worldwide costs of dementia 2015 and comparisons with 2010. *Alzheimers Dement*. 2017; 13(1):1–7.

177. Winner B, Winkler J. Adult neurogenesis in neurodegenerative diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015; 7(4):a021287.
178. Wirths O. Altered neurogenesis in mouse models of Alzheimer disease. *Neurogenesis (Austin).* 2017; 4(1):e1327002.
179. Yang C-M, Wang T-H, Chen H-C, Li S-C, Lee M-C, Liou H-H, et al. Aberrant DNA hypermethylation-silenced SOX21-AS1 gene expression and its clinical importance in oral cancer. *Clin Epigenetics.* 2016; 8:129.
180. Yu Y, He J, Zhang Y, Luo H, Zhu S, Yang Y, et al. Increased hippocampal neurogenesis in the progressive stage of Alzheimer's disease phenotype in an APP/PS1 double transgenic mouse model. *Hippocampus.* 2009; 19(12):1247–53.
181. Zaletel I, Filipović D, Puškaš N. Hippocampal BDNF in physiological conditions and social isolation. *Rev Neurosci.* 2017; 28(6):675–92.
182. Zaletel I, Schwirtlich M, Perović M, Jovanović M, Stevanović M, Kanazir S, et al. Early Impairments of Hippocampal Neurogenesis in 5xFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease Are Associated with Altered Expression of SOXB Transcription Factors. *J Alzheimers Dis.* 2018; 65(3):963–76.
183. Zarow C, Vinters HV, Ellis WG, Weiner MW, Mungas D, White L, et al. Correlates of hippocampal neuron number in Alzheimer's disease and ischemic vascular dementia. *Ann Neurol.* 2005; 57(6):896–903.
184. Zhang S, Cui W. Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World J Stem Cells.* 2014; 6(3):305–11.
185. Zhang J, Jiao J. Molecular Biomarkers for Embryonic and Adult Neural Stem Cell and Neurogenesis. *Biomed Res Int.* 2015; 2015:727542.
186. Zhang L, Fang Y, Cheng X, Lian Y-J, Xu H-L. Silencing of Long Noncoding RNA SOX21-AS1 Relieves Neuronal Oxidative Stress Injury in Mice with Alzheimer's Disease by Upregulating FZD3/5 via the Wnt Signaling Pathway. *Mol Neurobiol.* 2018; [ahead of print].
187. Zhao B, Zhong M, Jin K. Neurogenesis and neurodegenerative diseases in human. *Panminerva Med.* 2008; 50(1):55–64.
188. Ziegler-Waldkirch S, d'Errico P, Sauer J-F, Erny D, Savanthrapadian S, Loreth D, et al. Seed-induced A β deposition is modulated by microglia under

environmental enrichment in a mouse model of Alzheimer's disease. *EMBO J.* 2018; 37(2):167–82.

Spisak skraćenica

A β – amiloid beta

A β PP/APP - amiloidni beta prekursorski protein

sAPP – rastvorljiva forma amiloidnog beta prekursorškog proteina

AB – Alchajmerova bolest

APH-1 – eng. *anterior pharynx defensive phenotype 1*; odbrambeni fenotip 1 prednjeg farinksa

apoE – apolipoprotein E

BACE1 – eng. *beta-site APP cleaving enzyme 1*; enzim 1 koji cepa APP na beta lokaciji

BCL2 – eng. *B-cell lymphoma*; B-ćelijski limfom

BDNF – eng. *brain-derived neurotrophic factor*; neurotrofički faktor poreklom iz mozga

BLBP – eng. *brain lipid-binding protein*; moždani lipid-vezujući protein

BrdU – bromodeoksiuridin

BSA – eng. *bovine serum albumin*; albumin iz goveđeg seruma

CA – lat. *Cornu Ammonis*; Amonov rog

DAB – 3,3'-diaminobenzidin

DAPI – diaminofenilindolom

DCX – eng. *doublecortin*; dablkortin

DG – dentatni girus

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

EDTA – etilendiamintetrasirćetna kiselina

FAD – eng. *Familial Alzheimer's disease*; Familijarni oblik Alchajmerove bolesti

GAD – eng. *glutamate decarboxylase*; glutamat dekarboksilaza

GFAP – eng. *glial fibrillary acidic protei*; glijalni kiseli fibrilarni protein

HDAC1 – eng. *histone deacetylase 1*; histon deacetilaza 1

HMG – eng. *high-mobility group*

HRP – eng. *horse radish peroxidase*

lncRNA – eng. *long non-coding RNA*; duga nekodirajuća ribonukleinska kiselina

LTP – eng. *long-term potentiation*; dugotrajna potencijacija

MAP2ab – eng. *microtubule-associated protein 2 ab*; mikrotubularni asocirani protein 2 ab

NeTg – netransgeni miševi

NeTg M – netransgeni mužjaci

NeTg Ž – netransgene ženke

NeuN – eng. *neuronal nuclei*; neuronsko jedro

NeuroD1 – eng. *neurogenic differentiation 1*; neurogena diferencijacija 1

NSCs – eng. *neural stem cells*; neuralne matične ćelije

NSPCs – eng. *neural stem/precursor cells*; neuralne matične/prekursorske ćelije

Pax6 – eng. *paired box protein Pax-6*; upareni box protein Pax-6

PBS – engl. *phosphate-buffered saline*; fiziološki rastvor sa dodatkom fosfata

PCNA – eng. *proliferating cell nuclear antigen*; jedarni antigen proliferišućih ćelija

PCR – eng. *polymerase chain reaction*; lančana reakcija polimeraze

PEN-2 – eng. *PS-enhancer 2*; PS pojačivač 2

Prox1 – eng. *prospero homeobox protein 1*

PSA-NCAM – eng. *polysialylated-neural cell adhesion molecule*; polisijalizovani neuralni ćelijski adhezioni molekul

PSEN – presenilin

SDS – eng. *sodium dodecyl sulfate*; natrijum dodecil sulfat

SGZ – subgranularna zona

SOX – eng. *SRY Related High Mobility Group Box*

Tg – transgeni miševi

Tg M – transgeni mužjaci

Tg Ž – transgene ženke

TrkB – eng. *tropomyosin-related kinase B*

TuJ1 – eng. *neuron-specific class III beta-tubulin*; neuron-specifična klasa III beta-tubulina

Biografija

Dr Ivan Zaletel rođen je 29. marta 1988. godine u Beogradu, gde je završio osnovu školu i Devetu gimnaziju „Mihailo Petrović Alas”. Medicinski fakultet upisao je 2007. godine, a diplomirao 2013. godine sa prosečnom ocenom 9,78. Od druge godine studija bio je redovni demonstrator na Institutu za histologiju i embriologiju „Aleksandar Đ. Kostić”. Dobitnik je brojnih stipendija i nagrada među kojima je i pohvalnica za najboljeg studenta četvrte godine Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Specijalističke akademske studije na Medicinskom fakultetu u Beogradu, modul Citologija, histohemija, elektronska mikroskopija i embriologija upisao je 2013. godine, a završni specijalistički akademski rad pod nazivom „Uticaj hroničnog stresa na histološke karakteristike hipokampusa pacova” odbranio je 2015. godine.

Doktorske akademske studije na Medicinskom fakultetu, modul Molekularna medicina, upisao je 2014. godine, a zdravstvenu specijalizaciju iz Patologije 2017. godine.

Izabran je za saradnika u nastavi na predmetu Histologija i embriologija 2014. godine, reizabran 2015. godine, a 2016. godine je izabran u zvanje asistenta.

Angažovan je kao istraživač saradnik na projektu finansiranom od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, „Antioksidativna zaštita i potencijali za diferencijaciju i regeneraciju mezenhimalnih matičnih ćelija iz različitih tkiva tokom procesa starenja”, kojim rukovodi profesor dr Milica Kovačević Filipović.

Član je Društva za neuronauke Srbije (DNS), Federation of European Neuroscience Societies (FENS), Udruženja patologa i citologa Srbije (UPCS), kao i European Society of Pathology (ESP).

Dr Ivan Zaletel je bio mentor i komentor na brojnim studentskim naučno-istraživačkim radovima koji su prezentovani na kongresima u zemlji i inostranstvu. Autor i koautor je velikog broja radova, od čega su 24 rada objavljena u časopisima indeksiranim u MEDLINE bazi. Ovi radovi su prema SCOPUS-u citirani 80 puta (*h*-indeks = 5).

Oženjen je Jovanom i otac je ćerke Hane.

Prilozi

Prilog 1

Izjava o autorstvu

Potpisani-a: Ivan Zaletel

broj upisa: MM11/14

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Ispitivanje poremećaja neurogeneze u subgranularnoj zoni hipokampusa na mišjem modelu Alchajmerove bolesti

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 28.3.2019. godine



Prilog 2

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Ivan Zaletel

Broj upisa: MM11/14

Studijski program: Molekularna medicina

Naslov rada: Ispitivanje poremećaja neurogeneze u subgranularnoj zoni hipokampusu na mišjem modelu Alchajmerove bolesti

Mentor: prof. dr Nela Puškaš

Potpisani: Ivan Zaletel

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 28.3.2019. godine



Prilog 3

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Ispitivanje poremećaja neurogeneze u subgranularnoj zoni hipokampusa na mišjem modelu Alchajmerove bolesti

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo – nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 28.3.2019. godine



1. Autorstvo – Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.