

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE
KATEDRA ZA PATOLOŠKU MORFOLOGIJU

Sladjan N. Nešić

Patomorfološke i imunohistohemijske
karakteristike promena u mozgu starih
pasa

Doktorska disertacija

Beograd, 2014.

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE
KATEDRA ZA PATOLOŠKU MORFOLOGIJU

Sladjan N. Nešić

Patomorfološke i imunohistohemijske
karakteristike promena u mozgu starih
pasa

Doktorska disertacija

Beograd, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
DEPARTMENT OF PATHOLOGY

Sladjan N. Nešić

Pathomorphological and
immunohistochemical characteristics of
changes in the brain of aged dogs
Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

Mentor:

Dr Milijan Jovanović, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine.

Članovi komisije:

Dr Milica Skender-Gazibara, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet,

Dr Sanja Aleksić-Kovačević, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine,

Dr Darko Marinković, docent, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine,

Dr Nenad Andrić, docent, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine.

Datum odbrane: . . .2014.

IZJAVE ZAHVALNOSTI

Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za patološku morfologiju, Fakulteta veterinarske medicine, pod mentorstvom dr Milijana Jovanovića, redovnog profesora FVM. Ovom prilikom se srdačno i neizmerno zahvaljujem profesoru Jovanoviću, što me je podstakao i omogućio mi da se bavim ovom aktuelnom tematikom, kao i na strpljenju, uloženom trudu, podršci i stručnim savetima tokom izrade ove doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem na stručnoj pomoći, savetima i sadržajnim sugestijama pri konačnom formulisanju ove teze, ostalim članovima komisije: dr Milici Skender-Gazibari, redovnom profesoru Medicinskog fakulteta u Beogradu, dr Sanji Aleksić-Kovačević, redovnom profesoru FVM u Beogradu, dr Darku Marinković, docentu FVM u Beogradu, dr Nenadu Andrić, docentu FVM u Beogradu.

Tokom postdiplomskih studija i početnog dela izrade doktorske disertacije, bio sam stipendista Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, na projektu br. TR 20061, pod nazivom „Savremene molekularne i imunske metode u dijagnostici obolenja domaćih životinja izazvanih živim agensima“, i na tome se srdačno zahvaljujem rukovodiocu projekta Prof. dr Milijani Knežević. Profesorki Knežević dugujem zahvalnost za stručnu i prijateljsku podršku.

Posebno hvala dr Vladimiru Kukulj, docentu FVM i mr Ivani Vučićević, asistentu FVM, za saradnju, bezrezervnu podršku, prijateljsku pomoć i veoma korisne savete, koji su umnogome doprineli kvalitetu ove disertacije.

Značajnu pomoć sam dobio od Snežane Stevanović, Milice Vukelić i Marije Stanišić, laboranata Katedre za patološku morfologiju FVM, i ovom prilikom im se najiskrenije zahvaljujem.

Posebno zahvaljujem svojoj porodici čija ljubav, strpljivost i razumevanje su mi, umnogome, olakšali da završim doktorsku disertaciju.

I na kraju, zahvaljujem se svim ostalim prijateljima i kolegama, koji su me tokom izrade ove teze podržavali, pomagali i savetovali.

PATOMORFOLOŠKE I IMUNOHISTOHEMIJSKE KARAKTERISTIKE PROMENA U MOZGU STARIH PASA

REZIME

Starenje je univerzalni biološki proces tokom kojeg mogu nastati brojne promene u moždanom tkivu. Neke od starosnih promena su makroskopski vidljive, dok se većina može otkriti histološkom analizom. U ovom radu ispitivano je prisustvo starosnih promena u moždanom tkivu 36 pasa, koji su bili podeljeni u dve grupe: kontrolnu i eksperimentalnu. Kontrolnu grupu je činilo 6 pasa starosti do pet godina, a eksperimentalnu 30 pasa starijih od deset godina. Nakon obavljene nekropsije moždano tkivo pasa je makroskopski analizirano, fiksirano u formalinu i uklapano u parafinske blokove. Tkivni isečci su bojani metodama: hematoksilin eozin, kongo crveno, modifikovana *Ziehl Neelsen*, PAS i imunohistohemijskom tehnikom streptavidin-biotin (LSAB2). Od primarnih antitela korišćena su: poliklonsko antitelo za beta amiloid (A β 1-14), monoklonsko antitelo za beta amiloid (A β 1-42), poliklonsko antitelo za amiloid prekursor protein, monoklonsko antitelo za ubikvitin, monoklonsko antitelo za metalotionein I i II, poliklonsko antitelo za GFAP i poliklonsko antitelo za tau protein.

Makroskopskim ispitivanjem mozga kod eksperimentalnih životinja uočene su promene, koje su se ispoljavale kao difuzno zadebljanje mekih moždanica, kortikalna atrofija sa suženjem vijuga i proširenjem brazda i blago proširenje lateralnih moždanih komora. Histološkom analizom moždanog tkiva ustanovljene su sledeće promene: fibroza moždanica i zida krvnih sudova, neuronofagija, satelitoza, astrocitoza, astrogljoza, depoziti amiloida, nakupine lipofuscina, prisustvo ubikvitinskih granula i poliglukozanskih tela. Prisustvo starosnih promena ispitivano je u frontalnoj i parijetalnoj kori, hipokampusu, malom mozgu i produženoj moždini. Segmenti mozga koji su najčešće zahvaćeni histološkim promenama bili su frontalna i parijetalna kora, kao i hipokampus. Depoziti amiloida su dokazani metodom bojenja kongo crvenog i imunohistohemijski u zidu cerebralnih krvnih sudova i moždanom parenhimu. Amiloid u zidu parenhimskih i meningealnih krvnih sudova dokazan metodom bojenja kongo crvenog pod polarizacionim svetlom pokazivao je žuto zelenu fluorescenciju. Ovi depoziti bili su imunohistohemijski pozitivni na A β 1-14 i A β 1-42. Amiloid se u moždanom parenhimu nakuplja ekstracelularno u obliku plakova i intracelularno.

Plakovi su bili imunohistohemijski pozitivni na A β 1-14 i A β 1-42, dok su intracelularne nakupine pokazale imunohistohemijsku pozitivnu reakciju samo na A β 1-14. Kod starih pasa ustanovljeno je povećanje amiloid prekursor proteina u odnosu na kontrolnu grupu pasa. Takođe, kod starijih jedinki je uočeno povećanje količine lipofuscina u neuronima, kao i veći broj ćelija u kojima se on nakuplja. Nakupine lipofuscina su dokazane u svim ispitivanim regionima mozga kod pasa eksperimentalne grupe, ali su najčešće bile prisutne u poduženoj moždini. Prisustvo fosforilisanog tau proteina u neuronima pasa nije ustanovljeno. Veća količina ubikvitina u glija ćelijama i neuronima starih pasa upućuje na zaključak da se u ovim ćelijama odvija pojačana razgradnja proteina i razvoj regresivnih promena. Na pojačanu reaktivnost astrocita ukazivala je imunohistohemijski pozitivna reakcija na GFAP i metalotionein I i II, pri čemu je intenzivnija reakcija kod starijih jedinki. Primenom PAS metode ustanovljeno je ekstracelularno i intracelularno prisustvo poliglukozanskih tela u moždanom tkivu pasa eksperimentalne grupe. Uočene sličnosti između promena u mozgu starih pasa, ustanovljenih u ovom ispitivanju i promena koje se javljaju kod starih ljudi i osoba obolelih od pojedinih neurodegenerativnih oboljenja, ukazuju o pogodnosti korišćenja psa kao dobrog eksperimentalnog modela za proučavanje starosnih promena u mozgu.

Ključne reči: proces starenja, pas, mozak, starosne promene, amiloid, lipofuscin

NAUČNA OBLAST: Veterinarska medicina.

UŽA NAUČNA OBLAST: Patologija.

UDK BROJ: 619:636.7:616

PATHOMORPHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL
CHARACTERISTICS OF CHANGES IN THE BRAIN OF AGED DOGS

SUMMARY

Aging is a universal biological process accompanied with numerous changes in the brain. Some of the age-related changes are macroscopically visible, while most of them can be detected only by microscopic examination of the tissues. In this study the presence of age-related changes in the brain of thirty-six adult dogs were examined. These dogs were divided into 2 groups: experimental and control. The control group consisted of 6 dogs aged up to five years while the experimental group comprised 30 dogs older than ten years of age. Necropsies had been performed on all dogs and the brains were macroscopically analyzed, fixed in formalin and embedded in paraffin blocks. The tissue sections were stained by the following methods: hematoxylin-eosin, Congo red, modified *Ziehl Neelsen*, PAS and immunohistochemical method streptavidin-biotin (LSAB2). As primary antibodies were used: polyclonal antibody against A β -14, monoclonal antibody against A β 1-42, polyclonal antibody against amyloid precursor protein, ubiquitin monoclonal antibody, monoclonal antibody against metalotionein I and II, GFAP polyclonal antibody and a anti-Tau polyclonal antibody.

The most common macroscopic changes in the brain of experimental animals were diffuse leptomenigeal thickening, cortical atrophy with narrowing of the gyri and widening of the sulci, and mild lateral ventricle enlargement. Meningeal fibrosis and fibrosis of the brain blood vessel wall, neuronophagia, satellitosis, astrocytosis, astrogliosis, accumulation of amyloid and lipofuscin and the presence of ubiquitinated and polyglucosan bodies were detected microscopically. The presence of age-related changes was studied in the frontal and parietal cortex, hippocampus, cerebellum and medulla oblongata. The hippocampus, frontal and parietal cortex were the most commonly affected by the above mentioned changes. Amyloid deposits were identified in the walls of cerebral blood vessels and brain parenchyma using Congo red and immunohistochemical staining. The deposits of amyloid in parenchymal and meningeal blood vessels that had been detected by Congo red staining showed a yellow-green fluorescence under polarized light and were A β 1-14 and A β 1-42 immunohistochemically positive. Amyloid accumulated extracellularly in the brain

parenchyma in the form of plaques and intracellularly. The plaques were A β 1-14 and A β 1-42 immunohistochemically positive, while the intracellular deposits were only A β 1-14 immunohistochemically positive. In old dogs compared to the control group an increase of amyloid precursor protein expression was found. In addition, we observed in old dogs an increase of lipofuscin accumulation in neurons, as well as greater numbers of lipofuscin containing cells. Accumulations of lipofuscin were observed in all examined segments of the dog brains from the experimental group and they were most frequently present in the medulla oblongata. The presence of phosphorylated tau protein was not detected in dog neurons. The greater amount of ubiquitin in glial cells and neurons of old dogs suggests that these cells have increased protein degradation and development of regressive changes. GFAP and metallothionein I and II immunohistochemically positive reactions indicate increased astrocytes reactivity, whereby the reaction was more intense in old dogs. The extracellular and intracellular presence of polyglucosan bodies in the brain tissue of dogs from the experimental group was observed using the PAS method. The observed correlations between changes occurring in the brain of old dogs and those that occur in old people and patients with certain neurodegenerative diseases, indicate that dogs could be used as an animal model for the study of age-related changes in the brain.

Keywords: aging, dog, brain, age-related changes, amyloid, lipofuscin.

SCIENTIFIC FIELD: Veterinary medicine

SCIENTIFIC DISCIPLINE: Pathology

UDK NUMBER: 619:636.7:616

SADRŽAJ

0	SPISAK SKRAĆENIH NAZIVA KORIŠĆENIH U TEKSTU	1
1.	UVOD	3
2.	PREGLED LITERATURE	6
2.1.	MAKROSKOPSKE I PATOHISTOLOŠKE PROMENE U MOZGU	6
2.2.	AMILOID PREKURSOR PROTEIN	7
2.3.	AMILOID	10
2.4.	VRSTE DEPOZITA AMILOIDA U MOZGU	19
	2.4.1. Amiloidni (senilni) plakovi	20
	2.4.2. Cerebralna amiloidna angiopatija	23
2.5.	ALZHEIMER-OVA BOLEST	25
2.6.	EKSPERIMENTALNI MODELI	27
2.7.	INTRACELULARNE PROMENE U NEURONIMA	31
2.8.	METALOTIONEINI	32
2.9.	UBIKVITIN	34
2.10.	LIPOFUSCIN	35
2.11.	POLIGLUKOZANSKA TELA	41
3.	CILJEVI I ZADACI	44
4.	MATERIJAL I METODE	45
4.1.	MATERIJAL	45
	4.1.1. Ispitivani materijal	45
	4.1.2. Eksperimentalne grupe	45
	4.1.3. Priprema histoloških preparata	45
4.2.	METODE	46
	4.2.1 Hematoksilin eozin	46
	4.2.2. Kongo crveno (<i>Congo red</i>)	46

4.2.3.	Modifikovana <i>Ziehl Neelsen</i> metoda	47
4.2.4.	PAS (<i>Periodic acid Schiff</i>) metoda	47
4.2.5	Imunohistohemijska metoda	48
4.2.6.	Statistička obrada	49
5.	REZULTATI	50
5.1.	MAKROSKOPSKE PROMENE	50
5.2.	PATOHISTOLOŠKE PROMENE	50
5.3.	FIBROZA MOŽDANICA	51
5.4.	GLIOZA	51
5.4.1	Astrocitoza i astroglioza	51
5.4.2.	Satelitoza i neuronofagija	55
5.5.	PROMENE NA KRVNIM SUDOVIMA	57
5.5.1.	Fibroza zida moždanih krvnih sudova	57
5.5.2.	Perivaskularni edem	57
5.5.3.	Perivaskularni infiltrat	58
5.6.	AMILOID	59
5.7.	AMILOID PREKURSOR PROTEIN (APP)	64
5.8.	TAU PROTEIN	64
5.9.	UBIKVITIN	64
5.10.	LIPOFUSCIN	66
5.11.	POLIGLUKOZANSKA TELA	69
6.	DISKUSIJA	71
7.	ZAKLJUČCI	84
8.	LITERATURA	85

0 SPISAK SKRAĆENIH NAZIVA KORIŠĆENIH U TEKSTU

AD - *Alzheimer's disease*

ADAM - *a disintegrin and metalloproteinases*

AICD - *amyloid precursor protein intracellular domain*

APH-1 - *anterior pharynx defective-1*

APP - *amyloid precursor protein*

A β - *beta (β) amyloid*

BACE - *β -site APP-cleaving enzyme*

BDNF - *brain-derived neurotrophic factor*

CA – *corpora amylacea (korpora amilacea)*

CAA - *cerebral amyloid angiopathy (cerebralna amiloidna angiopatija)*

CNS – *central nervous system (centralni nervni sistem)*

DNK – *dezoksiribonukleinska kiselina*

EPM2A - *epilepsy progressive myoclonus type 2A*

EPM2B - *epilepsy progressive myoclonus type 2B*

FAD - *familial early-onset Alzheimer's disease*

GBED - *glycogen branching enzymes deficiency disease*

GFAP - *glial fibrillary acidic protein*

GIF - *growth inhibitory factor*

HE – *hematoksilin eozin*

HNE - *2-hidroksi-4-trans nonelal*

LRP-1 - *lipoprotein receptor-related protein-1*

MAGUK - *membrane associated guanylate kinase*

MMP - *matrix metalloproteinases*

mRNA - *messenger ribonucleic acid*

MT - *metalotionein*

NFT - *neurofibrillary tangles*

NSE - *neurone-specific enolase*

PAS - *periodic acid Schiff*

PEN-2 - *presenilin enhancer-2*

PGB - *polyglucosan bodies*

PSEN - *presenilin*

ROS - *reactive oxygen species*

mRNA - *messenger ribonucleic acid*

SAD - *sporadic late onset Alzheimer's disease*

SDAT - *senile dementia Alzheimer's type*

ccSDAT - *canine counterpart of the senile dementia of the Alzheimer type*

SORL1 (SORLA, SORLA1 ili LR11) - *sortilin-related receptor, L (DLR class), A repeats-containing*

ZO - *zonula occludens proteins*

1. UVOD

Starenje je univerzalni biološki proces tokom kojeg dolazi do oštećenja homeostatskih mehanizama. Starost i proces starenja kao fenomen proučavani su vekovima, ali ni danas ne postoji potpuna i jedinstvena definicija starosti, niti sveobuhvatno objašnjenje procesa starenja. U širem smislu, starenje podrazumeva ireverzibilan proces koji se sastoji iz dve faze. Prva faza procesa starenja, po ovoj definiciji, započinje od samog začeca, pri čemu ona predstavlja fazu rasta i razvoja organizma, dok u drugoj fazi dolazi do poremećaja funkcija organizma sa posledičnim slabljenjem. U užem smislu, starenje predstavlja fazu involucije, tj. samo drugu fazu starenja po pomenutoj definiciji. Uopšteno govoreći, vrlo je teško napraviti granicu između faze rasta i involucije i odrediti pokazatelje koji bi ove dve faze jasno razdvojili.

Starenje se u savremenoj gerontologiji na osnovu dinamike može podeliti na fiziološko i patološko. Fiziološko starenje karakteriše usklađeno usporavanje funkcija ćelija, tkiva i organa i predstavlja „normalan“ proces starenja, dok je patološko starenje proces pri kome dolazi do narušavanja opšteg stanja jedinke u bilo kom dobu života, a vezano je za pojavu neke bolesti ili oštećenja jedinke koja dovode do prevremene starosti i smrti.

Postoje različite teorije koje pokušavaju da objasne uzroke procesa starenja i starosnih promena. Antička „humoralna teorija starenja“ predstavlja prvi pokušaj da se objasni proces starenja. Po ovoj teoriji, starenje predstavlja poremećaj humoralne ravnoteže u organizmu izazvan gubitkom „urođene toplote“, koju svako živo biće dobija svojim nastankom. U 19. veku pojavile su se razne „metaboličke teorije“, koje su starenje posmatrale kao postepeno smanjenje intenziteta metaboličkih procesa („zamor materijala“), pri čemu dolazi do gašenja životne energije. Kasnije se javljaju i mnoge druge teorije procesa starenja kao što su adaptaciono-regulacione, genetske i psihološke teorije. Takođe, danas postoji više teorija o samom uzroku procesa starenja, kao što su teorija slobodnih radikala, teorija somatskih mutacija, „mitohodrijalna teorija“, teorija akumulacije abnormalnih proteina, imunska teorija i neke druge. U svim pomenutim teorijama polazi se od činjenice da postoji jedan uzrok za starenje, međutim danas se zna da je starenje prouzrokovano brojnim faktorima zbog kojih nastaju različite promene. Starosne promene podrazumevaju oštećenje molekula, ćelija, tkiva i na kraju

organa pod dejstvom velikog broja štetnih agenasa, kao što su fizički i hemijski faktori (oksidacija, radijacija, teški metali i dr.). Prethodno pomenuti faktori oštećuju proteine, lipide ili DNK zbog čega dolazi do ćelijske smrti, gubitka funkcije nekog organa, što na kraju može da rezultira i uginućem jedinke ako je u pitanju vitalni organ. Proces starenja u ćeliji prate promene u metabolizmu proteina sa usporavanjem prometa i akumulacijom intracelularnih proteina koji postaju disfunkcionalni. Pored akumulacije proteina u procesu starenja ćelije može doći do nagomilavanja lipida, toksina, slobodnih radikala, pigmenta itd. Sve ovo dovodi do oštećenja mehanizama homeostaze i samim tim do narušavanja metaboličke ravnoteže, zbog čega se može reći da starenje karakteriše skup univerzalnih, progresivnih, štetnih i ireverzibilnih promena.

Životni vek čoveka i životinja je značajno produžen razvojem tehnologije, medicine i ishrane, čime je omogućeno da promene, koje nastaju tokom starenja, budu izraženije i uočljivije. Starosne promene najviše su istraživane kod ljudi, nekih primata, miševa i pasa, ali su opisane i kod drugih sisara: medveda, mačaka, krava, koza, ovaca, svinja, konja.

Štetni efekti nastali u procesu starenja najbolje se mogu uočiti i pratiti u tkivima na postmitotičkim ćelijama, jer u njima letalno oštećene ćelije ne mogu biti zamenjene novim intaktnim ćelijama. U ovu grupu tkiva spada nervno tkivo sa svojom centralnom ulogom u održavanju homeostaze organizma. Mozak tokom života trpi morfološke i funkcionalne promene pri čemu dolazi do modifikacija sinapsi, slabljenja cirkulacije i poremećaja metabolizma.

Iako su za izučavanje starosnih promena u mozgu kod ljudi korišćeni različiti animalni modeli, najčešće su ispitivanja vršena na psima, zbog sličnosti promena. Psi takođe, mogu ispoljiti jasne znake kognitivnih poremećaja, a sa čovekom dele životni prostor i mogući štetni uticaj različitih faktora. Zbog toga se smatra, da je pas jedan od boljih modela za proučavanje promena u centralnom nervnom sistemu, koje se javljaju u procesu starenja kao i kod nekih neurodegenerativnih oboljenja, kao što je *Alzheimer*-ova bolest.

Promene nastale tokom starenja mogu se ispoljiti na makroskopskom i mikroskopskom nivou. Neke od promena na mozgu starih pasa, kao što su suženje

girusa i proširenje sulkusa i moždanih komora, mogu se uočiti makroskopski, dok se promene na meningealnim i parenhimskih krvnim sudovima, neuronima, glija ćelijama i neuropilu, mogu da uoče mikroskopski.

Ekstracelularno nakupljanje amiloida, intraneuronska akumulacija neurofibrilarne klubadi i gubitak neurona predstavljaju najbitnije mikroskopske promene kod starih ljudi i ljudi obolelih od senilne demencije *Alzheimer* tipa (SDAT). Početkom XX veka *Alzheimer* je ustanovio prisustvo amiloidnih plakova i neurofibrilarnih nakupina kod pacijenata sa demencijom. Neposredno pre *Alzheimer*-ovog otkrića, kod pacijenata sa epilepsijom (1892.god., *Blocq i Marinesco*) i senilnom demencijom (1898. god., *Emil Redlich*) opisani su svojevrsni depoziti u mozgu prvobitno označeni kao „milijarne nekroze“, a kasnije kao senilni plakovi. Ustanovljeno je da senilne plakove gradi protein, koji se naziva β -amiloid ($A\beta$), a koji nastaje skraćivanjem većeg proteina, amiloid prekursor proteina (*amyloid precursor protein*, APP - eng.). Pored toga što se amiloid može odlagati u neuropilu moždanog tkiva, kada nastaju različite forme plakova, on se može akumulirati u zidu krvnih sudova, što se označava kao cerebralna amiloidna angiopatija (*cerebral amyloid angiopathy*, CAA, eng.).

U mozgu pasa tokom starenja mogu nastati slične ili istovetne promene kao kod ljudi, mada u literaturi postoje podeljenja mišljenja oko tipova amiloidnih plakova kao i oko pojave neurofibrilarne klubadi. Pored toga, nedovoljno je poznata uloga nekih proteina, kao što su metalotioneini i ubikvitin, u procesu nastajanja staračkih promena. Sve to nas je navelo da u ovoj doktorskoj disertaciji pristupimo izučavanju patomorfoloških promena kao i histohemijskom i imunohistohemijskom dokazivanju patoloških i reaktivnih produkata kao što su amiloid, lipofuscin, poliglukozanska tela, ubikvitin, metalotioneini, koji nastaju u mozgu starih pasa.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. MAKROSKOPSKE I PATOHISTOLOŠKE PROMENE U MOZGU

U procesu starenja kod pasa nastaju promene na tkivima i ćelijama, čije su funkcionalne posledice u većini slučajeva nejasne. Starosne promene nastale u centralnom nervnom sistemu pasa veoma su slične promenama u mozgu starih ljudi i ljudi obolelih od *Alzheimer*-ove bolesti. U mozgu starih pasa nastaju promene na parenhimu, meningama, horioidnim pleksusima i krvnim sudovima (*Borras et al., 1999., Dimakopoulos and Mayer, 2002.*). Makroskopski starosne promene se ispoljavaju kao smanjenje moždanih hemisfera, pri čemu dolazi do suženja vijuga i proširenja brazda, zadebljanja i kalcifikacije moždanica, proširenja lateralnih komora i drugo (*Reifinger, 1997., Borras et al., 1999., Dimakopoulos and Mayer, 2002.*). Pomenute promene nisu uvek u korelaciji sa razvijenim mikroskopskim promenama u mozgu starih pasa (*Reifinger, 1997., Dimakopoulos and Mayer, 2002.*).

Histološke promene manifestuju se u vidu: akumulacije amiloida, promene na neuronima i glija ćelijama, promene u beloju supstanci, deponovanje lipofuscina, poliglukozanska tela i druge. Neke od navedenih promena kod živih životinja mogu se uočiti magnetnom rezonancom mozga (*Su et al., 1998.*). Akumulacija beta amiloida započinje u zidu većih moždanih krvnih sudova i to u mišićnom sloju velikih arterija. Starenjem dolazi i do povećanja propustljivosti krvno-moždane barijere. Protok krvi kroz moždane krvne sudove u procesu starenja se smanjuje i uzrokuje dopremanje manje količine glukoze i kiseonika moždanom tkiva. Usled hipoksije i nedostatka hranljivih materija dolazi do oštećenja neurona i glija ćelija (*Dimakopoulos and Mayer, 2002.*).

Starosne promene u mozgu pasa razvijaju se spontano i sporo, a imaju neke zajedničke karakteristike sa promenama koje nastaju u humanoju populaciji (*Pirici et al., 2011.*). Kod ljudi obolelih od *Alzheimer*-ove bolesti najznačajnije patohistološke promene su gubitak nervnih sinapsi, formiranje neurofibrilarne klubadi i depozita amiloida (*Miller et al., 1993., Brellou et al., 2005.*). Neurofibrilarna klubad se ne detektuje isključivo u mozgu starih i dementnih ljudi, već se javljaju posle trauma i kod starih osoba sa Daunovim sindromom (*Uchida et al., 1991., Miyawaki et al., 2002.,*

Brellou et al., 2005.). U mozgu pasa neurofibrilarna klubad se veoma retko uočavaju (*Papaoannou et al 2001., Brellou et al., 2005.*).

Amiloid se nakuplja u zidu krvnih sudova i ekstracelularno u parenhimu u vidu senilnih plakova. Senilni plakovi i depoziti amiloida u zidu krvnih sudova su dokazani u mozgu različitih vrsta životinja, kao što su majmuni, psi, medvedi, mačke i kamile (*Selkoe et al., 1987., Kuroki et al.1997., Nakamura et al., 1997., Borrás et al. 1999., Nakayama et al., 2001., Papaoannou et al., 2001., Pirici et al., 2011.*). Amiloid u mozgu nastaje u fiziološkim i patološkim uslovima enzimskom obradom amiloid prekursor proteina.

2.2. AMILOID PREKURSOR PROTEIN

Amiloid prekursor protein (*amyloid precursor protein - APP, eng.*) je protein koji je identifikovan pre više od 25 godina (*Head et al., 2010*). Gen, koji kodira sintezu APP-a, kod ljudi je lociran na 21. hromozomu, a identifikovan je 1987. godine u nekoliko laboratorija, koje su obavljale istraživanja nezavisno jedne od drugih. Ustanovljene su i mutacije APP gena, koje mogu da prouzrokuju nastanak nasledne forme *Alzheimer*-ove bolesti. Uočeno je, da usled mutacija gena nastaje hereditarna cerebralna amiloidna angiopatija (*hereditary cerebral amyloid angiopathy, eng.*), praćena nakupljanjem amiloida u zidu moždanih krvnih sudova. Jedan oblik mutacije dovodi do zamene aminokiselina u okviru A β domena na APP proteinu. Pored zamena aminokiselina u polipeptidnom lancu može doći do pojedinačnih duplikacija APP gena što prouzrokuje nastanak *Alzheimer*-ove bolesti uz razvoj cerebralne amiloidne angiopatije. Kod osoba sa Daunovim sindromom nastaju slične promene u mozgu usled trizomije 21. hromozoma (*Thinakaran and Koo, 2008.*). Amiloid prekursor protein kod pasa pokazuje homologiju sa humanim u 98% (*Head et al., 2008., Pop et al.,2012.*). Gen za APP kod pasa je lokalizovan na 31. hromozomu. Pretpostavlja se da su procesi stvaranja A β kod ljudi i pasa slični (*Head et al., 2008.*).

Gen za APP kodira tip I transmembranskog proteina, čiji ekstracelularni domen znatno veći od intracelularnog. Utvrđeno je da APP sadrži u svom sastavu A β domen. A β domen APP čini deo polipeptidnog lanca koji se proteže delom u ekstracelularnom prostoru, a delom u membranskom dvosloju ćelijske membrane. Za sada nije uočeno za

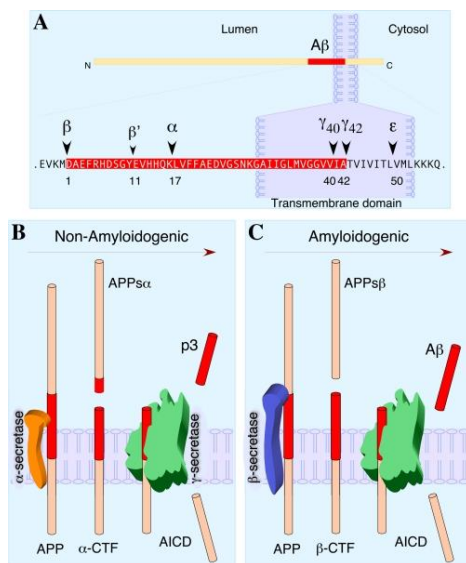
druge gene, koji su u vezi sa APP genom, da sadrže sekvencu A β domena (*Thinakaran and Koo, 2008.*).

Dokazano je, da se sinteza APP obavlja u endoplazminom retikulumu odakle se on u nascentnom obliku transportuje preko Goldžijevog aparata do plazma membrane. Tokom transporta nascentni oblik proteina podleže posttranslacionoj modifikaciji (N- i O-glikozilaciji, fosforilaciji i sulfaciji). U kulturi ćelija sa izraženom ekspresijom APP gena, zapaženo je da se samo 10% proteina nalazi na ćelijskoj membrani u nascentnom obliku. U stabilnom obliku APP se u ćeliji može naći u Goldžijevom aparatu i trans Goldži zoni. Sa površine APP se unosi u ćeliju endocitozom u okviru endozoma odakle se jedan deo „reciklira“ i vraća na površinu ćelije, a drugi deo podleže proteolitičkom razlaganju u lizozomima (*Thinakaran and Koo, 2008.*).

Amiloid prekursor protein je transmembranski glikoprotein, koji u zavisnosti od izoforme u svom lancu može sadržati i do 770 aminokiselina (*Matsui et al., 2007.*). Postoji više izoformi APP od kojih su najčešće proučavane APP695, APP714, APP751 i APP770. Označavanje izoformi APP je izvršeno na osnovu broja aminokiselina koje protein sadrži u primarnoj strukturi. Prisustvo izoforme APP695 je dokazano primarno u neuronima, dok su izoforme APP751 i APP770 dokazne u neuronima i glija ćelijama (*Matsui et al., 2007.*).

Amiloid prekursor protein se sastoji iz tri segmenta a to su: ekstracelularni, transmembranski i intracelularni segment. Veći deo molekula APP čini N-terminalni ekstracelularni segment (ektodomen), dok su transmembranski i intracelularni C-terminalni delovi znatno kraći (shema 1A). Amiloid prekursor protein normalno podleže amiloidogenom i neamiloidogenom procesu razgradnje u ćeliji. U fiziološkim uslovima u ćeliji se uglavnom odvija neamiloidogeni proces razgradnje (shema 1B), čak do 90% (*Pop et al., 2010.*). Dejstvom α -sekretaze aminokiselinski lanac APP se prekida posle 687. aminokiseline (*Pifer et al., 2011.*). U ovom procesu α -sekretaza odvaja deo ekstracelularnog domena APP-a, pri čemu je zahvaćen jedan segment polipeptidnog lanca koji pripada A β domenu. Ovako odvojeni deo proteina označava se APPs α , a utvrđeno je da ima neurotrofičku i neuroprotektivnu ulogu. Ostatak APP označen je kao α -CTF i njega čine transmembranski segment i intracelularni domen. α -CTF podleže proteolizi γ -sekretazom i nastaju p3 i AICD peptid (*APP intracellular domain - AICD,*

eng.). Peptid p3 biva oslobođen u ekstracelurani prostor, a AICD ostaje intracelularno (Pop *et al.*, 2010.).



Shema 1. **A-** shematski prikaz APP u membrani ćelije, **B-** shematski prikaz neamiloidogenog puta razlaganja APP, **C-** shematski prikaz amiloidogenog puta razlaganja APP (Thinakaran and Koo, 2008.).

Za nastanak Aβ monomera neophodno je dejstvo β- i γ- sekretaze i taj proces se označava kao amiloidogeni proces razgradnje APP (shema 1C). Beta sekretaza je transmembranska aspartil proteaza označena kao BACE1 enzim (*β-site APP-cleaving enzyme*, BACE, eng.). Visok nivo ekspresije BACE1 u neuronima primećen je u okviru procesa stvaranja amiloida u mozgu. Gama sekretazu čine četiri subjedinice označene: presinilin 1 ili 2, nikastrin, APH-1 (*anterior pharynx defective-1*, eng.), PEN-2 (*presenilin enhancer-2*, eng.).

Prvo β- sekretaza oslobađa N-terminus Aβ-domena, prekidajući ekstracelularni deo polipeptidnog lanca posle 671. aminokiseline (Pifer *et al.*, 2011.). Gama sekretaza kao nespecifični enzim može da prekine peptidni lanac APP u transmembranskom delu posle od 710. do 714. aminokiseline, stvarajući Aβ peptid različite dužine od 39 do 44 aminokiseline. Peptidni lanac APP γ-sekretaza prekida najčešće posle 711. i 713. (Pifer *et al.*, 2011.). Približno 90% nastalih Aβ peptida sadrže 40 aminokiselina, dok 10% i manje sadrže 42 aminokiselina. Prema nekim podacima postoje dokazi prisustva kompleksa γ-sekretaze i enzimske aktivnosti u različitim delovima ćelije uključujući endoplazmin retikulum, Goldžijev aparat, trans Goldžijevu zonu, endosome i plazma membranu. Dokazi iz brojnih istraživanja ukazuju da se proces stvaranja amiloida

odigrava i na mikrodomenima ćelijske membrane i mikrodomenima membrana pojedinih organela. Ti mikrodomeni su bogati sa holesterolom i sfingolipidima (*Thinakaran and Koo, 2008.*).

Transport APP kao i njegov put razgradnje zavisi od SORL 1 gena, tj. od proteina koji kodira ovaj gen, a naziva se SORL1 (SORLA, SORLA1 ili LR11). SORL-1 (*sortilin-related receptor, L (DLR class), A repeats-containing*, eng.) je protein, koji je veoma bitan za transport APP u domen dejstva α -sekretaze. Mutacija na SORL-1 genu dovodi do povećanog stvaranja $A\beta$, jer favorizuje amiloidogeni put razlaganja APP. Ova mutacija je uzrok za nastanak kasnog tipa Alchajmerove bolesti kod ljudi (*Pavlović et al., 2007.*).

U neuronima APP se transportuje anterogradno duž aksona i za to vreme se proteolitički obrađuje. Transport u aksonu posredovan je direktnim ili indirektnim vezivanjem APP-a za laki lanac kinezin 1 proteina. Pretpostavlja se da APP kada se nalazi u okviru transportne vezikule predstavlja receptor za koji se vezuje kinezin 1 protein (*Thinakaran and Koo, 2008.*).

Funkcije APP nisu u potpunosti jasne, iako su opisane brojne fiziološke uloge ovog proteina. Smatra se da ima ulogu trofičkog faktora, da deluje autokrino i parakrino u regulaciji rasta ćelije. Trofička uloga APP-a je najviše proučavana. Smatra se da APP utiče na rast nervnih izdanaka i da podstiče sinaptogenezu. Takođe, APP utiče i na diferencijaciju nervnih stem ćelija (*Thinakaran and Koo, 2008., Sarasa and Pesini, 2009.*). Pretpostavlja se da APP ima ulogu u adheziji ćelija. Prvobitno se smatralo da APP ima ulogu receptora pošto se nalazi na površini ćelije, mada za ovu tvrdnju ne postoje uverljivi dokazi (*Thinakaran and Koo, 2008.*).

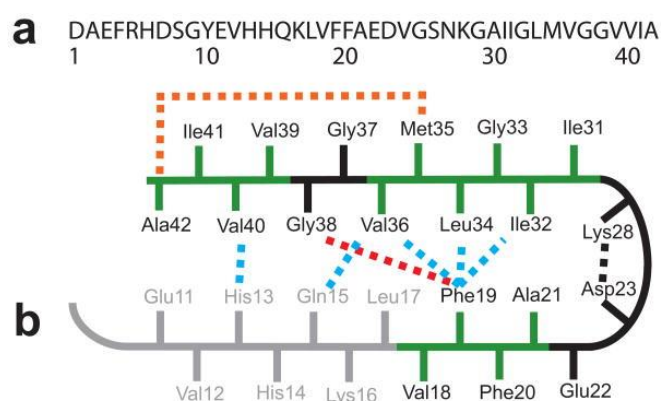
2.3. AMILOID

Amiloid predstavlja amorfni, eozinofilni proteinski materijal, koji može da se deponuje u različitim tkivima i organima. U tkivima i organima na histološkim preparatima se vidi u obliku plakova ili konfluentnih masa koje mogu progresivno da zamene parenhim zahvaćenog organa. Ranije su korišćene različite tehnike da bi se histološki vizuelizovao, uključujući bojenje kristal violetom (*crystal violet*, eng.) i kongo crveno (*Congo red*, eng.). Kasnije je otkriveno da amiloid obojen alkoholnim

rastvorom kongo crvenog daje žuto-zelenu fluorescenciju kada se posmatra pod polarizacionim svetlom. Postoji preko 25 vrsta amiloida, ali svi imaju jedinstvenu fibrilarnu strukturu koja je izgrađena prvenstveno od proteina. Primarnu fluorescenciju u kratkim UV zracima pokazuje samo starački amiloid (amiloid beta, A β). Posmatranjem pod elektronskim mikroskopom utvrđeno je da osnovu amiloida čine protofilamenti promera 1-1,5 nm. Protofilamenti se povezuju i grade filamente promera 2,5-3,5 nm. Filamenti (protofibrili) se međusobno povezuju i grade fibrile čiji promer se kreće 5-15 nm. Dužina fibrila može da dostigne nekoliko nanometara (*Inoue and Ksilevsky 1996., Knežević i Jovanović, 1999.*). Pored fibrilarnog proteina u izgradnji depozita amiloida učestvuju amiloidna pentagonalna P komponenta i glikozoaminoglikani. Amiloidna pentagonalna P komponenta pripada familiji proteina koji su dobili naziv pentraksini zbog svoje pentamerne kvarterne strukture (*Gewurtz et al., 1995.*).

Osnovu beta amiloida čini monomerni oblik polipeptidnog lanca. Ovi monomerni lanci mogu da se udružuju u dimere i oligomere koji ulaze u sastav protofilamenata. U svakom fibrilu pojedinačni A β lanci su postavljeni normalno u odnosu na osu fibrila. U monomernom lancu A β 1-40 prvih deset aminokiselina ne učestvuje u formiranju konformacije proteina i označavaju se terminom nestrukturne aminokiseline. Od 11. do 40. aminokiseline u lancu A β 1-40, aminokiseline učestvuju u formiranju „ β -zavoj- β “ strukture (shema 2.). Za formiranje „ β -zavoj- β “ strukture (*β -turn- β* , eng.) neophodne su molekulske veze, koje nastaju između histidina (13.aminokiselina u polipeptidnom lancu, His.3.- eng.) i valina (Val.40.), između glicina (Gly.15.) i valin (Val.36.) kao i između fenilalanina (Phe.19.) i izoleucina/leucina/valina (Ile.32./Leu.34./Val.36.). „Zavoj“ (krivinu) u „ β -zavoj- β “ strukturi monomera A β 1-40 i A β 1-42 prave i stabilizuju interakcije između aspartata (Asp.23) i lizina (Lys.28). Polipeptid A β 1-42 poseduje hidrofobne segmente koji su označeni kao beta domeni. Pojedinačni monomerni lanac A β 1-42 formira „ β -zavoj- β “ strukture kao i A β 1-40 s tom razlikom, što u formiranju ovog oblika učestvuju aminokiseline tek od 17. do 42. u polipeptidnom lancu. Formiranje ove strukture nastaje tako što se beta segmenti ovog lanca postavljaju jedan naspram drugog i to tako da se fenilalanin postavlja naspram glicina (shema 2.). Fenilalanin je 19. aminokiselina u lancu i pripada N-terminusu, a vezuje se sa glicinom koji je 38. aminokiselina u lancu i

pripada C-terminusu. Takođe, međusobno reaguju i povezuju se metionin 35. i alanin 42. aminokiselina u polipeptidnom lancu. Da bi nastao filament A β dva do tri protofilamenta se postavljaju paralelno svojim hidrofobnim segmentima i međusobno povezuju. To praktično znači da su u filamentu (protofibrilu) „ β -zavoj- β “ segmenti protofilamenata paralelno postavljeni jedni do drugih i povezani hidrofobnim vezama. Udruživanjem i povezivanjem hidrofobnih segmenata dva ili više filamenata (protofibrila) nastaje fibril. Hidrofobni C terminus se uvek nalazi zaštićen u centru fibrila. Stabilizaciju povezanih monomera pojačavaju vodonične veze koje se formiraju između hidrofobnih C terminusa. Razlika između fibrila A β 1-40 i A β 1-42 je u stvaranju beta nabrane konformacije, koju poseduje A β 1-42. U fibrilu A β 1-40 monomerni polipeptidni lanci se pakuju paralelno jedni do drugih i postavljeni su pod pravim uglom u odnosu na osu pružanja fibrila. Monomeri kod A β 1-42 postavljaju svoje hidrofobne segmente paralelno, ali dolazi do njihove torzije i povezivanja pod određenim uglom karakterističnim za beta nabranu konformaciju (Ahmed et al., 2010.).



Schema 2. **a-** sekvenca A β 1-42 koja potiče od humanog APP, **b-** raspored aminokiselina i njihova međusobna reakcija u A β 1-40 i A β 1-42. Plave isprekidane linije obeležavaju reakcije između aminokiselina u lancu A β 1-40, a crvena i narandžasta isprekidane linije reakcije između aminokiselina u lancu A β 1-42. Oba lanca poseduju stabilizacione hidrofobne veze (zeleno obojeni deo lanca) i most koji se formira u zavoju polipeptidnog lanca između aspartata (23.) i lizina (28.) (Ahmed et al., 2010.).

Amiloid β (A β) je peptid, koji nastaje proteolizom amiloid prekursor proteina (APP). Prethodno je napomenuto da beta amiloid nastaje od APP aktivnošću dve plazma membranske endoproteaze β - i γ - sekretaza. Beta sekretaza prvo odvaja jednu sekvencu sa APP i oslobađa aminotermius tako da nastaje derivat APPs β . Fragment od 99 aminokiselina ostaje vezan za plazma membranu, odakle γ -sekretaza brzo oslobađa A β peptid. Posle odvajanja A β peptida, on se zadržava u ćeliji ili biva izlučen iz ćelije u intersticijum u obliku monomera ili dimera. Pomenuti monomeri ili dimeri polimerizuju

u veće strukture, kao što su rastvorljivi A β oligomeri. U ovakvom obliku A β pasivno difunduje po moždanom tkivu odakle se fiziološki uklanja (*Hardy and Selkoe, 2002., Kumar-Singh, 2008., Pop et al., 2010.*).

Postoji nekoliko mehanizama u mozgu, koji omogućavaju uklanjanje A β . U uklanjanju A β značajan je proces fagocitoze koji obavljaju makrofagi i astroglia ćelije (*Wyss-Coray et al., 2003., Kumar-Singh, 2008.*). Proteoliza A β je drugi mehanizam uklanjanja A β , a obavlja se intracelularno, na površini ćelijske membrane ili intersticijalno (*Saido and Iwata, 2006.*). U proteolizi A β oligomera i fibrila učestvuju enzimi neprilizin, insulin degradirajući enzim, endotelin-konvertirajući enzimi 1 i 2 i matriks metaloproteinaze 2 i 9 (*Saido and Iwata, 2006., Kumar-Singh, 2008., Pop et al., 2010.*). Uklanjanje A β iz mozga obavlja se i odvođenjem putem krvnih sudova. Ono se odvija dvojako direktnim transportom A β kroz krvno-moždanu barijeru u krvne sudove ili drenažom A β iz intersticijuma u cerebrospinalnu tečnost, a iz nje u sistemske cirkulacije. Direktni transport A β kroz krvno-moždanu barijeru je posredovan lipoproteinom male gustine označenim LRP-1 (*lipoprotein receptor-related protein-1, eng.*) (*Shibata et al., 2000., Kumar-Singh, 2008.*). U fiziološkim uslovima kapacitet svih nabrojanih mehanizama za uklanjanje A β je veći od količine stvorenog amiloda (*Kumar-Singh, 2008.*).

Odvajanje A β monomera γ -sekretazom je relativno neselektivno, što rezultira nastajanjem nekoliko heterogenih monomera. Najčešći oblik je A β 1-40 (80-90%), lanac koji sadrži 40 aminokiselina, sledi hidrofobniji monomer A β 1-42 sa 42 aminokiseline u lancu (5-10%) (*Head et al., 2010.*). U fiziološkim uslovima amiloidogeni i neamiloidogeni procesi razgradnje se odvijaju u određenom balansu. Verovatno kada dođe do narušavanja ovog balansa dolazi i do akumulacije amiloida u mozgu pasa (*Pop et al., 2010.*).

Beta amiloid se uglavnom izlučuje u obliku monomera, ali se pretpostavlja da se konstantno izlučuje iz neurona i u obliku dimera. U intersticijumu centralnog nervnog sistema A β egzistira u obliku monomera, oligomera male molekulske mase (dimeri i trimeri), oligomera velike molekulske mase (molekulske mase 56 kDa i veće, sadrže i druge ligande), protofibrili (filamenti) i konačno zreli fibrili. Rastvorljivi monomeri i rano formirani agregati ne prelaze granicu detekcije imunohistohemijskom tehnikom.

Gusto pakovani agregati su slabo vidljivi, jer su im epitopi maskirani. Imunohistohemijski se detektuju robusni agregati fibrila koji mogu biti male ili velike gustine. Gusto pakovani fibrili su vidljivi različitim bojenjima kao što su tehnika impregnacije srebrom, bojenje kongo crveno ili tioflavin S metodom (*Kumar-Singh et al., 2000., Kumar-Singh, 2008.*).

Imunohistohemijska istraživanja su pokazala da su nakupine A β 1-42 u neuronima inicijalni depoziti ne samo kod pacijenata sa *Alzheimer*-ovim oboljenjem (*Gouras et al., 2000.*) već i kod transgenih miševa (*Wirhth et al., 2001., Van Broeck et al., 2008.*). Neki autori smatraju da su intracelularna i ekstracelularna akumulacija A β u ekvilibrijumu sa pomeranjem od intracelularnog ka ekstracelularnom kompartmentu pri progresiji bolesti (*Wirhth et al., 2004., LaFerla et al., 2007., Kumar-Singh, 2008.*).

Tokom života kod pasa dolazi do pada kapaciteta za degradaciju A β . Pretpostavlja se, da kod starijih pasa do akumulacije A β dolazi zbog: povećanja dostupnosti APP enzimskoj razgradnji, smanjenog kapaciteta za proteolitičku razgradnju A β oligomera i fibrila i promenjenog odnosa amiloidogenog i neamiloidgenog procesa u korist prvog (*Pop et al., 2010.*).

Pojedini autori su dokazali da se kod mlađih pasa nalazi visok nivo monomera A β i da praktično nema agregacije. Međutim, kod pasa srednje starosti, ustanovljeno je smanjenje nivoa monomera A β , a dolazi do intenzivnije agregacije beta amiloida. Kod starih pasa uočeno je da se nivo monomera A β drastično povećava kao i nagomilavanje amiloida (*Pop et al., 2010.*).

Beta amiloid (A β) se sreće u mozgu starijih jedinki sisara uključujući pse, medvede i primare. Upoređivanjem depozita amiloida u mozgu pasa, polarnih medveda i ljudi, došlo se do zaključka da je A β 1-42 prisutan u depozitima kod svih, a da je A β 1-40 prisutan samo kod ljudi i pasa. Takođe je, ustanovljeno da su A β 1-42 i A β 1-40 prisutni u depozitima u zidu krvnih sudova svih ispitivanih vrsta (*Tekirian et al., 1996.*).

U humanoj populaciji je dokazano prisustvo A β kod ljudi obolelih od *Alzheimer*-ove bolesti, ali i kod nedementnih starih osoba. On se nagomilava ekstracelularno u moždanom tkivu u vidu senilnih plakova i u zidu krvnih sudova. Senilni plakovi su prisutni kod ljudi sa *Alzheimer*-ovim oboljenjem u većoj meri nego kod starijih

nedementnih osoba. Depoziti A β se često sreću u zidu leptomeningealnih krvnih sudova, tj. u mišićnom sloju arterija i vena (Tekirian et al., 1996.).

Ekstracelularno nagomilani A β uočava se u vidu spletova vlakana, koja se pružaju kroz neuropil, a na pojedinim mestima su isprepletani sa aksonima koji poseduju mijelinski omotač. Na mestima obimnih nakupljanja A β vlakana, u slučaju oštećenja glijalne plazma membrane, A β vlakna se često pronalaze blisko udružena sa GFAP (*glial fibrillary acidic protein*, eng.) (Torp et al., 2000.).

Kod mlađih jedinki u cerebrospinalnoj tečnosti detektovana je veća količina A β 1-42 u odnosu na A β 1-40. Sa starenjem u cerebrospinalnoj tečnosti nivo A β 1-42 je u padu, dok A β 1-40 zadržava konstantan nivo. Smatra se, da je odnos A β 1-42/A β 1-40 u cerebrospinalnoj tečnosti dobar pokazatelj količine nagomilanog A β u mozgu (Head et al., 2010.). Pretpostavlja se, da oligomeri A β počinju postepeno da se akumuliraju kod pasa srednje starosti. Jednom započet proces akumulacije amiloida traje do kraja života (Pop et al., 2010.).

U ranim fazama razvoja *Alzheimer*-ove bolesti, A β depoziti mogu se pronaći u frontalnoj ili parijetalnoj kori. Dokazano je da se u prekliničkoj fazi *Alzheimer*-ove bolesti u prvo formiranim depozitima u mozgu nalazio samo A β 1-42. Koncentracija A β 1-42 se značajno povećava sa napredovanjem bolesti. Nasuprot A β 1-42, A β 1-40 je prisutan u nakupinama u kasnijim stadijumima bolesti, s tim što ponekad može biti i odsutan. Ovo govori da je on kasni i nespecifični marker za *Alzheimer*-ovu bolest (Delacourte et al., 2002.).

Precizni mehanizmi A β toksičnosti za neurone nisu u dovoljnoj meri objašnjeni. Veruje se, da toksična forma beta amiloida može da difunduje kroz moždano tkivo direktno oštećujući neurone (Walsh et al., 2002., Kaye et al., 2003., Head et al., 2010.). Brojna istraživanja su pokazala da je rastvorljiva nefibrilarna forma amiloida beta potentni sinaptotoksin (Walsh et al., 2002., Cleary et al., 2005., Klubin et al., 2008., Borlikova et al., 2012.). Postoje brojne hipoteze kojima se objašnjava toksičnost A β uključujući sposobnost A β da u reakciji sa oksido-reduktivno aktivnim metalima generiše stvaranje reaktivnih kiseonikovih grupa (*reactive oxygen species* - ROS, eng.), da utiče na agregaciju novih A β proteina i formiranje porama sličnih struktura u

membrani ili da reaguje sa membranskim receptorima i drugo (*Bush, 2003., Arispe, 2004., Demuro et al., 2005., Ciccotosto et al., 2011.*). Potencijalni receptori na plazma membrani neurona i glija ćelija, sa kojima bi A β mogao da reaguje, su α -7 nikotin acetilholin receptor, APP, N-metil-D-aspartat receptor, P75 neurotrofni receptor i receptor za lipoproteine male gustine (*low-density lipoprotein receptor*, eng.) (*Cappai and Barnham, 2007., Ciccotosto et al., 2011.*).

Rezultati brojnih istraživanja ukazuju da A β može da ošteti mitohondrije i izazove ćelijsku smrt epitelnih ćelija horioidnog pleksusa (*Casley et al., 2002., Vargas et al., 2010.*). Na osnovu ovih istraživanja postavljena je hipoteza o načinu na koji A β indukuje ćelijsku smrt epitelnih ćelija horioidnog pleksusa: A β akumulacija utiče na povećanu produkciju NO, koja vrši inhibiciju mitohondrijalnih kompleksa od I do IV što utiče na povećanu produkciju reaktivnih kiseonikovih grupa, zbog kojih dolazi do izražene ekspresije matriks metaloproteinaza i kaspaza što konačno uzrokuje ćelijsku smrt (*Vargas et al., 2010.*).

Pretpostavlja se, da potencijalna A β toksičnost leži u činjenici da A β ima sposobnost da menja funkcije lipidne membrane. Reakcija između A β proteina i lipida ćelijske membrane može generalno da utiče na fizičko-hemijska svojstva i funkcije ćelijske membrane (*Pifer et al., 2011.*). Smatra se da je A β toksičnost u korelaciji sa povećanim afinitetom A β prema plazma membrani (*Ciccotosto et al., 2004., Smith et al., 2006., Ciccotosto et al., 2011.*). Potencijalni molekuli u plazma membrani za vezivanje A β su lipidi, proteoglikani i proteini (*Verdier and Penke, 2004.*).

U izgradnji plazma membrane učestvuju različiti lipidi, koji joj daju heterogeni i asimetrični izled. Upravo ovakva građa je esencijalna za odvijanje normalnih ćelijskih procesa. Spoljašnja površina plazma membrane je bogata fosfatidilholinom i sfingomijelinom, lipidima koji sadrže holin. Unutršanja površina plazma membrane je bogata lipidima, koji sadrže amine, kao što su fosfatidiletanolamin i fosfatidilserin (*Pomorski et al., 2004., Ciccotosto et al., 2011.*). Dokazano je da premeštanje fosfatidilserina na spoljašnju stranu membrane predstavlja marker za identifikaciju apoptotičnih ćelija. Takođe, utvrđeno je kod specifične populacije neurona da je povećano premeštanje fosfatidilserina na spoljašnju stranu plazma membrane u korelaciji sa povećanjem količine A β vezanog za ovu strukturu (*Simakova and Arispe,*

2007., *Ciccotosto et al., 2011.*). Ustanovljeno je da pri nakupljanju A β u mozgu dolazi do značajnog povećanja količine aneksin V peptida (*annexin V peptid*, eng.), koji je kalcijum zavisni fosfolipid vezujući protein, sa ulogom u prebacivanju fosfatidilserina sa unutrašnje na spoljašnju površinu plazma membrane (*White et al., 2001., Ciccotosto et al., 2011.*).

Smatra se da lipidni dvosloj indukuje agregaciju i fibrilogenezu tako što stvara pogodne uslove za promenu konformacije proteina sa posledičnim stvaranjem protofibrilarnih i fibrilarnih struktura (*Thirumalai et al., 2003., Sparr et al., 2004., Stefani, 2004., Zhao et al., 2004., Pifer et al., 2011.*). Ćelijska membrana je mesto gde se formiraju peptidi amiloida što može za posledicu imati ćelijsku smrt. To se verovatno dešava zato što formirani amiloid povećava propustljivost membrane usled promene u arhitekturi lipidnog dvosloja (*Michikawa et al., 2001., Lins et al., 2002., Sparr et al., 2004., Valincius et al., 2008., Pifer et al., 2011.*) ili može da formira neke strukture koje su slične porama (*Jang et al., 2007., Pifer et al., 2011.*).

In vitro je dokazano da su oligomeri A β 1-42 toksičniji od, protofibrila i zrelih fibrila. Istraživanja na kulturi ćelija kortikalnih neurona miševa (*Ahmed et al., 2010.*), ukazuju da se stvaranje toksičnih oligomera obavlja brže i lakše od A β 1-42 nego od A β 1-40 peptida, što sugeriše da za njihovo pojavljivanje od presudnog značaja C-terminus (*Soreghan et al. 1994., Bitan et al., 2003., Head et al. 2010.*). Nasuprot ovim nalazima, u drugim istraživanjima došlo se do zaključka da je C-terminus A β 1-42 bitan za formiranje njihove beta nabrane strukture i povezivanje više oligomera, pri čemu nastaju protofibrili i zreli fibrili, a samim tim i smanjivanje neurotoksičnosti (*Ahmed et al., 2010.*).

Dimeri A β izolovani iz mozga i cerebrospinalne tečnosti obolelih od *Alzheimer*-ove bolesti izazivaju oštećenje sinapsi (*Klubin et al., 2008., Shankar et al., 2008., Head et al., 2010.*). Istraživanja koja su sprovedena na juvenilnim pacovima sugerišu da dodekameri A β 1-42 mogu uticati na pogoršanje pamćenja. Ovi dodekameri su poticali iz transgenih miševa sa izraženom ekspresijom APP, a aplikovani su intracerebralno mladim pacovima (*Lesne et al., 2006., Ahmed et al., 2010.*).

Prisustvo A β 1-42 u kulturi ćelija neurona PS1 transgenih miševa je dokazano imunofluorescencijom uz upotrebu konfokalnog mikroskopa, kao i imunohistohemijskom tehnikom. Smatra se, da A β prvo nastaje intracelularno u endoplazminom retikulumu i u Goldžijevom aparatu, a posle dolazi do njegovog nakupljanja ekstracelularno. Po ovoj teoriji kod *Alzheimer*-ove bolesti prvo dolazi do intracelularnog stvaranja A β pa tek do formiranja senilnih plakova i neurofibrilarne klubadi (*Gouras et al. 2000.*).

U neuronima pacijenata sa *Alzheimer*-ovim oboljenjem, gde su dokazane nakupine A β 1-42, nije dokazano prisustvo A β 1-40 iako on nastaje u većem procentu od A β 1-42 aktivnošću γ -sekretaze. Uočeno je, da se nagomilani intracelularni A β nalazio u različitim regijama mozga kao i ekstracelularno akumulirani A β u vidu senilnih plakova. Ove promene su uočene u pojedinim regijama hipokampusa i entorinalnog korteksa. Intracelularno nakupljanje je dokazano u neuronima u hipokampusu (*Gouras et al. 2000.*).

Uprkos značajnom progresu u razumevanju razvoja depozita amiloida u mozgu starih pasa još uvek se ne zna kakva je veza između količine akumuliranog A β u mozgu i količine rastvorljivih oligomera u mozgu i cerebrospinalnoj tečnosti i njihovoj vezi sa procesom starenja (*Head et al., 2010.*).

Iz mozga starih pasa je ekstrahovana veća količina A β 1-42 i A β 1-40 nego kod mladih pasa, a paralelno su imunohistohemijski dokazane masivne nakupine A β . Nasuprot promenama u količini A β peptida u mozgu, u cerebrospinalnoj tečnosti količina A β 1-42 se smanjuje sa godinama, a količina A β 1-40 zadržava konstantan nivo. Smanjenje količine A β 1-42 u cerebrospinalnoj tečnosti je skladu sa konceptom „efekta perifernog nakupljanja”, po kome se A β 1-42 nakuplja u mozgu pri čemu se smanjuje njegova količina u cerebrospinalnoj tečnosti (*DeMattos et al., 2001., Head et al. 2010.*).

Smatralo se da povećanje ukupnog APP dovodi do povećanog nakupljanja A β . Međutim, dobijeni rezultati u nekim ispitivanjima, ukazuju da se sa starošću pasa ukupna količina APP smanjuje u svim ispitivanim regionima mozga (prefrontalni, parijetalni, okcipitalni korteks i hipokampus) (*Pop et al., 2010.*).

Kod pasa u procesu starenja β -amiloid se nakuplja u većoj meri u mnogim kortikalnim regijama mozga. Nalazi depozita $A\beta$ u mozgu starih pasa slični su sa nalazima depozita $A\beta$ u mozgu ljudi. Pretpostavlja se da distribucija neurofibrilarne klubadi i depozita amiloida u ljudskom mozgu, nije nasumična, već je njihovo nastajanje karakteristika određenih delova i slojeva (*Satou et al. 1997.*). U mozgu starih pasa spontano se nakuplja $A\beta$ identičan humanom, pri čemu dovodi do slabljenja kognitivnih funkcija. Za razliku od primata, kod kojih je potrebno nekoliko decenija, kod pasa se amiloid nagomilava za kraće vreme. Nagomilavanje u mozgu $A\beta$ u obliku difuznih plakova povezan je sa ozbiljnim pogoršanjem u učenju i pamćenju starih pasa (*Head et al., 2010.*). Ova paralela je u skladu sa idejom da se psi mogu iskoristiti kao model pored transgenih miševa za proučavanje nagomilavanja amiloida u mozgu, kao i potencijalni dobar animalni model za razvoj teraupetskih sredstava (*Head et al., 2010.*).

2.4. VRSTE DEPOZITA AMILOIDA U MOZGU

Depoziti amiloida u mozgu pasa se javljaju ekstracelularno u obliku senilnih plakova i nakupina u zidu krvnih sudova. Intracelularni depoziti u mozgu pasa se veoma retko sreću. Glavnu komponentu senilnih plakova i depozita u zidu krvnih sudova čini beta amiloid. Beta amiloid je izgrađen od polipeptida koji mogu imati u svom sastavu od 39 do 44 aminokiseline. Proteini u ovim depozitima uglavnom imaju beta nabranu strukturu (*Roher et al., 1993., Selkoe et al., 1994., Weigel et al., 1995., Head and Torp 2002., Brellou et al. 2005.*). U mozgu starih i dementnih ljudi se sreću plakovi izgrađeni od dva glavna subtipa beta amiloida $A\beta$ 1-40 i $A\beta$ 1-42/43 (*Selkoe et al. 1987., Tamaoka et al., 1994., Mann et al., 1995., Brellou et al., 2005.*). U mozgu starih pasa plakovi su izgrađeni uglavnom od $A\beta$ 1-42/43 sa prisustvom u manjem procentu $A\beta$ 1-40 (*Wisniewski et al., 1996., Brellou et al. 2005.*). Nakupine amiloida u zidu krvnih cerebralnih sudova kod ljudi, mačaka i pasa sadrže $A\beta$ 1-40 i $A\beta$ 1-42 (*Nakamura et al., 1997., Rofina et al., 2003., Brellou et al., 2005.*). Depoziti amiloida, koji se sreću kod različitih vrsta, mogu se javiti u cerebralnom korteksu frontalne, parijetalne, okcipitalne ili temporalne regije.

2.4.1. Amiloidni (senilni) plakovi

Senilni plakovi su promene u mozgu koje nastaju usled ekstracelularnog nakupljanja amiloida. Iako je prisustvo senilnih plakova potvrđeno u mozgu čoveka, primata, mačaka i pasa i kod mnogih drugih eksperimentalnih modela, nije u potpunosti razjašnjeno kako ih A β vlakna formiraju (Torpe et al., 2000.). Pretpostavlja se, da formiranje senilnih plakova započinje nastajanjem prvo više sitnijih depozita A β , koji kasnije postepeno fuzionišu u veće kompaktnije mase (Tekirian et al., 1996.).

Postoji više podela senilnih plakova prema njihovim morfološkim karakteristikama. Jednu od prvih klasifikacija A β depozita u mozgu pasa napravili su Satou i sar. prema kojoj postoje četiri tipa amiloidnih senilnih plakova. Prvi tip depozita dokazan je u nekoliko slučajeva, a karakteriše ga taloženje A β u dubokim slojevima frontalnog korteksa (V i VI sloj sive supstance). Ovi depoziti su okrugle površine, male gustine i dijametra (do 180 μ m), difuzno rasuti i nejasno ograničeni. Drugi tip depozita je primarno lociran u V i VI sloju kore, ali je u nekim slučajevima zabeleženo njegovo pružanje i kroz slojeve III i IV pa čak i do drugog sloja. Ovi depoziti su difuznog oblika, nejasnih granica, sa tendencijom da se fuzionišu, a zajedno su zahvatali moždano tkivo i u dužini nekoliko milimetara. Treći tip depozita se sastojao od gustih okruglih A β pozitivnih plakova, koji su prema morfološkom izgledu slični senilnim plakovima kod ljudi, prosečnog dijametra 120 μ m, u nekim slučajevima i 200 μ m. Bili su locirani od prvog do trećeg sloja frontalne kore. Treći tip depozita je bio praćen taloženjem amiloida i u dubljim slojevima, tj. kao i kod drugog tipa depozita A β . Četvrti tip depozita A β se protezao kroz sve slojeve kore, a retko je bio ograničen na slojeve kore od I do III, a sastavljen je od jako gustih, okruglih A β pozitivnih plakova. Ovaj tip depozita se ređe sretao od trećeg tipa i nisu praćeni prisustvom difuznih depozita „sličnih oblacima“, kao kod trećeg tipa depozita (Satou et al., 1997.). U prethodnom istraživanju skoro 10% pasa iz grupe starih pasa (10-15 godina) bilo je A β negativno. U ovoj grupi najčešće su detektovani depoziti tipa I i II. U grupi veoma starih pasa (psi stariji od 15 godina) u 89,5% slučajeva dokazani su depoziti i to su bili tip II, III ili IV. Iz prethodno navedenih rezultata istraživači su zaključili da su depoziti tipa I i II, koji se javljaju kod pasa starosti 10-15 godina, promene koje prethode nastajanju depozita III i IV kod pasa starijih od 15 godina (Satou et al. 1997.).

Pored podele senilnih plakova na četiri grupe prema *Satou i sar., Tekirian i sar.* su senilne plakove podelili na dve osnovne grupe, a to su difuzni i neuritik tip plakova. Neuritik tip plakovi se dele u dve subklase: zreli i nezreli plakovi. Nezreli plakovi su sferičnog oblika i sadrže A β vlakna isprepletana sa edematozni neuronima i njihovim nastavcima. Zrele plakove karakteriše gusto jezgro okruženo sa distrofičnim neuronima i reaktivnim astrocitima. Difuzni plakovi su amorfne strukture i nisu udružene sa edematoznim neuronima ili glijalnom komponentom. Smatra se, da se kod pasa javlja samo difuzni tip senilnih plakova (*Tekirian et al., 1996.*).

Takođe, postoji podela senilnih plakova na tri tipa, a slična je prethodno navedenoj podeli. Ona je izvršena na osnovu morfološkog izgleda, zastupljenosti vlakana u plaku i njihovoj povezanošću sa degenerativnim i reaktivnim elementima (distrofični neuroni, astrociti i mikroglia). Prema ovoj podeli postoji: difuzni, primitivni i neuritik tip plakova (*Dimacopoulos and Mayer., 2002., Brellou et al., 2005.*). Difuzni plakovi su prvi ekstracelularni depoziti uočeni kod pacijenata sa *Alzheimer*-ovim oboljenjem i Daunovim sindromom (*Gowing et al., 1994., Iwatsubo et al., 1994., Kumar-Singh, 2008.*). Difuzni plakovi su u obliku „oblaka“ smeštenih perineuralno u subprijalnim slojevima mozga. Izgrađeni su uglavnom od rastresito raspoređenih vlakana A β 1-42 koji su tioflavin S i kongo crveno negativni. Ovaj oblik plakova se može dokazati imunohistohemijski. Primitivni plakovi sadrže akumuliran β amiloid, koji je tioflavin S i kongo crveno pozitivan. Plakovi nemaju slojevitou građu, a vlakna su u njima gusto upletena. U plaku se mogu zapaziti pojedini distrofični neuroni i reaktivne glija ćelije. Primitivni plakovi su najčešći tip plakova koji se sreće kod transgenih miševa (*Dimacopoulos and Mayer, 2002., Brellou et al., 2005., Kumar-Singh, 2008.*). Neuritik tip plakovi se nazivaju „senilni“, „klasični“ ili „zreli“ plakovi. „Klasični“ plakovi su slojevite građe, a sastoje se od gustog jezgra i perifernog sloja. Periferni sloj je slične građe kao difuzni plak sadrži uglavnom vlakna A β 1-42 koja su tioflavin S i kongo crveno negativna. Jezgro je tioflavin S i kongo crveno pozitivno i sadrži u većoj meri fibrile izgrađene od A β 1-40 nego od A β 1-42. U okviru plaka nalazi se dosta distrofičnih neurona i reaktivnih glija ćelija (*Dimacopoulos and Mayer, 2002., Brellou et al., 2005., Kumar-Singh, 2008.*).

Smatra se, da se od difuznih plakova kroz proces „sazrevanja“ formiraju gušći („zrelijim“) plakovi, prvo primitivni i na kraju neuritik tip, koji predstavljaju siguran znak *Alzheimer*-ove bolesti ljudi. U „zrelijim“ plakovima se sreće A β 1-40 za razliku od difuznih koji sadrže samo A β 1-42 (*Kumar-Singh et al., 2000., Kumar-Singh, 2008.*).

Opsežna imunohistohemijska istraživanja ukazuju da se u moždanom tkivu pasa najčešće sreće difuzni tip plakova. Postoji dilema da li se pored difuznih plakova u mozgu starih pasa mogu javiti zreli plakovi (primitivnih i neuritik tip), s obzirom da su ih neke studije neosporno dokazale, mada retko. U ovim istraživanjima plakovi su bojeni kongo crvenim i bili su pozitivni. Uprkos ovim nalazima, smatra se da su plakovi kod pasa uglavnom difuznog tipa (*Dimacopoulos and Mayer, 2002.*).

Plakovi pronađeni u mozgu starih pasa, kao i u mozgu ljudi, nisu istog tipa u svim delovima moždanog tkiva. Različiti delovi moždanog tkiva predstavljaju predilekciona mesta za formiranje specifičnih plakova i njihovu neravnomernu distribuciju u kvantitativnom smislu. Najčešće mesto nakupljanja amiloida je frontalna kora zatim sledi parijetalna, entorinalna i na kraju okcipitalna kora. Promene u ovim delovima mozga utiču na smanjenu kognitivnu sposobnost (*Dimacopoulos and Mayer, 2002.*).

U pogledu hemijskog sastava difuzne plakove obrazuju različiti proteinski molekuli. Međutim, odavno je poznato, da je A β glavni konstituent difuznih plakova. Zbog teškoća u praćenju procesa formiranja plakova, ne zna se šta je uzrok taloženja A β . S obzirom da je primećeno, da se plakovi formiraju tako što se iz centralnog dela radijalno šire ka periferiji, to je dalo prve indicije da su neuroni izvor A β za stvaranje plakova. Danas se sa sigurnošću zna da se A β stvara u neuronima i oslobođen iz njih u interneuronski prostor. Neka istraživanja ukazuju da je transport A β veoma kompleksan i da neuroni ne samo što stvaraju A β , nego ga transportuju do aksona gde ga luče u sinaptički pukotinu. Takođe, intraneuronska akumulacija A β dokazana je imunohistohemijskom tehnikom na apikalnim i bazalnim delovima dendrita. Utvrđeno je da su molekuli A β , koji su detektovani u plakovima, različite dužine i da potiču od amiloid prekursor proteina. Najčešće prisutna forma u difuznim plakovima je A β 1-42, dok u zrelijim plakovima postoje indicije da se nalazi i forma A β 1-40. Još uvek nije jasno da li odnos A β 1-42/A β 1-40 u plaku može biti odlučujući faktor progresije

difuznog u neuritik tip plaka kao i potencijalno veće neurotoksičnosti (*Dimacopoulos and Mayer, 2002.*).

U parenhimu mozgu starih majmuna i medveda mogu nastati difuzni i zreli plakovi, dok se kod mačaka i kamila formiraju samo difuzni (*Nakayama et al., 2001., Capucchio et al., 2010.*). Takođe, pojedini autori su ustanovili prisustvo difuznih plakova u moždanom tkivu starih konja (*Capucchio et al., 2010.*).

2.4.2. Cerebralna amiloidna angiopatija

Cerebralna amiloidna angiopatija (*cerebral amyloid angiopathy - CAA, eng.*) je termin koji opisuje depozite amiloida u zidu arterija i arteriola, a ređe kapilara i vena u centralnom nervnom sistemu. Utvrđeno je, da CAA predstavlja rani i integralni deo patogeneze *Alzheimer*-ove bolesti kao i konstantnu promenu na krvnim sudovima u procesu starenja ljudi. Takođe, kod životinja tokom starenja dolazi do stvaranja nakupina amiloida u zidu krvnih sudova (*Walker, 1997., Borrás et al., 1999., Capucchio et al. 2010.*).

Poznato je da više od 10 različitih vrsta amiloid proteina/peptida koji mogu da se deponuju u zidu cerebralnih krvnih sudova i parenhimu mozga (*Revesz et al., 2002., Hardy and Cullen, 2006., Kumar-Singh, 2008.*). Nastanak CAA najčešće je uzrokovano depozitima A β i sreće se normalno u procesu starenja, kod pacijenata sa familijarnom CAA i kod skoro svih pacijenata sa *Alzheimer*-om (*Vinters et al., 1996., Revesz et al., 2002., Kumar-Singh, 2008.*). Utvrđeno je, da su depoziti A β u zidu cerebralnih krvnih sudova štetni kako za strukturu tako i za funkciju krvnih sudova. Takođe, smatra se da je mehanizam nastanka CAA povezan sa nakupljanjem amiloida u mozgu i mehanizmima koji dovode do demencije. Pored toga, što CAA predstavlja neophodan faktor koji dovodi do demencije, on je i faktor rizika za nastanak moždanog udara (*Kumar-Singh, 2008.*).

Opšte je prihvaćeno da A β akumuliran u zidu cerebralnih krvnih sudova ima toksično dejstvo za vaskularne elemente. Endotelne ćelije moždanih krvnih sudova sa nakupljenim amiloidom podležu degeneraciji kao i periciti (*Farkas and Luten, 2001., Kumar-Singh et al. 2002.*).

Prisustvo amiloida u zidu krvnih sudova u mozgu pacijenta sa demencijom zahvaljujući njegovoj kongofilnosti opisao je *Scholtz* 1938.godine (*Vinters et al., 1996., Revesz et al., 2002., Kumar-Singh, 2008.*). Iako je početkom dvadesetog veka ispitivana pojava amiloidoze visceralnih organa animalnih eksperimentalnih modela, prve opise cerebralne amiloidne angiopatije kod starih pasa, dao je *Braunmühl* tek sredinom 20. veka (*Walker, 1997.*). Od animalnih modela za ispitivanje CAA, korišćeni su transgeni miševi, psi, neke vrste majmuna i druge (*Walker, 1997., Elfenbein et al., 2007.*). Utvrđeno je kao i kod ljudi, da je CAA kod pasa u pozitivnoj korelaciji sa učestalošću krvarenja u mozgu (*Uchida et al., 1991., Walker, 1997.*).

Dokazano je, da kod starih ljudi i ljudi sa *Alzheimer*-ovim oboljenjem dolazi do nakupljanja A β u leptomeningealnim i kortikalnim arterijama, arteriolama i kapilarima. Depoziti A β se češće sreću u krvnim sudovima sive mase velikog i malog mozga u odnosu na krvne sudove u beloj supstanci. Ove promene se javljaju najčešće u nekoliko kortikalnih regija kao što su frontalna, okcipitalna i parijetalna kora (*Vinters et al., 1996., Revesz et al., 2002., Kumar-Singh, 2008.*). Histološki se razlikuju tri oblika cerebralne angiopatije blagi, umereni i teški oblik. Kod blagog oblika A β depoziti su ograničeni u pojedinim delovima mišićnog sloja normalnih krvnih sudova. Pri razvoju umerenog oblika cerebralne angiopatije depoziti zahvataju ceo mišićni sloj krvnih sudova, čija je arhitektura u potpunosti izmenjena. Najteži oblik CAA se karakteriše time da depoziti A β zahvataju sve delove zida krvnog suda čime je arhitektura zida krvnog suda narušena. Usled promene u strukturi zida javljaju se sekundarne promene na krvnim sudovima kao što su mikroangiopatije, mikroaneurizme i nekroza (*Vinters et al., 1996., Revesz et al., 2002., Kumar-Singh, 2008.*).

Postoje tri hipoteze nastanka cerebralne amiloidne angiopatije, a to su: „sistemska“, „vaskularna hipoteza“ i „hipoteza drenaže“. „Sistemska hipoteza“ se bazira na činjenici da većina ćelija potencijalno može da stvori A β , jer u njima može da dođe do ekspresije APP gena. Po ovoj hipotezi se smatra da A β potiče iz sistemske cirkulacije. Postoje brojni dokazi koji opovrgavaju „sistemsku hipotezu“ (*Kumar-Singh, 2008.*). Prema „vaskularnoj hipotezi“ smatra se da A β potiče iz ćelija krvnih sudova mozga pošto kod njih dolazi do ekspresije APP gena. Ekspresija APP gena kod ljudi je dokazana kod različitih tipova ćelija, koje učestvuju u izgradnji zida krvnog suda ili

koje se nalaze oko krvnih sudova. Endotelne ćelije, glatkomišićne ćelije zida krvnog suda i periciti su ćelije kod kojih dolazi do ekspresije APP gena (*Natte et al., 1999., Kumar-Singh, 2008.*). Glavni argument koji opovrgava ovu hipotezu je činjenica da su velike arterije slabije zahvaćene cerebralnom amiloid angiopatijom od manjih arterija ili kapilara. „Hipoteza drenaze“ sugerira da se stvoreni A β drenira u perivaskularni prostor, a da do akumulacije dolazi usled nefunkcionisanja mehanizama za dalje uklanjanje A β (*Kumar-Singh, 2008.*).

2.5. ALZHEIMER-OVA BOLEST

Prve opise depozita označene kao „milijarne nekroze“, a kasnije kao senilni plakovi, dali su *Blocq i Marinesco* (1892. godine) i *Emil Redlich* (1898. godine) kod pacijenata sa epilepsijom i sa senilnom demencijom. *Emil Redlich* je smatrao da plakovi potiču iz glija ćelija zbog njihovog bliskog kontakta sa astrocitima. Kliničkim praćenjem i patohistološkom analizom *Alois Alzheimer* je opisao jedinstvenu kliničko-patološku sliku, koja je nedugo posle toga nazvana *Alzheimer-ova bolest*. On je 1907. pored plakova opisao i neurofibrilarnu klubad i povezao ih sa demencijom (*Gouras et al. 2005.*).

Alzheimer-ova bolest (*Alzheimer's disease - AD, senile dementia Alzheimer's type, SDAT, eng.*) je najrasprostranjenija neurodegenerativna bolest. Postoje dva oblika ove bolesti: familijarna rana AD (*familial early-onset Alzheimer's disease - FAD, eng.*) i sporadična kasna AD (*sporadic late onset Alzheimer's disease - SAD, eng.*). Oblik bolesti koji se često pojavljuje kod ljudi starijih od 65 godina je SAD, dok FAD predstavlja genetski naslednu dominantno autozomno oboljenje sa mutacijama na genima, koji kodiraju APP, PSEN1 (*presenilin1, eng.*) ili PSEN2 (*presenilin2, eng.*) (*Haass and De Strooper, 1999., Mauer and Hoyer, 2006., Dorfman et al., 2010.*). Klinički, AD se manifestuje progresivnim gubitkom pamćenja i kognitivnih funkcija (*Vargas et al., 2010.*). Demencija je posledica nagomilavanja patološkog proteina u neuronima neokorteksa i hipokampusa. Neokorteks i hipokampus su delovi mozga koji kontrolišu pamćenje. Kada dođe do smrti neurona u pomenutim regijama osobe gube kapacitet pamćenja i sposobnost da odgovore na svakodnevne zadatke. *Alzheimer-ova bolest* je veoma raširena bolest u svetu sa širokim spektrom simptoma i nekoliko patomorfoloških promena. Različite patomorfološke promene u mozgu ovih pacijenata

su povezane jedne sa drugim. Bolest karakteriše kortikalna atrofija sa posledičnim masivnim gubitkom neurona (*Du et al., 2005., Ezkiel et al., 2004., Rofina et al., 2006., Selkoe, 2001., Marco and Skaper 2006., Vargas et al., 2010.*), abnormalnom akumulacijom beta amiloida (*Cummings et al., 1996b, Cummings et al., 1996d, Selkoe, 2001., Rofina et al., 2006., Marco and Skaper 2006., Ciccotosto et al., 2011.*), akumulacija produkata nastalih pri oksidativnom stresu (*Butterfield et al., 2001., Rofina et al., 2006.*) i intracelularno prisustvo neurofibrilarne klubadi (*Tiraboshi et al., 2004., Rofina et al., 2006., Marco and Skaper, 2006., Vargas et al., 2010.*).

Kod ljudi obolelih od *Alzheimer*-ove bolesti u mozgu dolazi do ekstracelularnog nagomilavanja beta amiloida u vidu senilnih plakova i cerebralne angiopatije. Senilni plakovi u mozgu pacijenata sa SDAT se razvijaju u segmentima koji su odgovorni za memoriju i kogniciju (*Pifer et al., 2011.*). Glavna komponenta senilnih plakova i cerebrovaskularnih depozita su beta amiloidi, polipeptidi sa različitim brojem aminokiselina (39-43) u svom sastavu, a nastali su proteolizom APP. Rastvorljiva forma cirkulišućeg beta amiloida je A β 1-40, dok je A β 1-42 nerastvorljiva forma podložnija formiranju fibrilarnih formacija i predstavlja glavni konstituent senilnih plakova (*Marco and Skaper, 2006.*). Plakovi ne sadrže samo A β , već i druge proteine, kao što su apoE, apoJ i još neke druge inflamatorne molekule, a koji su u bliskom kontaktu sa distrofičnim dendritima i aksonima, aktiviranim mikroglija ćelijama i reaktivnim astrocitima (*Pifer et al., 2011.*). Paralelno sa formiranjem senilnih plakova dolazi do nakupljanja depozita amiloida u zidu cerebralnih krvnih sudova, koji značajno učestvuju u patogenezi AD (*Rodriguez et al., 2000., Marco and Skaper, 2006.*). Akumuliran u zidu krvnih sudova, A β oštećuje krvno-moždanu barijeru (*Kalaria, 1999., Miyakawa et al., 2000., Deane and Zlokovic, 2007., Vargas et al., 2010.*) i uzrokuje smrt endotelnih ćelija tzv. „smrt sličnu apoptozi“ (*apoptosis-like death, eng.*) (*Blanc et al., 1997., Xu et al., 2001., Yin et al., 2002., Vargas et al., 2010.*). Iako veliki broj dokaza iz istraživanja sugeriraju da toksični efekat A β podrazumeva aktivaciju mehanizama apoptoze (*Loo et al., 1993., Estus et al., 1997., Yao et al., 2005., Yin et al., 2006.*), ipak specifični signalni putevi kojima A β dovodi do smrti ćelije nisu kompletno razjašnjeni (*Vargas et al., 2010.*).

Dokazno je, da A β 1-42 u kulturi cerebralnih endotelnih ćelija utiče na proteine koji učestvuju u formiranju „čvrstih veza“ (*tight junction*, eng.) između endotelnih ćelija u moždanim krvnim sudovima. U integralne proteine „čvrstih veza“ ubrajaju se klaudin 1 (*claudin 1*, eng.), klaudin 2 (*claudin 2*, eng.) i okludin (*occludin*, eng.), dok su „pomoćni proteini“ ZO-1 i ZO-2 (*zonula occludens proteins* - ZO, eng.) pripadnici grupe proteina nazvanih kao guanilil kinaza (*membrane associated guanylate kinase* - MAGUK, eng.). Uglavnom, A β 1-42 utiče na smanjenu ekspresiju ovih proteina posle aplikacije u kulturu ćelija (*Marco and Skaper, 2006.*).

Pored akumulacije A β u parenhimu i zidu krvnih sudova mozga, on se nakuplja i u epitelu horioidnog pleksusa, primarnoj komponenti barijere između krvi i cerebrospinalne tečnosti (*Dietrich et al., 2008.*). Poznato je da horioidni pleksus ima ključnu ulogu u održavanju normalnog funkcionisanja neurona, tako što učestvuje uklanjanju A β iz moždane supstance (*Carro et al., 2002., Zlokovic, 2004.*). Rezultati iz mnogih istraživanja sugerišu da postoji direktna veza između depozita A β u epitelu horioidnog pleksusa i poremećaja u njegovoj strukturi i funkciji (*Dietrich et al., 2008., Vargas et al., 2010.*). Međutim, precizna uloga i mehanizam toksičnosti A β za epitelne ćelije horioidnog pleksusa nisu u dovoljnoj meri objašnjeni.

Neurofibrilarna klubad predstavljaju intracelularne nakupine abnormalnog fosforilisanog tau proteina (*neurofibrillary tangles* - NFT, eng.). Abnormalni fosforilisani tau protein je pronađen i kod drugih neurodegenerativnih bolesti ljudi, koje se svrstavaju u grupu oboljenja označenih kao taupatije (*Head et al., 2010., Capucchio et al., 2010.*). Kod taupatija nije uočeno nagomilavanje A β amiloda u mozgu, tako da je ta promena u mozgu relativno specifična za *Alzheimer*-ovu bolest (*Head et al., 2010.*).

2.6. EKSPERIMENTALNI MODELI

Razumevanje mehanizama nastanka promena u procesu starenja i razvoju *Alzheimer*-ove bolesti je otežano nedostatkom dobrih eksperimentalnih modela na životinjama, koji bi obuhvatili sve promene (*Torp et al., 2000.*). Za proučavanje mehanizama nastanka starosnih promena i promena nastalih pri razvoju *Alzheimer*-ove bolesti korišćeni su miševi, pacovi, kokošiji embrioni, psi, mačke, razni primati, delfini i druge.

Glodari, prvenstveno miševi (*Mus musculus*) su životinjska vrsta, koja se često koristi u brojnim medicinskim istraživanjima različitih patoloških stanja koja se javljaju kod ljudi. Njihov kratak životni ciklus, rađanje velikog broja mladih i mala veličina ih čini veoma dobrim eksperimentalnim modelom na kome se mogu lako izvoditi ispitivanja. U eksperimentalne svrhe se koriste transgeni miševi tzv. „knock out“ miševi, koji su deficitarni za određeni gen ili određene gene. Beta sekretaza „knock out“ miševi su jedinke u kojima se ne sintetiše β -sekretaza i ne stvara se $A\beta$. Smatra se da bi inhibitori β -sekretaze sprečili stvaranje $A\beta$ i tu svrhu se razvijaju nova terapijska sredstva koja bi sprečila stvaranje $A\beta$. Pored „knock out“ miševa korišćeni su miševi sa izraženom ekspresijom određenih gena kao što je gen za APP. Transgeni miševi kod kojih dolazi do nagomilavanja amiloida u mozgu, nisu uvek pokazivali kompletne nervne simptome karakteristične za *Alzheimer*-ovu bolest (Sarasa and Pesini, 2009.).

Pacovi (*Rattus norvegicus*) se takođe koriste za proučavanje patoloških promena u centralnom nervnom sistemu. Uloga neprilizina (*neprilysin*, eng.) i insulin degradirajućeg enzima (*insulin degrading enzyme*, eng.) u razgradnji $A\beta$ otkrivena je zahvaljujući podacima dobijenim iz brojnih eksperimenata izvedenih na pacovima. Primarna struktura $A\beta$ pacova i miševa se razlikuju od humanog $A\beta$ za tri aminokiseline pa se i proces stvaranja amiloida od APP razlikuje kod ovih životinja i ljudi. Kod pacova su izolovane četiri izoforme APP (APP-695, APP-714, APP-751, APP-770) (Sarasa and Pesini, 2009.).

Za proučavanje starosnih promena i promena koje nastaju u mozgu ljudi sa *Alzheimer*-ovim oboljenjem takođe je korišćeno morsko prase ili zamorac (*Cavia porcellus*). Sekvenca $A\beta$ peptida, koja se sintetiše kod morskog praseta, identična je humanoj sekvenci $A\beta$. Nedostatak ovog modela je u tome što se ne razvijaju identične patološke promene u mozgu (senilni plakovi i neurofibrilarna klubad). Takođe, ponašanje karakteristično za vrstu nije u dovoljnoj meri proučeno (Beck et al., 2003., Sarasa and Pesini, 2009.).

Kunići (*Oryctolagus cuniculus domesticus*) imaju identičnu sekvencu $A\beta$ peptida humanom peptidu, ali kao i kod morskog praseta spontano se ne javljaju promene karakteristične za *Alzheimer*-ovu bolest (Johnstone et al., 1991., Sarasa and Pesini, 2009.). Ishranom kunića hranom, koja je bogata holesterolom i u koju je

dodavan bakar, u kori mozga nastajali su depoziti amiloida. Ovi kunići su imali smanjenu sposobnost učenja komplikovanijih zadataka. Dobijeni rezultati ukazuju da bakar ima uticaj na akumulaciju A β u mozgu zbog smanjene razgradnje (*Sparks et al., 2006., Sparks, 2007., Sarasa and Pesini, 2009.*).

Kokošiji embrioni se mogu takođe koristiti za proučavanje amiloidoze u mozgu. Tri izoforme APP izolovane su iz kokošijih embriona (APP-695, APP-751, APP-770). Sličnost sekvence gena za APP kokošijeg embriona i humanog je 96%. Domen A β APP-a kokošijeg embriona je identičan sa humanim. U kokošijem embrionu dolazi do ekspresije gena za enzime, koji učestvuju u stvaranju beta amiloida, uključujući BACE1, BACE2, presenilin1, presenilin2, nikastrin. Glavni A β peptid koji se stvara tokom embriogeneze je A β 1-42 (*Carrdoguas et al., 2005.*). U kokošijem embrionu stvaraju se neprilizin, glavni enzim za razgradnju beta amiloida, i ADAM-17 (*a disintegrin and metalloproteinases-ADAM, eng.*), proteaza uključena u neamiloidogeni proces APP-a. Proučavanje starosnih promena u mozgu pilića, tj. kokošaka, je otežano zbog toga što ne postoje patohistološki standardi za životni uzrast ove životinjske vrste (*Dani, 1997., Sarasa and Pesini, 2009.*).

Smatra se da je pas (*Canis lupus familiaris*) jedan od pogodnijih modela za proučavanje neurodegenerativnih bolesti i staračkih promena u mozgu ljudi zbog sličnosti i kompleksnosti promena u mozgu i ponašanju (*Cummings et al. 1993b, Cummings et al. 1996b, Satou et al., 1997., Adams et al., 2000., Rofina et al., 2006.*). Pas je evolutivno bliži čoveku od drugih pomenutih vrsta. Incidenca formiranja plakova u mozgu starijih pasa je relativno visoka, ali bez prisustva neurofibrilarne klubadi. Ovo može biti od koristi u proučavanju početnog stadijuma nagomilavanja A β i formiranja plakova u regiji gde je došlo degeneracije, a u odsustvu neurofibrilarne klubadi (*Satou et al., 1997.*). Neki smatraju da nema dovoljno vremena za stvaranje neurofibrilarne klubadi u mozgu pasa zbog ranog uginuća (*Papaioannou et al., 2001., Yu et al., 2011.*).

Utvrđeno je da kod starih pasa dolazi do nakupljanja amiloida i slabljenja kognitivnih sposobnosti (*Torp et al., 2000.*). Njihovi odgovori su oslabljeni, zakasneli ili izostaju reakcije na razne zadatke, koji su pred njih postavljeni (učenje prepoznavanja, prostorna orijentacija i dr.). Takođe, ustanovljeno je da su razne kognitivne disfunkcije u vezi sa količinom nagomilanog A β u hipokampusu i frontalnoj

kori (*Cummings et al., 1996a, Cummings et al., 1996d, Satou et al., 1997.*). Slabljenje kognitivnih sposobnosti (učenje i pamćenje) su u korelaciji sa depozitima A β u korteksu mozga. Patohistološka istraživanja su pokazala da se kod pasa javljaju promene u početku u frontalnom korteksu i hipokampusu slično kao i u mozgu starih ljudi i obolelih od *Alzheimer*-ove bolesti. Depoziti A β se prvo stvaraju u dubljim slojevima, a kasnije i u površnim slojevima korteksa. Enzimi uključeni u stvaranju beta amiloida i APP su identični kod psa i čoveka. Neki autori su u svojim ispitivanjima uočili da su količina i tip ekstrahovanog A β iz mozga pasa i cerebrospinalne tečnosti, povezani sa procesom starenja i da pokazuju veliku sličnost sa humanim tipom (*Head et al., 2010.*). Peptid psa A β 1-42 je identičan humanom, dok se peptid miša i pacova razlikuje za tri aminokiseline. Takođe, identifikovani beta peptidi kraćih lanaca od A β 1-42 pasa i ljudi su identični, a razlikuju se od peptida miševa i pacova. Utvrđeno je, da enzimi koji učestvuju u procesima obrade APP kod ljudi i pasa pokazuju stepen homologije 92-100% (*Gonzales-Martines et al., 2011.*). Depoziti A β se ne javljaju uvek kod starih pasa kako bi se očekivalo. Nepostojanje dovoljno podataka o neuroanatomskoj organizaciji i o normalnom procesu starenja čine glavni nedostatak psa kao eksperimentalnog modela (*Sarasa and Pesini, 2009.*).

Kod starih sivih mišjih lemura (*Microcebus murinus*) u 20% slučajeva dolazi do masivne moždane atrofije, stvaranja amiloidnih plakova, citoskeletnih taupatija i gubitka holinergičkih neurona. Lemuri postaju stari već sa 5 godina (*Bons et al., 2006., Sarasa and Pesini, 2009.*). Taupatija slična kao kod *Alzheimer*-ove bolesti ljudi je otkrivena i kod stare šimpanze (*Pan troglodytes*). Neurofibrilarne promene u neuronima vezane za starost, bez nakupljanja A β , opisane su kod koza i ovaca, a kod polarnog medveda u prisustvu A β u mozgu. U nervnom tkivu delfina dokazani su masivni kongo crveno pozitivni depoziti. Ovi depoziti su identifikovani u produženoj moždini, velikom i malom mozgu. Takođe, dokazan je visok stepen homologije delfinovitih i humanih proteina APP, BACE, presenilin-1, presenilin-2. Utvrđeno je, da su A β 1-42 peptidi izolovani kod tri vrste delfina (*Grampus griseus, Stenella coeruleoalba i Tursiops truncatus*) identični humanom peptidu (*Sarasa and Pesini, 2009.*).

2.7. INTRACELULARNE PROMENE U NEURONIMA

Neurodegenerativne promene u mozgu tokom starenja pasa nisu ograničene samo na nagomilavanje A β , već je to širok spektar promena koje se dešavaju na intracelularnom nivou. U te promene se ubrajaju: promene na citoskeletu, promene u integritetu genoma, promene na nivou sistema za prenos signala u ćeliji, promene u održavanju redoks potencijala u ćeliji (oksidativni stres), akumulacije lipofuscina i druge.

Promene na citoskeletu u vidu formiranja neurofibrilarnih klubadi su dokazane kod ljudi obolelih od oboljenja nazvanih taupatije. U taupatije spadaju *Alzheimer*-ova bolest, Parkinsonova bolest, Daunov sindrom i druge bolesti. Smatra se da se u mozgu pasa pri degeneraciji neurona ne stvaraju neurofibrilarna klubad (*Dimacopoulos and Mayer, 2002.*).

Poznato je da pri degeneraciji neurona dolazi do narušavanja integriteta genoma. U istraživanjima je uočena pozitivna korelacija između oštećenja DNK i količine nagomilanog amiloida u mozgu starijih pasa. Smatra se, da je obim oštećenja DNK u direktnoj vezi sa obimom nagomilanog A β . Utvrđeno je, da fragmentacija DNK nije posledica aktivacije mehanizama apoptoze, već u procesu starenja spontano dolazi do fragmentacije DNK u neuronima pasa i ljudi (*Anderson et al., 2000., Dimacopoulos and Mayer, 2002.*).

Poremećaji intracelularnih signalnih puteva nastalih pri degeneraciji neurona nastaju zbog promene na različitim receptorima, koji su kinaze, fosfataze ili predstavljaju transkripcione faktore. Uočeno je, da amiloid smanjuje fosforilaciju jednog transkripcionog faktora koji utiče na ekspresiju gena za neurotrofni faktor (*brain-derived neurotrophic factor, BDNF, eng.*). Smanjeno stvaranje neurotrofnih faktora dovodi do gubitka neurona (*Dimacopoulos and Mayer, 2002.*).

Zapaženo je, da oksidativni stres ima veoma veliki značaj u patogenezi oboljenja kao što su neurodegenerativna oboljenja i kancerogeneza. Visok nivo oksidativnog stresa je uočen u mozgu starih pasa. Imunohistohemijskom tehnikom dokazano je prisustvo markera oksidativnog stresa u neuronima, u depozitima amiloida, u zidu krvnih sudova i perivaskularnim prostorima. Pri oksidativnom stresu dolazi do

neravnoteže između odbrambenih antioksidativnih mehanizama i količine slobodnih radikala. Oksidativni stres izaziva degeneraciju neurona i ima značajnu ulogu u patogenezi Alzheimer-ove bolesti (*Dimacopoulos and Mayer, 2002.*).

Rezultati nekih istraživanja sugeriraju da je A β neurotoksičan zato što podstiče razvoj oksidativnog stresa u ćeliji, sa posledičnim oštećenjem mitohondrija i gubitkom aktivnosti kompleksa respiratornog lanca (*Bosetti et al., 2002., Casley et al., 2002., Devi et al., 2006., Fukui et al., 2007.*). Takođe, A β pospešuje stvaranje azotnog oksida (NO) u neuronima (*Keil et al., 2004.*) i endotelnim ćelijama (*Lüth et al., 2001., Suhara et al., 2003.*). Azotni oksid je signalni molekul koji reguliše mnoge biološke procese u nervnom sistemu, uključujući i apoptozu (*Baud et al., 2004., Figueroa et al., 2006., Vargas et al., 2010.*). Poznato je, da NO inhibira odvijanje normalnih procesa na respiratornom lancu mitohondrija i da povećava ekspresiju i pojačava aktivnost matriks metaloproteinaza 9 (*matrix metalloproteinases 9, MMP-9, eng.*) (*Brown and Borutaite, 2002., Gu et al., 2002., Vargas et al., 2010.*). Enzimi MMP9 se oslobađaju pri stresu i tada učestvuju u oštećenju krvno-moždane barijere (*Rosenberg et al., 1998., Gashe et al., 2002.*). Inače, metaloproteinaze se nalaze ekstracelularno u rastvorljivom obliku ili su vezane za membranu i u normalnim fiziološkim uslovima učestvuju u remodeliranju ekstracelularnog matriksa (*Werb, 1997., Nagase and Woessner, 1999.*). Praktično metaloproteinaze imaju sposobnost da izvrše proteolizu endotelne bazalne membrane i na taj način dovode do oštećenja krvno-moždane barijere (*Rosenberg et al., 1998., Lee et al., 2003., Vargas et al., 2010.*).

2.8. METALOTIONEINI

Metalotioneini (MT) su proteini male molekulske težine (6-7kDa) bogati cisteinom (23-33 mol%). U familiju metalotioneina ubrajaju se četiri različite izoforme, koje su pronađene u raznim tkivima (*Nakajima and Suzuki, 1995., Zheng et al., 1995., Erickson et al., 1997., Adlard et al., 1998., Swindell, 2011.*). Izoforme I i II dokazane su u većini tkiva, III u mozgu i izoforma IV u stratifikovanom skvamoznom epitelu (*Erickson et al., 1997., Adlard et al., 1998., Kojima et al., 1999.*). Povećanu sintezu metalotioneina u ćeliji indukuju brojni različiti faktori kao što su bakterijski endotoksini, bivalentni teški metali, oksidativni stres, različiti citokini i polipeptidni hormoni (*Anezaki et al., 1995., Dalton et al., 1995., Ebadi et al., 1995., Zheng et*

al., 1995., Adlard et al., 1998., Swindell, 2011.). Pri oksidativnom stresu sinteza metalotioneina može biti indukovana i intenzivirana oslobađanjem rastvorljivih medijatora, kao što su glukokortikosteroidi i citokini (Adlard et al., 1998.).

U ćeliji metalotioneini imaju ulogu nosača metala, kao što su bakar i cink. Metalotioneini verovatno imaju ulogu u DNK transkripciji, sintezi proteina i replikaciji, jer vezuju metale, koji na taj način postaju dostupni enzimima i transkripcionim faktorima. Takođe, metalotioneini vezivanjem metala u ćeliji vrše detoksikaciju. Oni su jedan od odbrambenih mehanizama ćelije od dejstva slobodnih radikala. Metalotioneini poseduju, slično kao i glutation, sulfhidrilne grupe, koje vezuju slobodne hidroksilne i superoksidne radikale, a koje reaguju sa elektrofilima i na taj način sprečavaju oksidativna oštećenja ćelije (Adlard et al., 1998.). Peroksinitrat neutrališu MT I i II, a MT III hidroksidni radikal i peroksinitrat. Utvrđeno je, da MT III neutrališe slobodne radikale na bazi *Fenton*-ove reakcije ili fotolize hidroksidnog radikala. Metalotionein III se naziva i inhibitorni faktor rasta (*growth inhibitory factor*, GIF, eng.), jer inhibira neurotrofne faktore (Uchida et al., 2002., Uchida, 2010.).

U mozgu ljudi imunohistohemijski su dokazane izoforme I i II metalotioneina (MT I i MT II) najčešće u astrocitima i njihovim produžecima neokorteksa (Adlard et al., 1998.). Imunohistohemijski pozitivni signal je često difuzno raspoređen u sivoj masi od sloja od II do VI, dok se u sloju I ne javlja. U beloju masi ovaj signal je uniformno raspoređen po čitavoj površini. Dobijeni rezultati u ispitivanjima nekih autora ukazuju da pri razvoju starosnih promena i razvoju *Alzheimer*-ove bolesti raste nivo metalotioneina u mozgu. Po intenzitetu pozitivni signal je jači u mozgu pacijenta sa *Alzheimer*-ovim oboljenjem nego kod starijih osoba bez simptoma oboljenja. Povećanje nivoa metalotioneina u ranim i kasnim stadijumima *Alzheimer*-ove bolesti predstavlja odgovor okolnog tkiva na povećan nivo slobodnih radikala (Adlard et al., 1998.).

Metalotionein III je dokazan kod ljudi u glija ćelijama malog mozga i astrocitima neokorteksa, hipokampusa, striatuma, moždanog stabla i kičmene moždine, ali nije dokazan u Švanovim ćelija. Imunohistohemijskim bojenjem na MT III pojedini delovi mozga su pokazivali pozitivni signal različitog intenziteta. Jako pozitivni signal je uočen u neokorteksu u slojevima od II do VI, u hipokampusu molekularni sloj dentalnog girusa i sloj piramidalnih ćelija, a u kičmenoj moždini u sivoj supstanci. Slab

imunohistohemijski pozitivni signal je zapažen u beloj supstanci kičmene moždine i u neokorteksu u subkortikalnoj zoni. U neokorteksu produžeci pozitivnih astrocita grade gustu mrežu. U delovima koji imaju slab signal pozitivna su samo tela astrocita (*Uchida, 2010.*).

2.9. UBIKVITIN

Proteolizu većine proteina u ćelijama obavlja sistem ubikvitin-proteazomi. Za oštećene ili istrošene proteine ubikvitin se vezuje kovalentno, a za ovaj proces je potrebna kaskadna enzimska reakcija koja ima tri faze: fazu aktivacije, fazu konjugacije i fazu vezivanja. U procesu kovalentog vezivanja ubikvitina za ciljne proteine, koji će biti razloženi, vezuje se veći broj molekula ubikvitina čineći tako poliubikvitinski lanac (*Bingol et al., 2005.*).

Delimična ili potpuna proteoliza proteina su važni mehanizmi za regulisanje bioloških procesa. Veći deo intracelularne proteolize je katalizovan od strane sistema ubikvitin-proteazomi, koji je na taj način uključen u mnoge vitalno važne ćelijske funkcije. Poremećaj u funkcionisanju sistema ubikvitin-proteazomi zbog ontogenetskog razvoja ili zbog patoloških promena neminovno dovode do narušavanja integriteta ćelije (*Giannini et al., 2013.*).

U nervnom sistemu sistem ubikvitin-proteazomi ima normalnu fiziološku ulogu, dok brojna istraživanja ukazuju na njegovu ulogu i u nastanku neurodegenerativnih oboljenja ljudi uključujući i *Alzheimer*-ovu bolest (*Upadhya and Hegde, 2007.*). Inače, kod neurodegenerativnih oboljenja ljudi ustanovljena je određena korelacija između stepena dementnosti i pojave neurofibrilane klubadi vezane za ubikvitin. Kod 30% pacijenata sa SDAT pronađen je u neurofibrilarnim klubadima tau protein vezan sa ubikvitinom (*Upadhya and Hegde, 2007.*). Iako kod pasa nije dokazno prisustvo neurofibrilane klubadi, u mozgu uočeno je da ubukvitin formira granularne agregate u aksonima sa mijelinskim omotačem, a gustina im se povećava sa starošću.

U nekim neurodegenerativnim oboljenjima ustanovljeno je nakupljanje nerastvorljivih agregata proteina ili formiranje „inkluzionih telašaca“ (*inclusion bodies*, eng). Mnoge nastale agregate pri razvoju neurodegenerativnih oboljenja karakteriše to da daju imunohistohemijsku pozitivnu reakciju na razne proteine, kao i na ubikvitin

(Upadhya and Hegde, 2007.). Utvrđeno je, da demencija sa „Levi telima“ (*Lewy Body- eng.*) ima sličnu neuropatologiju sa SDAT. Ovo oboljenje je drugo po zastupljenosti neurodegenerativno oboljenje u humanoj populaciji. „Levi tela“ predstavljaju intracelularne inkluzije sastavljene od proteina kovalentno povezanih sa ubikvitinom, a većina tih proteina je filamentozne strukture. Sve ovo ukazuje na povezanost ubikvitina i fosforilisanog tau proteina i da postoje zajednički mehanizmi, koji dovode do neurodegeneracije u mozgu ljudi i pasa (*Dimacopoulos and Mayer, 2002.*).

Pretpostavlja se da nakupljanje proteina u ćeliji remeti funkcionisanje sistema ubikvitin-proteazomi (*Johnston et al., 1998., Layfield et al., 2003.*). Iako smetnje u funkcionisanju sistema ubikvitin-proteazomi prouzrokuju pleomorfne efekte u neuronima, uključujući njihovu degeneraciju pa čak i smrt, smatra se da je jedan od ranih efekata ovih smetnji poremećaj u funkcionisanju sinapsi (*Selkoe, 2002., Upadhya and Hegde, 2007.*). Najnovija istraživanja kod životinja ukazuju da fiziološku ulogu u održavanju funkcionalnosti sinapsi ima sistem ubikvitin-proteazomi na taj način što učestvuju u razgradnji istrošenih proteina, koji održavaju funkcionalnost sinapsi (*Hegde, 2004., Bingol et al., 2005., Upadhya and Hegde, 2007.*).

2.10. LIPOFUSCIN

Pored nagomilavanja A β u mozgu pasa u procesu starenja opisane su još neke promene kao što su akumulacija granula lipofuscina u citoplazmi neurona, dezintegracija plazma membrane neurona, demijelinizacija i druge (*Torp et al., 2000.*).

Tokom procesa starenja u ćelijama razvijaju se brojne pigmentne promene od kojih su mikroskopski najprepoznatljivije promene u količini melanina i lipofuscina. Promene u količini melanina su uočljive makroskopski i on može da se povećava ili smanjuje u procesu starenja što se ogleda u pojavi hiperpigmentacije u vidu staračkih fleka i mrlja (*lentigo*, lat.) ili hipopigmentacije sa pojavom sedih dlaka. Za razliku od melanina, količina lipofuscina uvek se povećava pri starenju organizma. Lipofuscin se tokom života jedinke sporo stvara, dok je intenzivno stvaranje većih količina pigmenta odlika poslednjih faza procesa starenja organizma (*Jung et al., 2010.*). Nalaz lipofuscina intracelularno predstavlja vremensku konstantnu morfološku promenu procesa starenja (*Porta, 2002.*).

Lipofuscin predstavlja „starački“ pigment koji se akumulira u većoj količini u postmitotičkim dugoživećim ćelijama (*Porta, 2002., Gray and Woulfe, 2005.*). Termin lipofuscin je uveden početkom prošlog veka, potiče od dve reči jedna je poreklom iz grčkog jezika, *lipo* što znači mast, a druga je iz latinskog jezika *fuscus* što znači tamno. Prvi put je opisan kao tamno smeđe-žuti pigment u neuronima polovinom XIX veka (*Brunk and Ericson, 1972., Porta, 2002.*).

Intracelularano stvaranje lipofuscina je veoma složen proces gde se biohemijske reakcije odvijaju u lizozomima, citoplazmi i mitohondrijama (*Jung et al., 2010.*). Do nakupljanja lipofuscina dolazi usled nepotpune degradacije proteina, lipida i oštećenih organela. Smanjenje produkcije hidrolitičkih enzima u lizozomima u procesu starenja ćelije jedan je od uzroka koji dovodi do akumulacije proteina, lipida i delova oštećenih organela. Akumulirane materije se sjedinjuju i praktično postaju nesvarljive i formiraju lipofuscinske granule (*Gray and Woulfe, 2005.*).

Različiti tipovi ćelija višćelijskih organizama ne stare istom brzinom. Nastale promene u procesu starenja najuočljivije su u postmitotičkim dugoživećim ćelijama kao što su kardiomiociti i neuroni. U ćelijama, kao što su ćelije kostne srži ili intestinalnog epitela, starosne promene su minorne ili su neuočljive. U procesu starenja promenama nisu zahvaćene samo ćelije već ekstracelularni matriks i intercelularne veze. Ipak od vitalnog značaja za funkcionisanje srca i mozga su starosne promene koje se razvijaju u postmitotičkim ćelijama (*Brunk and Terman, 2002a i b*).

Ćelije sisara imaju više mehanizama za degradaciju oštećenih ili istrošenih proteina. Jedan od glavnih sistema za proteolizu u citoplazmi je sistem ubikvitin-proteazomi (višejedinična proteaza). Proteazomi mogu da vrše razgradnju proteina samo kada su proteini u monomernom obliku i vezani za ubikvitin. Kada je više proteina kovalentno povezano proteazomi ne mogu da vrše proteolizu. Drugi mehanizam za uklanjanje istrošenih i oštećenih proteina i drugih intracelularnih komponenti je autofagija (autofagocitoza). U ćelijama postoji više vrsta procesa autofagije u koje se ubrajaju mikro-, makro- i autofagija posredovana šaperonima (*chaperon mediated autophagy*, eng.). Značajna karakteristika autofagije je formiranje vezikule, koja poseduje dvoslojnu membranu, a naziva se autofagozom. Formiranjem autofagozoma sekvstrira se jedan deo citoplazme i doprema do lizozoma. U autofagozomu se mogu

naći kompleksi proteina i/ili istrošene i oštećene organele iz citoplazme (*Höhn et al., 2012.*).

Iako su u procesu starenja promenama zahvaćene mnoge ćelijske komponente, najznačajnije promene se razvijaju na mitohondrijama i lizozomima postmitotičkih ćelija. Ove organele su označene kao najznačajnije organele za formiranje lipofuscina u *Brunk* i *Terman*-ovoj hipotezi mitohondrijalno-lizozomska osovina starenja postmitotičkih ćelija. Mitohondrijama se smanjuje kapacitet za stvaranje energije usled strukturnih alteracija, dok se u lizozomima nakuplja polimerizovani, nerazgradivi, zlatnožuti autofluorescentni pigment lipofuscin (*Brunk and Terman, 2002a i b*).

Lizozomi za ćeliju imaju veoma važnu ulogu, jer omogućavaju da se recikliraju istrošeni i oštećeni proteini i organele u procesu autofagocitoze. Pored toga, što učestvuju u prometu sopstvenih ćelijskih struktura, oni učestvuju u razgradnji ekstracelularnih molekula unetih procesom endocitoze (*Kurz et al., 2007.*). Razgradnju makromolekula obavlja oko 60 hidrolaza koje su okružene dvoslojnom fosfolipidnom membranom lizozoma. Membrana lizozoma učestvuje u reakciji sa endocitoznim vezikulama i autofagozomima (*Schröder et al., 2010.*). Pri procesu starenja u ćeliji dolazi do narušavanja stabilnosti lizozoma i održavanja pH u njima. Lizozomi predstavljaju oksido-redukcione aktivne prostore u kojima se nalaze u maloj koncentraciji gvožđe i bakar, koji su oslobođeni autofagnom degradacijom iz metaloproteina. Kisela sredina i visoka koncentracija tiola u lizozomima održava gvožđe u redukovanom obliku u kom može da reaguje sa endogenim ili egzogenim vodonik peroksidom. Usled reakcije gvožđa i vodonik peroksida nastaju hidroksilni radikali na bazi *Fenton*-ove reakcije u lizozomima i pospešuju stvaranje lipofuscina, jer izaziva peroksidaciju sadržaja lizozoma (*Kurz et al., 2007.*). Obimna akumulacija pigmentnih granula u lizozomima ometa normalno odvijanje procesa autofagije, što može biti veoma važan faktor pri procesu starenja i razvoju starosnih promena (*Kurz et al., 2010.*). Lipofuscin verovatno ometa proces autofagije na taj način, što vezuje novosintetisane lizozomalne enzime koji su neophodni za ovaj proces. Rezultat nedovoljnog i smanjenog odvijanja procesa autofagije u postmitotičkim ćelijama je akumulacija produkata metabolizma kao i dotrajalih i oštećenih intracelularnih komponenti (*Kurz et al., 2007.*). U slučaju značajnijeg oksidativnog stresa, pojačano se

stvaraju hidroksilni radikali, koji utiču na povećanu permeabilnost membrane lizozoma i na taj način se omogućava izlazak gvožđa i hidrolitičkih enzima u citoplazmu, što može dovesti do nekroze ili apoptoze ćelije. Apoptoza ćelije nastaje kada membrane malog broja lizozoma postanu propustljivije za gvožđe i enzime, a nekroza nastaje kada dođe do „prskanja“ većeg broja lizozoma (Kurz *et al.*, 2007.). Bakar u lizozomima obično nije oksido-redukciono aktivan zato što se najčešće vezuje sa različitim tiolima i formira komplekse koji nisu oksido-redukciono aktivni (Kurz *et al.*, 2010.).

Glavni izvor slobodnih radikala u ćelijama sisara su mitohondrije. U njima se na respiratornom lancu stvara superoksid koji generiše stvaranje drugih slobodnih radikala. Mitohondrije su veoma podložne oksidativnom stresu kada dolazi do povećanog stvaranja slobodnih radikala. Veća količina slobodnih radikala oštećuje mitohondrije i one gube svoju funkciju (Jung *et al.*, 2010.). Tada može da se javi edem mitohondrija ili enormno povećanje mitohondrija, kada se nazivaju megamitohondrije. Megamitohondrije nastaju zbog inhibicije deoba mitohondrija koja je usledila kao posledica pri oksidativnom stresu nastalog oštećenja proteina i lipida, koji učestvuju u deobi ovih organela (Jung *et al.*, 2010.). Oštećene mitohondrije proizvode manje energije za ćeliju i veću količinu superoksida. Reaktivne kiseonikove grupe utiču na stvaranje više aldehida i aldehidnih mostova između proteina (Brunk and Terman, 2002a i b). Fiziološki, lizozomi su organele zadužene za degradaciju istrošenih i oštećenih mitohondrija. Istrošene i oštećene mitohondrije se inkorporišu u lizosome u obliku makroautofagozoma. Ako dođe do kovalentnog povezivanja proteina u mitohondrijama oni postaju nerazgradivi za lizozomske hidrolaze. Ovako nerazgradive strukture mitohondrija mogle bi biti osnova za formiranje lipofuscina. Do kovalentnog povezivanja proteina u mitohondrijama dolazi zbog nastalih produkata peroksidacije masti, kao što su malonil-aldehid i 2-hidroksi-4-*trans* nonelal (HNE). Takođe, u mitohondrijama se nalazi određena količina jona gvožđa, koji mogu da katalizuju *Fenton*-ovu reakciju, što može da utiče na dalju oksidaciju proteina i peroksidaciju lipida neophodnu za stvaranje lipofuscina (Jung *et al.*, 2010.). Dalji razvoj procesa oksidacije proteina i peroksidacije smanjuje funkcije lizozoma pošto zahvata i njihove komponente. Smatra se, da postoji pozitivna povratna sprega između veće količine lipofuscina, smanjene funkcije lizozoma i formiranja veće količine aldehida (Brunk and Terman, 2002a i b).

In vitro je dokazano, da se lipofuscin ubrzano nakuplja u kulturi ćelija fibroblasta, glijia ćelija, kardiomiocita i epitelnih pigmentnih ćelija retine, uzgajanim u atmosferi sa 40% kiseonika. Takođe, dokazano je da redoksi aktivno gvožđe pospešuje akumulaciju lipofuscina u ćelijama (Terman and Brunk, 1998a). Ovo znači da svi faktori, koji pospešuju oksidativne procese u ćeliji, utiču na povećano stvaranje produkata metabolizma koji dovode do povećane akumulacije lipofuscina. Nasuprot ovome, antioksidansi smanjuju intenzitet oksidativnih procesa i tako usporavaju nakupljanje lipofuscina (Brunk and Terman, 2002a).

U izolovanim lipofuscinskim granulama hemijskim analizama je utvrđeno prisustvo različitih komponenti, a uglavnom su to proteini (30-70%) i lipidi (20-50%). Proteinsku komponentu čine brojni proteini različitog aminokiselinskog sadržaja. U lipidnoj komponenti lipofuscina zastupljene su slobodne masne kiseline, holesterol, trigliceridi, fosfolipidi, dolihol i fosforilisani dolihol. Pored proteina i lipida u izgradnji lipofuscinskih granula učestvuju ugljenohidrati (4-7%) i metali (do 2%). Manoza, N-acetil-D-galaktozamin i sijalinska kiselina su ugljenohidratne komponente koje ulaze u sastav staračkih pigmentnih granula (Terman and Brunk, 1998b, Double et al., 2008.). Gvožđe je metal koji učestvuje u značajnoj meri u izgradnji lipofuscina. Pored gvožđa „starački“ pigment sadrži bakar, cink i mangan (Jung et al., 2010.).

Lipofuscin histohemijski karakteriše PAS pozitivnost, acido rezistentnost (boji se modifikovanom tehnikom *Ziehl-Neelsen*), argirofilija, bojenjima karakterističnim za bojenje masti, kao što su Sudan crno (sudanofilija) i Oil-red-O. Tinktorijalne osobine mu se pojačavaju kod starijih jedinki. Lipofuscinske granule imaju sposobnost autofluorescencije (zlatnožuta). U neobojenim morfološkim uzorcima lipofuscin se vizuelizuje fluorescentnom ili laser skenirajućom mikroskopijom uz pomoć ekscitacionog svetla različitih talasnih dužina i korišćenjem različitih filtera (Brunk and Terman, 2002a).

Pojedinačna granula lipofuscina je osmiofilna, a posmatrana pod elektronskim mikroskopom vidi se kao homogena i tamna masa hrapave površine koja je često ograđena zajedno sa kapljicama masti membranom lizozoma debljine 100nm. Veliki broj pojedinačnih granula lipofuscina formira zrele veliku granulu. Zrela velika granula lipofuscina uglavnom je smeštena u blizini jedra (perinuklearno), ali može da bude

smeštena u dendritu, aksonu pa čak i u presinaptičkom području. U ćeliji zrela velika lipofuscinska granula može dostići maksimalnu veličinu 3-5 μm , dok se u početku formiranja nalazi u lizozomima normalne veličine. (*Double et al., 2008.*).

Nagomilavanje lipofuscina u neuronima je karakterističan nalaz pri procesu starenja organizma. U neuronima mlađih jedinki retko se može dokazati prisustvo granula ovog pigmenta. Pigment nije uniformno raspoređen u mozgu, ali postoje predilekciona mesta, tj. delovi mozga u kojima se nalaze neuroni, koji u sebi sadrže granule ovog pigmenta. U centralnom nervnom sistemu čoveka predilekciona mesta nakupljanja lipofuscina su delovi mozga i kičmene moždine, koji učestvuju u inicijaciji, monitoringu i kontroli kretanja. U ove delove ubrajaju se olivarna jedra produžene moždine, *nucleus dentatus* (lat.) malog mozga, *globus pallidus* (lat.) jedara bazalnih ganglija, kao i motorni neuroni dorzalnih rogova kičmene moždine i moždanog stabla. Pri starenju organizma dolazi do akumulacije lipofuscina i u kori velikog mozga (*Gray and Woulfe, 2005.*). U ispitivanjima populacije pacova različite starosti na sadržaj lipofuscina utvrđeno je značajno povećanje količine pigmenta kod starijih jedinki u odnosu na mlađe (*Benavides et al., 2002.*).

Akumulirani lipofuscin može da ugrozi ćeliju na više načina. Nagomilani pigment ometa funkcionisanje sistema ubikvitin-proteazomi, zbog čega može doći do smrti ćelije usled izraženog nagomilavanja drugih nus produkata u njoj. Dokazano je, da su unakrsno povezani proteini loš supstrat za proteazome, šta više, u stanju su da ih inhibišu. Inhibicijom proteazoma smanjuje se razgradnja oksidovanih proteina i olakšava njihovo taloženje, jer su u stanju da se unakrsno povežu zbog svojih reaktivnih grupa. Ovako unakrsno povezani proteini reaguju sa drugim ćelijskim strukturama gradeći nove lipofuscinske granule. Pošto lipofuscin ima sposobnost da dovede do oksidacije proteina i peroksidacije lipida, on praktično olakšava stvaranje novih količina pigmentnih granula, tj. što ga ima više lakše se stvara. Takođe, lipofuscin može da deluje neposredno toksično, jer sa svojom hemijski reaktivnom površinom može da veže različite metale, kao što su Fe, Cu, Zn, Mn, Ca i druge. Vezivanjem ovih metala u koncentraciji do 2%, lipofuscin remeti metabolizam ćelije, a preko 2% toksično deluje na ćeliju (*Jung et al., 2007.*).

Lipofuscin može da zauzme 40-75% zapremine ćelije. Povećana količina pigmenta ispunjava citoplazmatski prostor što u početku rezultuje smanjenjem funkcionalnih kapaciteta, a kasnije dovodi do apoptotične smrti ćelije (*Jung et al., 2007.*).

Treba napomenuti da postoji veliki broj patoloških stanja kod kojih dolazi do nakupljanja pigmenta, čije su karakteristike slične lipofuscinu. Pigment koji se povezuje sa različitim patološkim stanjima naziva se ceroid ili lipofuscin tipa ceroid (*Terman and Brunk, 1998a*). Kod brojnih patoloških stanja i bolesti dolazi do nakupljanja ceroida: neuralna ceroidna lipofuscinoza, Batenova bolest, tumori, radijacione povrede, hormonski disbalansi, genetski defekti, infekcije, loša ishrana i druge. Ovaj pigment ima iste histohemijske osobine kao i lipofuscin: sudanofiliju, autofluorescenciju, PAS pozitivnost i acidorezistenciju. Od lipofuscina se razlikuje po tome što se obično intenzivno nakuplja ekstracelularno i intracelularno. Njegovo intracelularno prisustvo je vezano za letalno oštećenje ćelije, što nije slučaj sa lipofuscinom (*Vandeveldel and Fatzer, 1980., Terman and Brunk, 1998., Porta, 2002., Drögemüller et al., 2005.*).

2.11. POLIGLUKOZANSKA TELA

Poliglukozańska tela (*polyglucosan bodies - PGB, eng.*) nastaju u mozgu i drugim organima ljudi i životinja. Postoji više formi PGB, a jedna od formi intracelularnih poliglukozańskih tela su Lafora tela (*Lafora bodies, eng.*), koja su dobila naziv po španskom neuropatologu Gonzalo Rodríguez Lafora (1886.-1971.), koji ih je otkrio kod pacijenata sa miokloničnom epilepsijom i demencijom. Nešto kasnije, ovo stanje pacijenata sa miokloničnom epilepsijom i demencijom je nazvano Lafora oboljenje. U mozgu mladih pasa sa epilepsijom i depresijom PGB se sreće u velikom broju i to najčešće kod biglova, baseta i pudli (*Gredal et al., 2003., Márquez et al., 2010.*).

Lafora oboljenje (*Lafora disease, eng.*) je autozomno recesivno oboljenje koje nastaje kod ljudi usled mutacija na EPM2A (*epilepsy progressive myoclonus type 2A, eng.*) i EPM2B (*epilepsy progressive myoclonus type 2B, eng.*) genima, ali je opisano kod pasa, kod kojih je ustanovljeno da dolazi do mutacije samo na EPM2B genu (*Lohi et al., 2005., Márquez et al., 2010.*). Gen EPM2A kodira sintezu laforin proteina, koji je

enzim fosfataza po svojoj funkciji, a poseduje i mesta specifičnog vezivanja ugljenih hidrata, dok EPM2B gen kodira sintezu malin proteina, koji je po svojoj funkciji ubikvitin ligaza. S obzirom da mutacije na pomenutim genima prouzrokuju nedostatak proteina bitnih za metabolizam ugljenih hidrata posledično dolazi do njihovog nagomilavanja u mozgu i drugim organima (*Márquez et al., 2010.*). Laforin i malin su proteini koji učestvuju u metabolizmu ugljenih hidrata i u procesu stvaranja glikogena. Usled nedostataka normalnih proteina laforina i malina fiziološki proces stvaranja glikogena je poremećen. Molekuli glukoze se iregularno povezuju i tako nastaju abnormalni polimeri, koji su nazvani poliglukozani. Lafora tela i ostala PGB su uglavnom izgrađena od ugljenih hidrata (poliglukozana), ali sadrže i male količine kiselih mukopolisaharida. Poliglukozani (malformisani glikogen) ne mogu da budu rastvoreni u citoplazmi ćelija zbog svoje asimetrične i nepravilne strukture, već dolazi do njihove precipitacije (*Lohi et al., 2005., Márquez et al., 2010.*)

Prema *Cavanagh*-u postoji više vrsta poliglukozanskih tela, kao što su korpora amilacea (*corpora amylacea, CA* eng.), Lafora tela, „tela slična Lafora telima“ (*Lafora-like bodies* eng.) i druga poliglukozanska tela. Terminom korpora amilacea označena su poliglukozanska tela, koja se javljaju kod ljudi normalno u procesu starenja, dok su terminom Lafora tela nazvana intracelularna tela pronađena kod pacijenata sa miokloničnom epilepsijom. Korpora amilacea su opisana kao sferična tela veličine od 2 do 20 μ m, koja mogu da se vide pomoću svetlosnog mikroskopa. Kada se CA nalaze u većem broju može se zapaziti poneko telo većih dimenzija od 20 μ m. Centralni deo CA se boji tamnije od perifernog dela, dok je radijalna prugavost karakteristika pravih Lafora tela. Korpora amilacea su uglavnom glatke, ali u pojedinačnim slučajevima mogu biti hrapave površine. Poliglukozanska tela, koja nastaju normalno u procesu starenja kod pasa i mačaka, označena su kao „tela slična Lafora telima“. Ova tela odlikuje to da su slična normalnim telima, koja nastaju kod ljudi u procesu starenja, tj. slična su sa CA, ali se razlikuju po topografskoj distribuciji, koja je karakteristična za vrstu (*Cavanagh, 1999.*).

Poliglukozanska tela se mogu biti različito lokalizovani u CNS-u intracelularno i ekstracelularno u zavisnosti od stanja u kom nastaju. Kod Lafora oboljenja PGB su dokazana perinuklearno i u dendritima neurona, dok su kod GBED oboljenja (*glycogen*

branching enzymes deficiency disease, GBED, eng.) su dokazana u aksonima neurona. Lafora oboljenje se karakteriše epilepsijom i demencijom, a GBED oboljenje samo demencijom (*Lohi et al., 2005.*).

Za razliku od Lafora tela koja se nalaze u citoplazmi neurona, druge forme poliglukozanskih tela mogu se dokazati u astrocitima. Pojedini autori PGB prisutne u astrocitima označavaju kao korpora amilacea, nastaju normalno u procesu starenja, a kod pacijenata sa *Alzheimer*-ovim oboljenjem prisutni su u veoma velikom broju (*Borras et al., 1999., Lohi et al., 2005.*).

Dokazana je ekstracelularna lokalizacija PGB u moždanom tkivu pasa u procesu starenja. Neki autori su utvrdili da su PAS pozitivna PGB nastala u procesu starenja pasa negativna na ubikvitin i neurofilament. Uzimajući u obzir dobijene rezultate dvostrukog bojenja PAS metodom i imunohistohemijski na GFAP bojenja kao i odsustvo pozitivne reakcije sa ubikvitinom u svom istraživanju, ovi autori su poliglukozanska tela su nazvali Lafora tela. Dobijeni rezultati dvostrukim bojenjem su ukazala da PGB nisu vezani za astrocitne citoplazmatske produžetke (*Borras et al., 1999.*).

Dobijeni rezultati u nekim ispitivanjima prisustva poliglukozanskih tela kod životinja imunohistohemijskim bojenjima su veoma različiti. Za razliku od PGB kod životinja, u humanoј populaciji CA i Lafora tela su dobro imunohistohemijski definisana. *Gredal* i sar. u svom istraživanju su dobili kod pasa sa miokloničnom epilepsijom imunohistohemijsku pozitivnu reakciju CA sa antitelima za humana PGB i neurofilament (*Gredal et al. 2003.*). Pojedini autori, na osnovu dobijenih rezultata imunohistohemijskog bojenja, smatraju da PGB u malom mozgu i hipotalamusu potiču isključivo iz neurona, a da iz ostalih delova mozga mogu pored neurona poticati i iz glija ćelija. Ovo je pretpostavljeno na osnovu toga što PGB u malom mozgu i hipotalamusu nisu dali imunohistohemijsku pozitivnu reakciju sa antitelima na neuron-specifičnu enolazu (*neurone-specific enolase, NSE, eng.*), GFAP i S-100, a u ostalim delovima CNS-a PGB su bila pozitivna na ove markere.

3. CILJ I ZADACI ISPITIVANJA

Cilj ove doktorske disertacije je utvrđivanje morfoloških promena, histochemijsko i imunohistochemijsko dokazivanje nakupljanja patoloških depozita i drugih produkata koji nastaju tokom procesa starenja u mozgu pasa.

Navedeni cilj je ostvaren kroz sledeće zadatke:

- Makroskopsko ispitivanje moždanica i mozga;
- Mikroskopsko ispitivanje moždanog tkiva po odabranim segmentima;
- Histochemijsko ispitivanje prisustva patoloških depozita kao što su amiloid, lipofuscin i poliglukozanska tela;
- Imunohistochemijsko ispitivanje amiloida i produkata koji nastaju tokom oštećenja moždanog tkiva kao što su ubikvitin i metalotionein;
- Statistička obrada dobijenih rezultata.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. MATERIJAL

4.1.1. Ispitivani materijal

Za izradu ove doktorske disertacije ispitivano je moždano tkivo 36 uginulih i eutanaziranih pasa. Psi su uginuli ili eutanazirani iz različitih razloga: maligne neoplazme, bubrežna insuficijencija, srčane slabosti, komplikovane frakture, agresivnost, fatalne hemoragije, itd. Ispitivani psi su obdukovani na Katedri za patološku morfologiju, Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu.

4.1.2. Eksperimentalne grupe

Od 36 obdukovanih pasa šest pasa je starosti do pet godina, a ostalih 30 pasa su starosti preko deset godina. Šest pasa starosti do pet godina, različite rase i pola, korišćeni su kao kontrolna grupa. Ovu grupu je činilo 3 mužjaka i 3 ženke (jedan bokser, američki stafordski terijer, zapadno škotski beli terijer, čau-čau i dva mešanca). Takođe, eksperimentalnu grupu činili su psi različitih rasa: jedan američki stafordski terijer, labrador, nemački ovčar, rotvajler i šarplaninac, dva irska setera, engleska koker španijela, pudle i pekinzera i 17 mešanaca. U eksperimentalnoj grupi je bilo 13 mužjaka i 17 ženki .

4.1.3. Priprema histoloških preparata

Nakon izvršene obdukcije moždano tkivo pasa je fiksirano 72h u 10% neutralnom formalinu. Odnos fiksativa i uzorkovanog tkiva bila je 10:1. Posle 72h fiksacije mozgovi su sečeni transverzalnim rezovima, pri čemu su uzorkovani za ispitivanje frontalna kora, parijetalna kora, hipokampus, mali mozak i produžena moždina leve polovine mozga. Pomenuti delovi mozga su fiksirani još 24h u 10% neutralnom formalinu. Za vreme fiksacije moždanog tkiva fiksativ je bio stalno bistar.

Po završenoj fiksaciji izvršeno je modeliranje tkiva i uklapanje tkiva u parafin. Fiksirano tkivo je modelirano na isečke debljine 0,2 ili 0,3 cm. Modelirano tkivo je prvo dehidrirano kroz seriju alkohola 70%, 96% i apsolutni alkohol, a posle je prosvetljavano u ksilolu i impregnirano parafinom. Ceo proces posle modeliranja je obavljen u tkivnom procesoru za automatsko procesovanje tkiva *Leica TP 1020*. Prosvetljeno tkivo je

uklopljeno u parafinske kalupe u parafinatoru *Leica EG1120*. Parafinski kalupi su sečeni na isečke debljine 4-6 µm na *Leica RM 2235* i montirani na predmetna stakla za odgovarajuća bojenja. Pre svakog bojenja montirani tkivni isecci na predmetnim staklima su bili 24h na 56°C u termostatu *Binder E/B28*. Zatim su tkivni isecci deparafinisani u ksilolu i rehidrirani kroz seriju alkohola (apsolutni alkohol, 96%, 70%), posle čega su bojani sledećim metodama bojenja: hematoksilin eozin, kongo crveno, modifikovanom *Ziehl Neelsen*, PAS. Takođe, tkivni isecci su bojani imunohistohemijskom metodom.

Priprema histoloških preparata, histohemijska i imunohistohemijska bojenja ispitivanog moždanog tkiva je obavljena na Katedri za patološku morfologiju, Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu. Analiza obojenih tkivnih isečaka je obavljena pomoću svetlosnog mikroskopa (*Olympus, BX51*). Preparati obojeni bojenjem kongo crvenim analizirani su dodatno još i pod polarizacionim svetlom. Pojedini obojeni preparati sa karakterističnim nalazima starosnih promena su odabrani i urađene su digitalne fotografije pomoću svetlosnog mikroskopa (*Olympus, BX51*) sa digitalnom kamerom (*Olympus ColorView III*).

4.2. METODE

4.2.1 Hematoksilin eozin (HE)

Tkivni isecci ispitivanih pasa su bojani standardnom metodom bojenja tkiva hematoksilin eozin. Posle deparafinizacije i rehidriranja, tkivni isecci su bojani u hematoksilinu (*Mayer's solution*) u trajanju od 5 minuta. Diferenciranje je obavljeno u kiselom alkoholu, a bojenje u eozinu je trajalo 3 minuta. Nakon svake faze bojenja i diferenciranja, tkivni isecci su ispirani u vodi. Potom su dehidrirani kroz ascedentnu seriju alkohola i dovedeni do ksilola i na kraju su montirani medijumom za montiranje tkivnih isečaka.

Rezultati: Jedra se boje plavo, a citoplazma različitim nijansama ružičaste boje.

4.2.2. Kongo crveno (*Congo red*, eng.)

Za vizuelizaciju amiloida u tkivnim iseccima ispitivanog moždanog tkiva, isecci su bojani histohemijskom metodom kongo crveno. Nakon deparafinizacije u ksilolu i rehidriranja kroz descendentnu seriju alkohola, tkivni isecci su bojani 30 minuta,

prethodno pripremljenom bojom kongo crvenog. Po isteku 30 minuta preparati su ispirani u destilovanoj vodi pa su bojeni u hematoksilinu 45 sekundi. Preparati su dobro ispirani tekućom i destilovanom vodom, a zatim su provedeni po 10 sekundi kroz ascendentnu seriju alkohola, bez 70% alkohola, do ksilola. Na kraju su preparati montirani medijumom za montiranje tkivnih isečaka.

Rezultati: Amiloid pod polarizacionim svetlom daje žuto zelenu fluorescenciju.

4.2.3. Modifikovana *Ziehl Neelsen* metoda

Za dokazivanje lipofuscina u neuronima tkivni isečci su bojeni modifikovanom metodom *Ziehl Neelsen*. Bojenje tkivnih isečaka karbol fuksinom usledilo je posle deparafinizacije i rehidriranja preparata, a trajalo je tri časa na 56°C. Potom su preparati ispirani u destilovanoj vodi pa diferencirani u 1% kiselom alkoholu. Nakon toga su preparati ispirani u destilovanoj vodi, pa su bojeni vodenim rastvorom metilenskog plavog. Posle bojenja preparati su ispirani, provedeni kroz ascendentnu seriju alkohola i ksilol i na kraju montirani medijumom za montiranje tkivnih isečaka.

Rezultati: U tkivnim isečcima obojenim modifikovanom metodom *Ziehl Neelsen* granule lipofuscina se nalaze u neuronima, a boje se karmin crveno.

4.2.4. PAS (*Periodic acid Schiff*) metoda

PAS metoda je korišćena za dokazivanje prisustva poliglukozanskih tela (*Polyglucosan bodies*, PGB, eng.) i lipofuscina u tkivnim preparatima moždanog tkiva ispitivanih pasa. Tkivni isečci su prvo deparafinirani kroz ksilol i descendentnu seriju alkohola, nakon čega su stavljani u kivete sa vodenim rastvorom perjordne kiseline 5-10 minuta. Posle perjordne kiseline tkivni isečci su ispirani u destilovanoj vodi, a zatim su potopljeni u *Schiff*-ov reagens 15 minuta. Nakon isteka 15 minuta, preparati su ispirani prvo u tekućoj vodi tri minuta, a posle u destilovanoj vodi. Kontrastno bojenje jedara u hematoksilinu usledilo je odmah posle ispiranja. Na kraju su preparati provedeni kroz seriju alkohola 95% i apsolutni, ksilol i montirani medijumom za montiranje tkivnih isečaka.

Rezultati: U tkivnim isečcima bojenim PAS metodom poliglukozanska tela su se bojila dvojako u prvom slučaju centralni delovi su tamnoružičaste do ljubičaste boje, a oko se nalazi ružičasta halo zona, dok su u drugom slučaju bili celom površinom

podjednake ružičaste boje. Lipofuscinske granule u tkivnim isečcima, obojenim PAS metodom, bile su karmin crvene boje.

4.2.5 Imunohistohemijska metoda

U svrhu imunohistohemijskog ispitivanja starosnih promena u mozgu pasa korišćena je trostepena indirektna metoda uz adekvatno demaskiranje antigena, tj. imunohistohemijsko bojenje primenom streptavidin-biotin tehnike (LSAB2). Za imunohistohemijsko bojenje korišćen je komercijalni kit (*Labelled streptavidin-biotin* LSAB2 metoda, *DAKO*, Danska), a od primarnih antitela upotrebljena su: poliklonsko antitelo za beta amiloid (proizvođač *AbD serotec*), monoklonsko antitelo za β amiloid (proizvođač *INVITROGEN*), poliklonsko antitelo za amiloid prekursor protein (proizvođač *AbD serotec*), monoklonsko antitelo za ubikvitin (proizvođač *AbD serotec*), monoklonsko antitelo za metalotionein (proizvođač *DAKO*), poliklonsko antitelo za GFAP (*glial fibrillary acidic protein*, eng.)(proizvođač *DAKO*), poliklonsko antitelo za tau protein (proizvođač *DAKO*). Demaskiranje antigenskih epitopa je vršeno termički, proteolitički ili inkubacijom u mravljoj kiselini (Tabela 1.). Inhibicija endogene peroksidaze je obavljena upotrebom 3% H_2O_2 u metanolu 15 minuta. Tokom imunohistohemijskog bojenja za sva ispiranja korišćen je fosfatni pufer (*Phosphate buffer solution*, PBS, eng.), čiji je pH bio u granici između 7,2 i 7,4. U fazi preinkubacije, u trajanju od 20 minuta, korišćen je 25% normalni kozji serum razblažen PBS-om. Primarna antitela su razblažena fosfatnim puferom (Tabela 1.) i inkubirana u vlažnoj komori na sobnoj temperaturi 60 minuta. Posle završene inkubacije preparati su ispirani fosfatnim puferom. Po ispiranju tkivni isecci su tretirani reagensima iz kita za detekciju (*DAKO*, *Cytomation*, *LSAB2 System-HRP*, *K0675*). Prvo su isecci inkubirani u trajanju od 20 minuta sa link antitelom (Boca A, kit *DAKO*), a zatim ispirani PBS-om pa inkubirani sa streptavidin-peroksidazom na sobnoj temperaturi 20 minuta (Boca B, kit *DAKO*). Za vizuelizaciju nastalog kompleksa antigen-antitelo korišćen je hromogen diaminobenzidin (DAB+, *DAKO*, *K3468*). Posle inkubacije sa hromogenom u trajanju od 10 minuta, preparati su ispirani destilovanom vodom, a zatim kontrastirani u hematoksilinu. Nakon kontrastiranja, preparati su ispirani u vodi i na kraju montirani pomoću vodenog medijuma za montiranje *Glycergel-a* (*DAKO*, *C563*).

Rezultati: Mesta specifičnog vezivanja antitela za antigen su precipitati smeđe boje, dok hematoksin boji plavo jedra svih ćelija za koje se nespecifično veže. Kao negativna kontrola korišćeni su tkivni isecci moždanog tkiva koji nisu inkubirani sa primarnim antitelom.

Tabela 1. Spisak korišćenih primarnih antitela za imunohistohemijsko ispitivanje, predtretmani i razređenja primarnih antitela.

Primarno antitelo	Proizvođač i serijski broj antitela	Predtretman	Razređenje
Rabbit Anti Beta Amyloid (N-terminal), <i>Polyclonal Antibody</i>	Abd serotec <i>AHP 1252</i>	Mravlja kiselina 85%, 10 minuta, sobna temperatura	1:400
Abeta 1-42, Abfinity Recombinant Rabbit, <i>Monoclonal Antibody</i>	<i>INVITROGEN</i> <i>700254</i>	Mravlja kiselina 85%, 10 minuta, sobna temperatura	1:500
Rabbit Anti Amyloid Precursor Protein (APP), <i>Polyclonal Antibody</i>	Abd serotec <i>AHP538</i>	Kuvanje u citratnom puferu (Ph= 6,0), 20 minuta,	1:200
Mouse Anti Ubiquitin, <i>Monoclonal Antibody</i>	Abd serotec <i>MCA1398G</i>	/	1:3000
Anti Metallothionein, <i>Monoclonal Antibody</i>	<i>DAKO</i> <i>M0639</i>	Mravlja kiselina 85%, 10 minuta, sobna temperatura	1:50
Anti Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), <i>Polyclonal Antibody</i>	<i>DAKO</i> <i>Z0334</i>	Proteinaza K, 5 minuta, sobna temperatura	1:1500
Anti Human Tau, <i>Polyclonal Antibody</i>	<i>DAKO</i> <i>A0024</i>	/	1:400

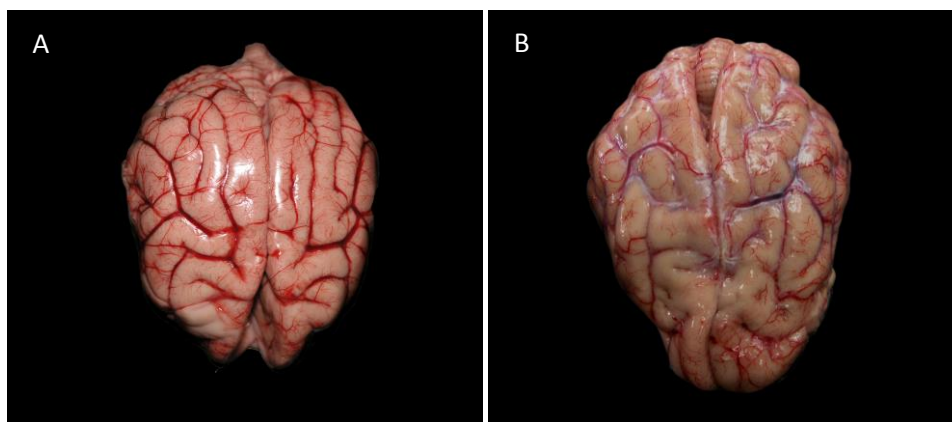
4.2.6. Statistička obrada

Pri statističkoj analizi dobijenih rezultata korišćeni su relativni brojevi za opisivanje strukture patohistoloških promena u centralnom nervnom sistemu, a za ustanovljavanje statističke značajnosti razlika kontrolne i eksperimentalne grupe korišćen je X^2 (Hi kvadrat) test. Značajnost razlika ustanovljavana je na nivou od 95% i 99%. Dobijeni rezultati su prikazivani tabelarno i grafički. Statistička analiza je urađena u programima *Microsoft Excel 2007* i *GraphPadPrism 5*.

5. REZULTATI

5.1. MAKROSKOPSKE PROMENE

Od makroskopskih promena na mozgu pasa uočene su atrofija, odnosno suženje vijuga, proširenje brazda, blago proširenje lateralnih komora i difuzno zadebljanje mekih moždanica (*leptomeningx*, lat.). Kod pasa iz kontrolne grupe nijedna od pomenutih makroskopskih promena nije uočena. Suženje vijuga i proširenje brazda mozga pronađeno je u grupi pasa najveće starosti između 16,5 i 18 godina (Slika 1B). Atrofija moždanih vijuga sa posledičnim proširenjem brazda ustanovljena je kod 5 pasa iz eksperimentalne grupe, što čini 16,67% pasa. Blago proširenje lateralnih komora dijagnostikovano je kod 19 pasa iz eksperimentalne grupe (63,33%). Primećeno je da su mozgovi svih pasa starijih od 15 godina zahvaćeni ovom promenom. Difuzno zadebljanje mekih moždanica ustanovljeno je kod 23 starija psa (76,67%). Ovo zadebljanje mekih moždanica se jasno uočava u nivou moždanih vijuga u vidu beličastog zamućenja moždanica (Slika 1B).



Slika 1. **A-** makroskopski izgled mozga psa starog 1 godinu i 9 meseci, **B-** makroskopski izgled mozga psa starog 17 godina. Atrofija moždanih vijuga sa proširenjem brazda i difuzno zadebljanje mekih moždanica.

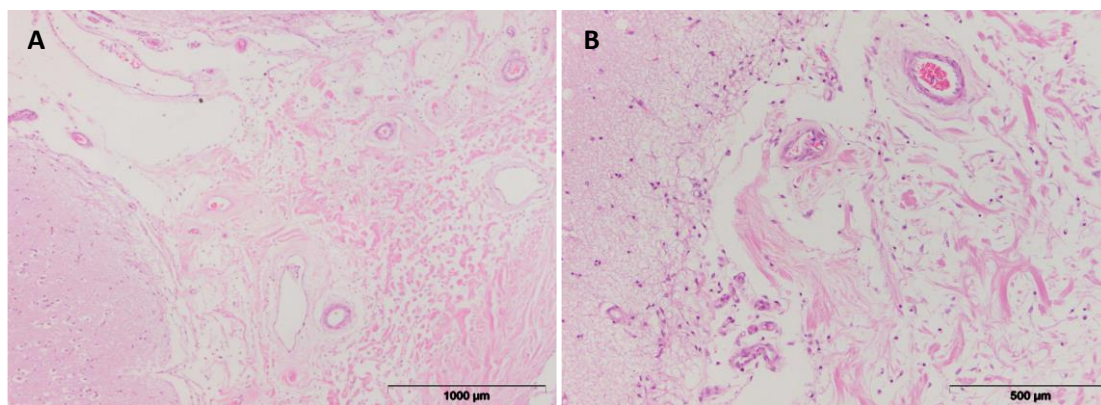
5.2. PATOHISTOLOŠKE PROMENE

U mozgu pasa uočene su sledeće histološke promene: fibroza mekih moždanica, glijoza (astroglijoza i astrocitoza), satelitoza, neuronofagija, kao i promene na krvnim sudovima. Prisustvo i distribucija amiloida, APP, GFAP, metalotioneina, ubikvitina,

patološkog tau proteina i lipofuscina, ispitivani su imunohistochemijskim i histohemijskim metodama.

5.3 FIBROZA MEKIH MOŽDANICA

Histološki, fibroza mekih moždanica je utvrđena, kao i pri makroskopskog pregledu, kod 23 psa eksperimentalne grupe (76,67%), dok kod pasa kontrolne grupe nije ustanovljena ni u jednom slučaju. Fibroza mekih moždanica se manifestuje prisustvom veće količine kolagenih vlakana i malim brojem fibroblasta (Slika 2.). Takođe, zapaženo je da je fibroza mekih moždanica konstantan nalaz kod pasa starijih od 12 godina. U okviru zadebljelih mekih moždanica nalaze se krvni sudovi, čiji su zidovi zahvaćeni fibrozom.



Slika 2. **A**-fibroza mekih moždanica i zida meningealnih krvnih sudova, HE, parijetalni režanj, pas 17 god., **B**-fibroza mekih moždanica i zida meningealnih krvnih sudova, HE, parijetalni režanj, pas 17 god.

5.4. GLIOZA

Glioza je ustanovljena u svim ispitivanim delovima CNS-a pasa eksperimentalne grupe, a najfrekventnija je bila u frontalnoj kori 25 starih pasa (83,33%). U tkivnim isečcima bojenim hematoksilin eozin metodom, kao i imunohistochemijski na GFAP i metalotionein, u CNS-u kontrolne grupe pasa ustanovljeno je blago povećanje broja glija ćelija u frontalnoj i parijetalnoj kori, hipokampusu i produženoj moždini. U ostalim ispitivanim delovima CNS pasa iz kontrolne grupe glioza nije dijagnostikovana.

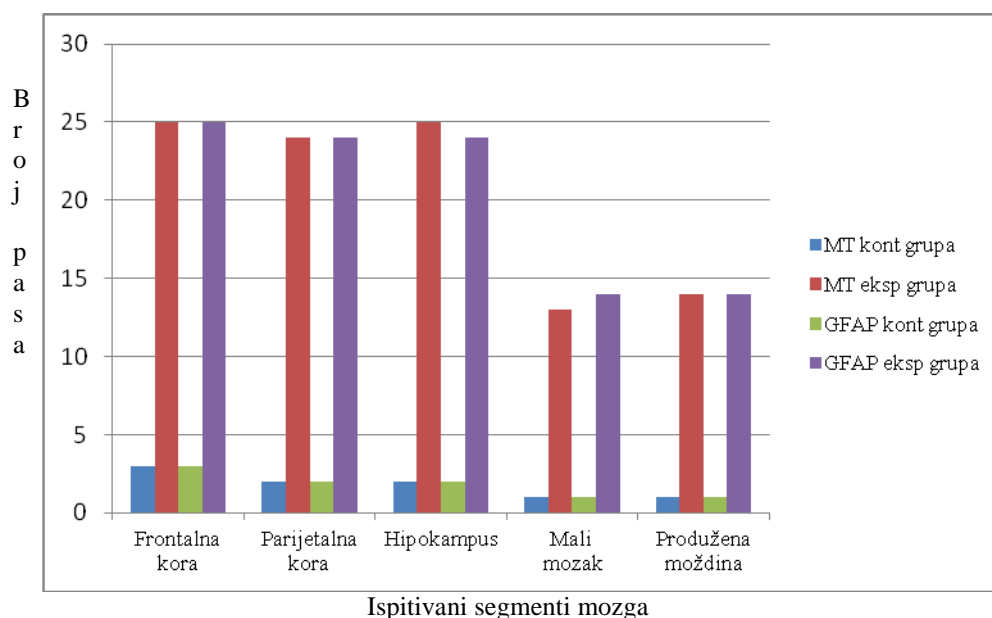
5.4.1. Astrocitoza i astroglioza

Promene na astrocitima ispoljile su se u dva oblika i to kao hipertrofija (astroglioza) i povećanje njihovog broja (astrocitoza). Imunohistochemijskim bojenjem

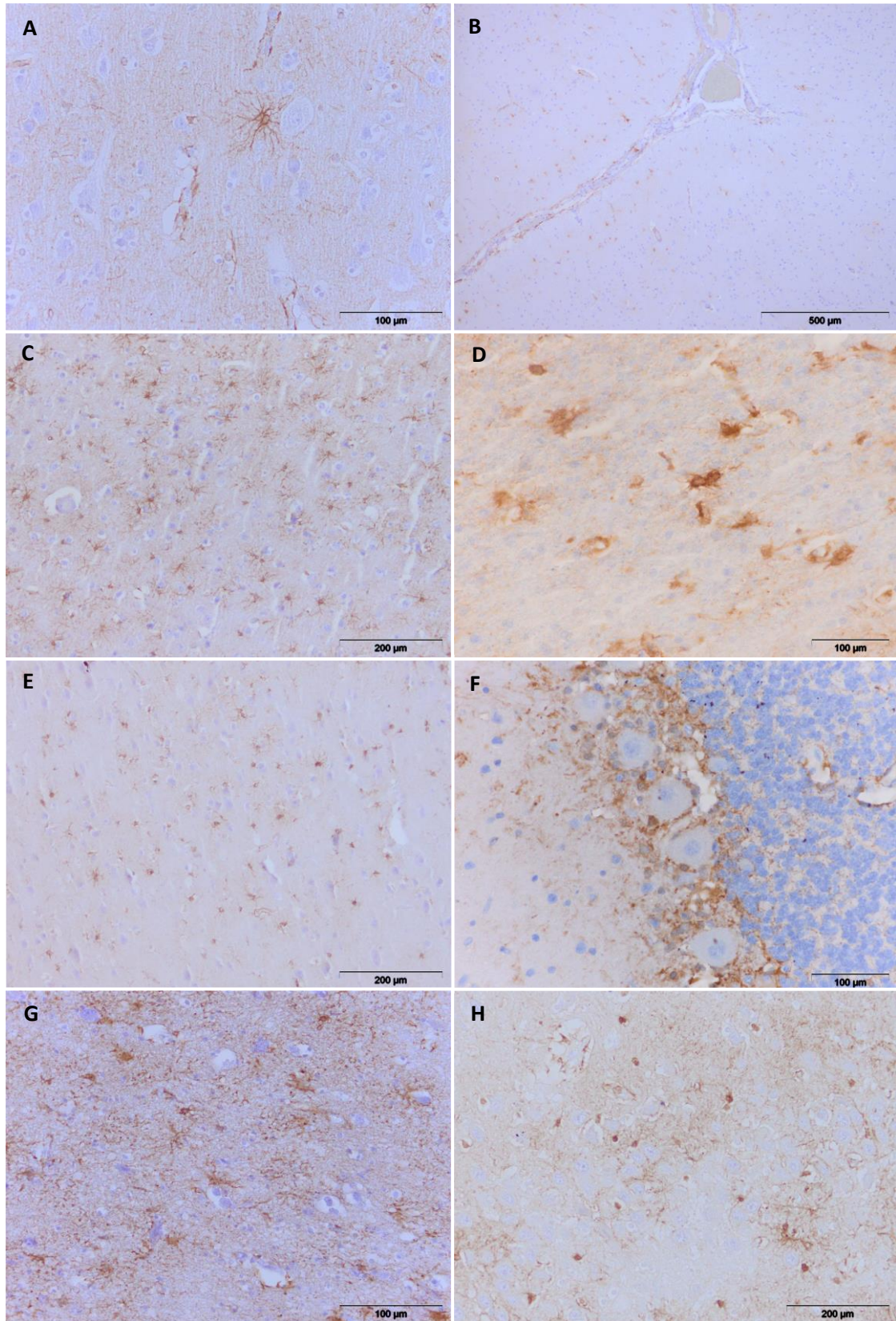
ispitivanog moždanog tkiva pasa na GFAP i metalotionein I i II ustanovljeno je da se češće javlja astroglioza od astrocitoze. Imunohistochemijski pozitivni astrociti na GFAP i metalotionein kod većine pasa su bili otečeni i hipertofisani. U eksperimentalnoj grupi u različitim delovima CNS-a astroglioza je uočena između 80% i 87,5% ispitivanih slučajeva, a astrocitoza između 30% i 37,5% slučajeva. Prethodno pomenute promene su više zahvatile belu supstancu od sive supstance mozga. Zapaženo je, pri imunohistochemijskom bojenju tkivnih isečaka na GFAP i metalotionein I i II, da je intenzitet signala jači kod starijih životinja, odnosno, da su glijane promene intenzivnije kod starijih pasa (Slika 3.).

Rezultati imunohistochemijskog bojenja ispitivanog materijala na GFAP i metalotionein I i II su prikazani na Grafikonu 1. Dobijeni rezultati imunohistochemijskim bojenjem ispitivanog materijala na GFAP ukazuju da je povećan broj pozitivnih astrocita na GFAP kod pasa eksperimentalne grupe u odnosu na broj pozitivnih astrocita kod pasa iz kontrolne grupe. Imunohistochemijski reaktivni astrociti na GFAP nalazili su se u svim ispitivanim segmentima mozga pasa kontrolne i eksperimentalne grupe. Takođe, imunohistochemijski pozitivni signal bio je intenzivniji kod pasa eksperimentalne grupe u odnosu na kontrolnu grupu. U okviru eksperimentalne grupe intenzitet signala bio je proporcionalan sa starošću životinje. GFAP imunohistochemijski reaktivni astrociti su bili uočeni u dubljim slojevima kore frontalnog i parijetalnog dela mozga i u beloj supstanci. Intenzitet pozitivnog imunohistochemijskog signala u beloj supstanci jači je od signala u sivoj supstanci mozga pasa eksperimentalne grupe.

Grafikon 1. Ukupan broj pasa po grupama sa imunohistochemijski reaktivnim astrocitima na GFAP i metalotionein.



U svim ispitivanim segmentima kod obe grupe pasa zabeležena je imunohistochemijska reaktivnost astrocita na metalotionein I i II. U kontrolnoj grupi dobijeni su slični rezultati kao i kod imunohistochemijskog bojenja na GFAP (Grafikon 1.). Znatno manji procenat pasa kontrolne grupe u odnosu na eksperimentalnu grupu je imao pozitivnu imunohistochemijsku reakciju na metalotionein I i II u svim ispitivanim segmentima. Kod pasa eksperimentalne grupe astrociti su bili imunohistochemijski pozitivni na metalotionein I i II u hipokampusu, beloju supstanci i u dubljim slojevima sive supstance (od II do VI sloja) frontalnih i parijetalnih isečaka, u svim slojevima malog mozga i u produženoj moždini. Pozitivna imunohistochemijska reaktivnost astrocita na metalotionein I i II uočena je subprijalno i perivaskularno u svim ispitivanim moždanim segmentima. Pozitivni signal na metalotionein I i II u astrocitima je bio prisutan u citoplazmi i u jedrima kao i u citoplazmatskim produžecima. Pozitivni imunohistochemijski signal na metalotionein I i II je bio intenzivniji kod starijih pasa.



Slika 3. Glijalna reakcija u moždanom tkivu: **A-** GFAP, IHC, frontalni režanj, pas 2 god., **B-** MT, IHC, frontalni režanj, pas 5 god., **C-** GFAP, IHC, frontalni režanj, pas 17 god., **D-** MT, IHC, frontalni režanj, pas 18 god., **E-** GFAP, IHC, parijetalni režanj, pas 16 god., **F-** MT, IHC, mali mozak, 17 god., **G-** GFAP, IHC, parijetalni režanj, pas 16,5 god., **H-** MT, IHC, hipokampus, pas 14 god.

Statističkom analizom dobijenih rezultata imunohistohemijским bojenjem tkivnih preparata na GFAP i metalotionein I i II utvrđivana je statistička značajnost između kontrolne i eksperimentalne grupe pri čemu je korišćen X^2 (Hi kvadrat) test. Ustanovljene p vrednosti u X^2 testu su prikazane u Tabeli 2.

Tabela 2. Rezultati X^2 testa za imunohistohemijско bojenje na GFAP i MT I i II u svim ispitivanim segmentima

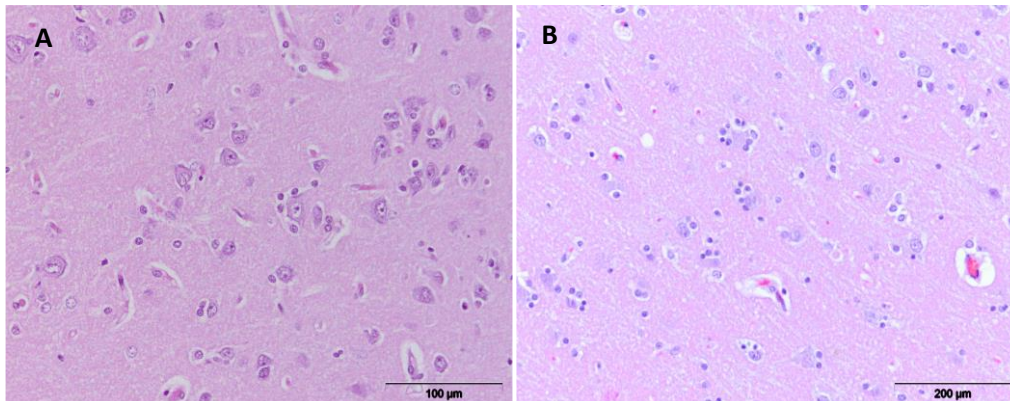
Ispitivane regije CNS-a	P vrednost X^2 testa (GFAP)	P vrednost X^2 testa (MT I/II)
Frontalni režanj	0,0098	0,0098
Parijetalni režanj	0,01982	0,01982
Hipokampus	0,01982	0,0098
Mali mozak	0,2213	0,2213
Produžena moždina	0,1736	0,1736

Statističkom analizom dobijenih imunohistohemijских pozitivnih signala na GFAP i MT I i II u frontalnim reznjevima mozga pasa kontrolne (2 od 6 pasa) i eksperimentalne grupe (25 od 30 pasa) utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika ($p < 0,01$). Takođe, za oba antitela statističkom analizom utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika za parijetalni režanj ($p < 0,05$) i hipokampus (GFAP - $p < 0,05$; MT - $p < 0,01$). Upotrebom X^2 testa utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika ($p > 0,05$) između dobijenih rezultata imunohistohemijским bojenjem na GFAP i MT I i II malog mozga i produžene moždine kontrolne i eksperimentalne grupe.

5.4.2. Satelitoza i neuronofagija

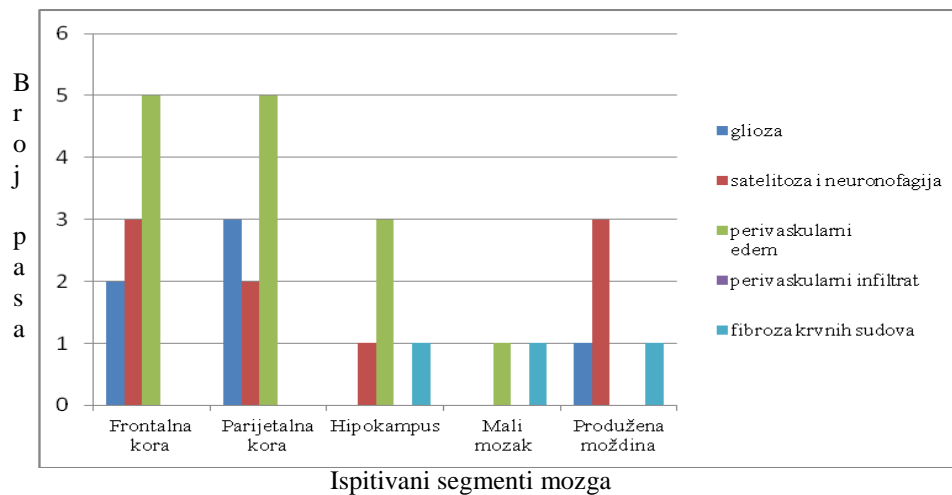
U ispitivanom materijalu pasa iz kontrolne grupe uočen je manji broj sitnih fokusa satelitoze i neuronofagije (Slika 4.) u frontalnoj kori i produženoj moždini kod tri psa, u parijetalnoj kori kod dva psa, a u hipokampusu jednog psa (Grafikon 2.). Frontalna kora pasa eksperimentalne grupe je deo CNS-a u kome se u najvećem procentu (76,67%) javljaju satelitoza i neuronofagija. U malom mozgu nisu zapaženi

satelitoza i neuronofagija, dok su u ostalim delovima (parijetalna kora, hipokampus i produžena moždina) ove promene bile prisutne (Grafikon 3.).

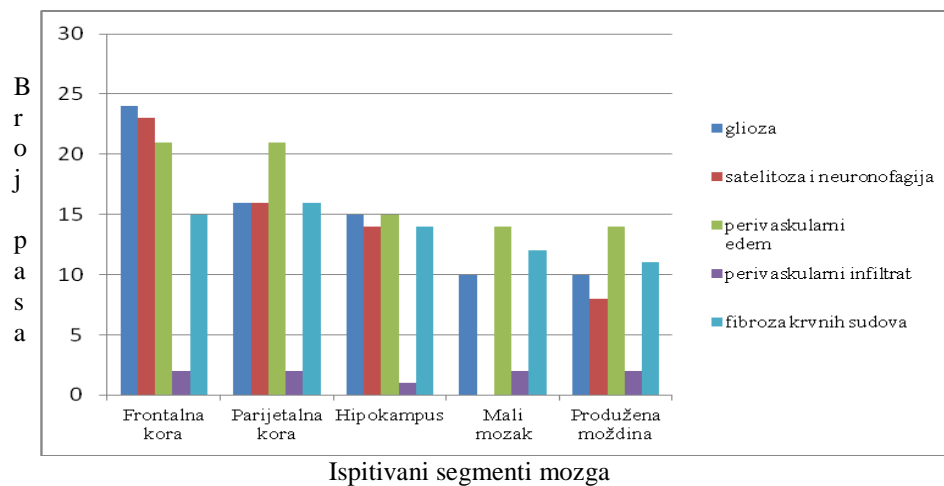


Slika 4. **A-** satelitoza i neuronofagija, HE, parijetalni režanj, pas 2 god., **B-** satelitoza i neuronofagija, HE, frontalni režanj, pas, star 13 god.

Grafikon 2. Patohistološke promene u ispitivanim segmentima mozga pasa kontrolne grupe.



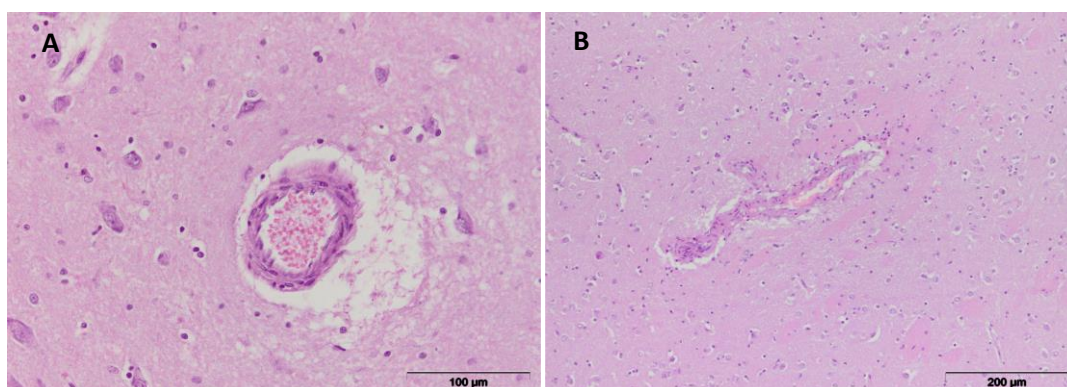
Grafikon 3. Patohistološke promene u ispitivanim segmentima mozga pasa eksperimentalne grupe.



5.5. PROMENE NA KRVNIM SUDOVI

5.5.1. Fibroza zida krvnih sudova mozga

Na krvnim sudovima mozga uočene su sledeće promene: fibroza, perivaskularni edem, perivaskularni ćelijski infiltrat i depoziti amiloida. Fibroza zida krvnih sudova je ustanovljena kod jednog psa (16,67%) iz kontrolne grupe u hipokampusu, produženoj moždini i malom mozgu (Grafikon 2.). Kod pasa iz eksperimentalne grupe fibroza zida krvnih sudova je veoma čest nalaz u frontalnoj (70%) i parijetalnoj kori (63,33%) kao i u hipokampusu (66,67%), dok se u manjem procentu javljala u malom mozgu (40%) i produženoj moždini (36,67%). Svi psi sa fibrozom krvnih sudova u moždanom tkivu bili su stariji od 13 godina. Fibrozom su bili zahvaćeni meningealni i parenhimski krvni sudovi, a promena na krvnim sudovima se manifestovala zadebljanjem mišićnog sloja i adventicije (Slika 5.). U većini slučajeva fibroza se razvila podjednako u krvnim sudovima većeg i manjeg dijametra. Lumen zahvaćenih krvnih sudova fibrozom uglavnom nije bio smanjen, ali su primećeni pojedinačni obliterisani krvni sudovi kod pasa starosti preko 16 godina.

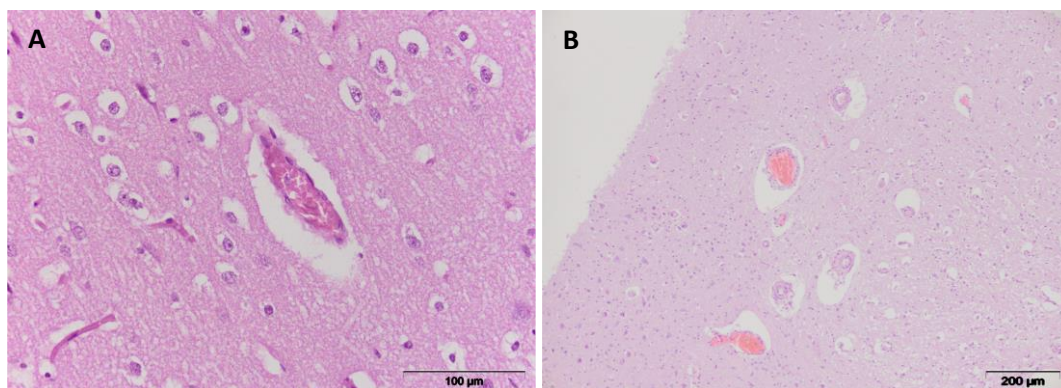


Slika 5. A- fibroza krvnih sudova i perivaskularni edem, HE, parijetalni režanj, pas 2 god., B- fibroza zida krvnog suda, HE parijetalni režanj, pas 12 god.

5.5.2. Perivaskularni edem

Perivaskularni edem je u kontrolnoj grupi veoma često uočavan u frontalnoj i parijetalnoj kori (83,33%, ili kod 5 pasa od ukupno 6). U hipokampusu perivaskularni edem se razvio kod 50% pasa, a u malom mozgu kod 16,67% pasa kontrolne grupe (Grafikon 2.). U produženoj moždini pasa iz ove grupe nije dijagnostikovao perivaskularni edem. Kod pasa eksperimentalne grupe zapaženo je da se perivaskularni edem javljao u svim ispitivanim segmentima mozga (Grafikon 3.). Takođe, uočeno je

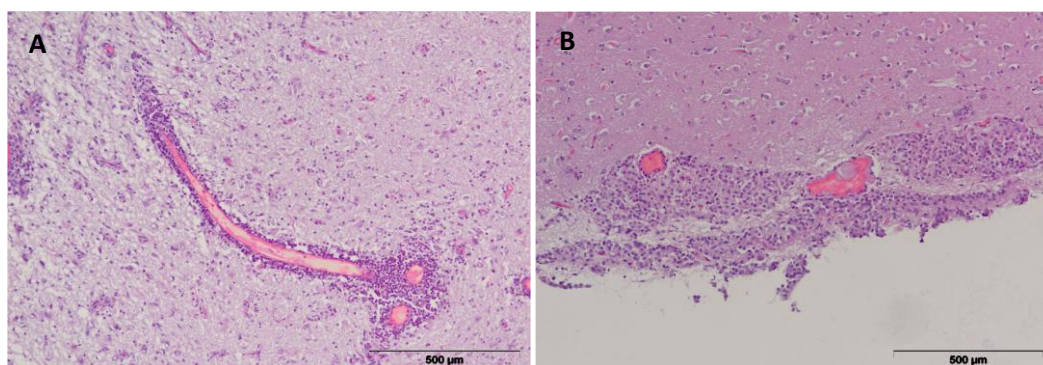
prisustvo perivaskularnog edema i kod mlađih i starijih pasa iz ove grupe, tj. da razvoj ove promene ne zavisi od starosnog doba jedinke (Slika 6.). Perivaskularni edem je najčešći nalaz u frontalnoj i parijetalnoj kori (70%), dok je u drugim ispitivanim segmentima nešto ređe zapažen (hipokampus - 50%, mali mozak i produžena moždina - 46,67%).



Slika 6. **A-** perivaskularni edem, HE, frontalni režanj, pas 5 god., **B-** perivaskularni edem, HE parijetalni režanj, pas, star 12 god.

5.5.3. Perivaskularni infiltrat

Perivaskularni ćelijski infiltrat u mozgu pasa kontrolne grupe nije dijagnostikovao (Grafikon 2.), dok je prisutan kod tri psa (10%) iz eksperimentalne grupe (Grafikon 3.). Mononuklearni ćelijski infiltrat oko krvnih sudova bio je prisutan u svim ispitivanim segmentima moždanog tkiva kod jednog psa starosti 13 godina. Kod psa starosti 16,5 godina perivaskularni infiltrat je dijagnostikovao samo u frontalnoj kori, dok je kod trećeg psa takođe, starog 13 godina, dijagnostikovao u parijetalnoj kori, malom mozgu i produženoj moždini. Oko meningealnih i parenhimskih krvnih sudova u istoj meri razvili su se ćelijski mononuklearni infiltrati kod sva tri psa (Slika 7.).



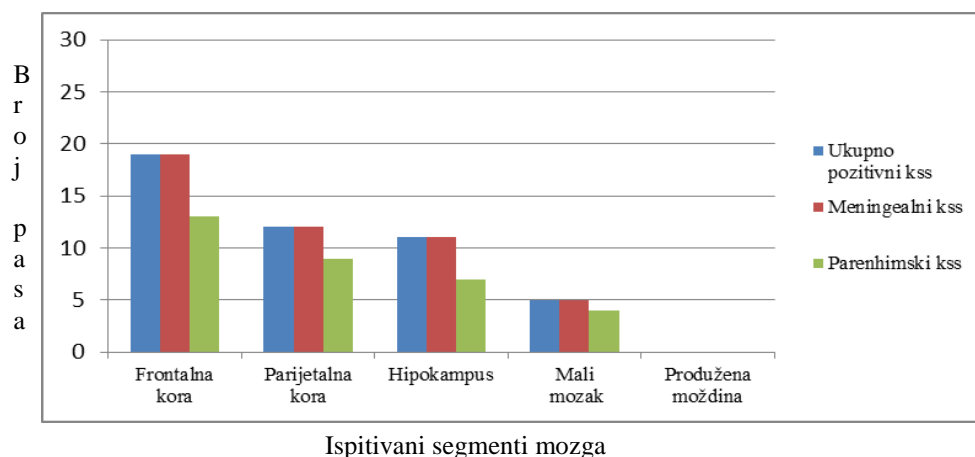
Slika 7. **A-** perivaskularni infiltrat u moždanom tkivu, HE, parijetalni režanj, pas 13 god., **B-** perivaskularni infiltrat u moždanici, HE parijetalni režanj, pas, star 13 god.

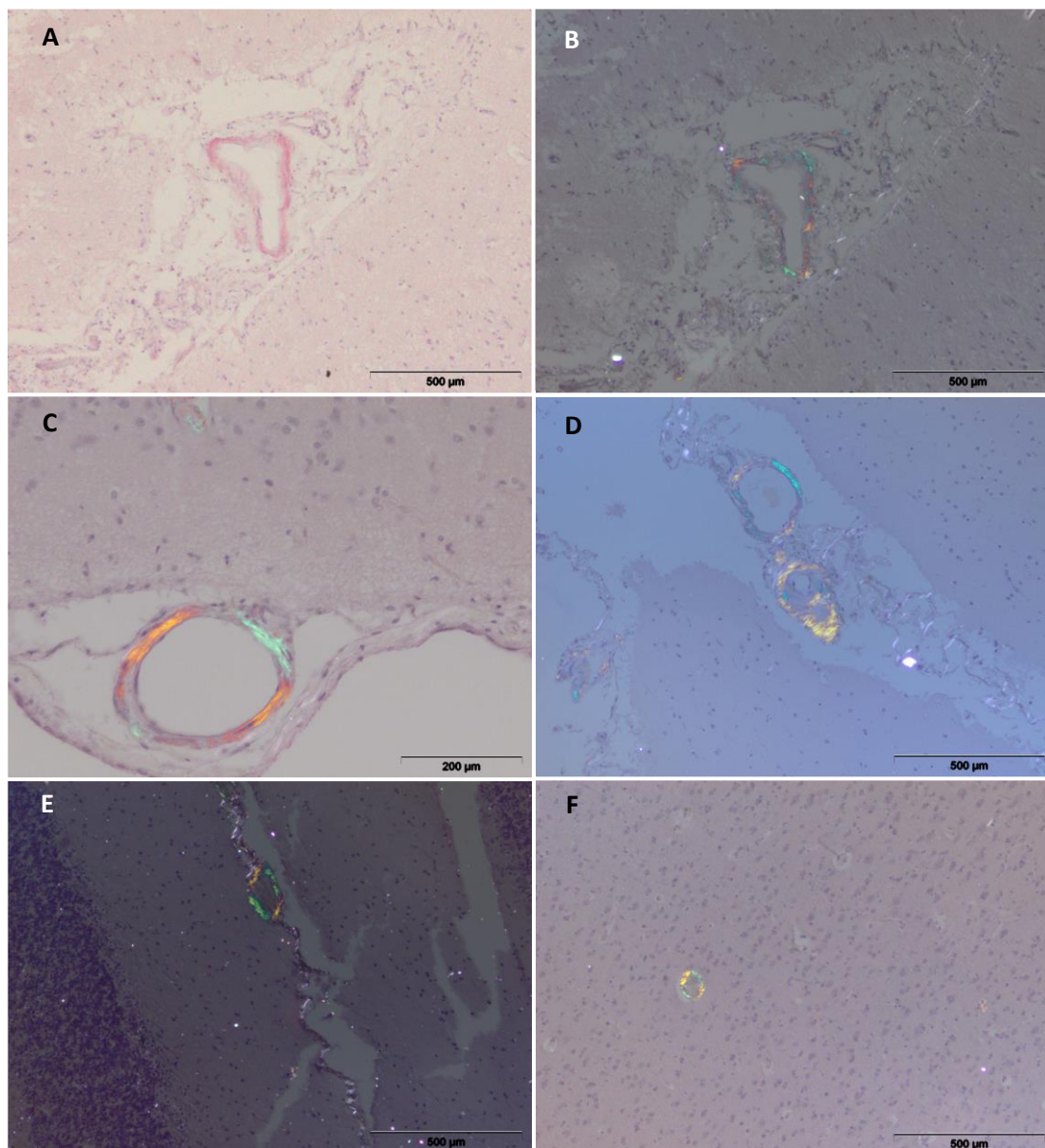
5.6. AMILOID

Prisustvo depozita amiloida u moždanom tkivu pasa dokazivano je histochemijskim bojenjem kongo crvenim (Slika 8.) i imunohistochemijskim bojenjem (Slika 9.). U mozgu pasa kontrolne grupe prisustvo amiloida nije dokazano ni jednom tehnikom, ni kod jednog psa, sem kod psa starog 5 godina u epitelnim ćelijama horioidnog pleksusa lateralne komore. Međutim, u mozgu pasa eksperimentalne grupe amiloid je dokazan bojenjem kongo crvenim i imunohistochemijskom tehnikom. Depoziti amiloida su bili prisutni u zidu moždanih krvnih sudova i u moždanom parenhimu. Većina pasa (63%), kod kojih je dokazano prisustvo amiloida u parenhimu moždanog tkiva, bili su stariji od 15 godina.

Metodom bojenja kongo crvenim dokazano je prisustvo amiloida kod pasa eksperimentalne grupe u zidu meningealnih i parenhimskih krvnih sudova u svim ispitivanim segmentima, sem u produženoj moždini. Amiloid u zidu krvnih sudova se obojio kongo crvenim u najvećem procentu 63,33% (19 pasa) u frontalnoj kori, a u najmanjem procentu u malom mozgu 16,67% (5 pasa) (Grafikon 4.). U parijetalnoj kori i hipokampusu amiloid je kongo crvenim dokazan u oko 40% slučajeva. Kod svih pasa, kod kojih je dokazano prisustvo amiloida kongo crvenim, amiloid se nalazio u zidu meningealnih krvnih sudova. U zidu krvnih sudova u parenhimu mozga pasa eksperimentalne grupe amiloid je dokazan u frontalnoj kori kod 13 pasa, parijetalnoj kori kod 9 pasa, hipokampusu kod 7 pasa i u malom mozgu kod 4 psa. Difuzni plakovi u moždanom parenhimu pasa nisu se obojili kongo crvenim.

Grafikon 4. Distribucija amiloida po ispitivanim segmentima u zidu krvnih sudova pasa eksperimentalne grupe (kongo crveno bojenje)





Slika 8. Amiloid u zidu meningealnog krvnog suda, frontalni režanj, kongo crveno, pas 17 god.: **A**- svetlosni mikroskop, **B**- polarizaciona svetlost (žutozelena fluorescencija), **C**- polarizaciona svetlost (žutozelena fluorescencija). **D**- i **E**- Amiloid u zidu meningealnih krvnih sudova malog mozga, kongo crveno, pas 18 god., polarizaciona svetlost (žutozelena fluorescencija). **F**- Amiloid u zidu parenhimskog krvnog suda, kongo crveno, frontalni režanj, pas 17 god., polarizaciona svetlost (žutozelena fluorescencija).

Imunohistochemijski, amiloid je dokazan sa dva antitela: antibeta amiloid (A β 1-14) i antibeta amiloid (A β 1-42). Depoziti amiloida, koji su imunohistochemijski dokazani u moždanom tkivu pasa, ispoljili su se u tri oblika: u zidu krvnih sudova, u difuznim plakovima u parenhimu i intracelularno u neuronima (Grafikon 5.). Primenom A β 1-14 antitelom dokazano je prisustvo amiloida u sva tri oblika nakupina, dok su sa antitelom A β 1-42 dokazani depoziti amiloida u moždanim krvnim sudovima i u

parenhimu u obliku senilnih plakova. Intracelularne nakupine amiloida, koje su dijagnostikovane antitelom A β 1-14, zapažene su u hipokampusu, frontalnoj i parijetalnoj kori kod sedam pasa (Slika 9H). Kod psa starog 17 godina uočene su intracelularne nakupine amiloida u malom mozgu, tj. u pojedinim Purkinijevim ćelijama, koje su davale pozitivan signal pri imunohistohemijskom bojenju sa anti A β 1-14. Neuron, koji su bili pozitivni na amiloid, nisu se nalazili u okviru senilnih plakova već su bili difuzno raspoređeni u njihovoj okolini. Perineuronske promene oko amiloid pozitivnih neurona nisu zapažene. Pet pasa sa dijagnostikovanom intracelularnom amiloidom su bili starosti preko 16 godina, a dva su bila stara 13 godina.

Depoziti amiloida u zidu krvnih sudova su bili prisutni u meningealnim i parenhimskim krvnim sudovima (Slika 9A, B i C). Kod skoro svih pasa sa cerebrovaskularnom amiloidozom, amiloid je bio deponovan u zidu u obe grupe krvnih sudova, tj. u meningealnim i parenhimskim krvnim sudovima. Mali broj pasa je imao deponovan amiloid isključivo u meningealnim krvnim sudovima, dok ni kod jednog psa nije ustanovljeno prisustvo amiloida samo u parenhimskim krvnim sudovima. Amiloid je deponovan u mišićnom sloju krvnih sudova. U nekim krvnim sudovima depoziti su okruživali u vidu prstena ceo krvni sud, a u nekim su depoziti bili isprekidani. Prisustvo oba pomenuta oblika deponavanja amiloida u krvnim sudovima u ispitivanim delovima moždanog tkiva mogla su da se uoče zajedno ili pojedinačno. Oko krvnih sudova sa depozitima amiloida nije uočena ćelijska reakcija ni u jednom slučaju.

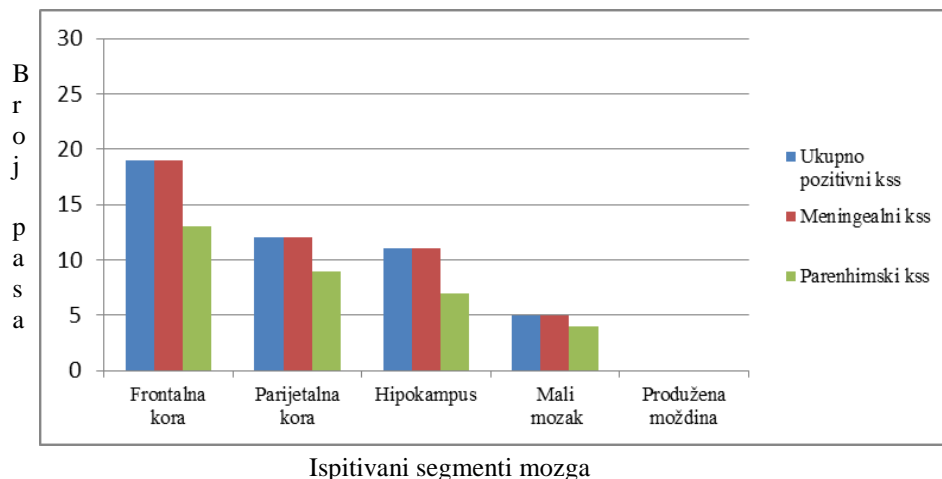
Depoziti amiloida nisu dokazani u krvnim sudovima produžene moždine, dok su u ostalim ispitivanim segmentima mozga imunohistohemijski dijagnostikovani. Regije koje su najfrekventnije zahvaćene cerebrovaskularnom amiloidozom su na prvom mestu frontalna kora, pa zatim slede parijetalna kora i hipokampus i na kraju je mali mozak kao deo mozga sa najmanjom frekvencom pojave depozita amiloida u krvnim sudovima. U menigealnim krvnim sudovima prisustvo depozita amiloida je dokazano u frontalnoj regiji kod 21-og psa (70%), parijetalnoj regiji kod 16 pasa (53,33%), hipokampusu kod 15 pasa (50%) i u malom mozgu kod 5 pasa (16,67%). Amiloid je dijagnostikovao u parenhimskim krvnim sudovima mozga u frontalnoj kori kod 70% pasa, u parijetalnoj kori i hipokampusu kod oko 50% pasa i u malom mozgu kod 13,33% pasa eksperimentalne grupe.

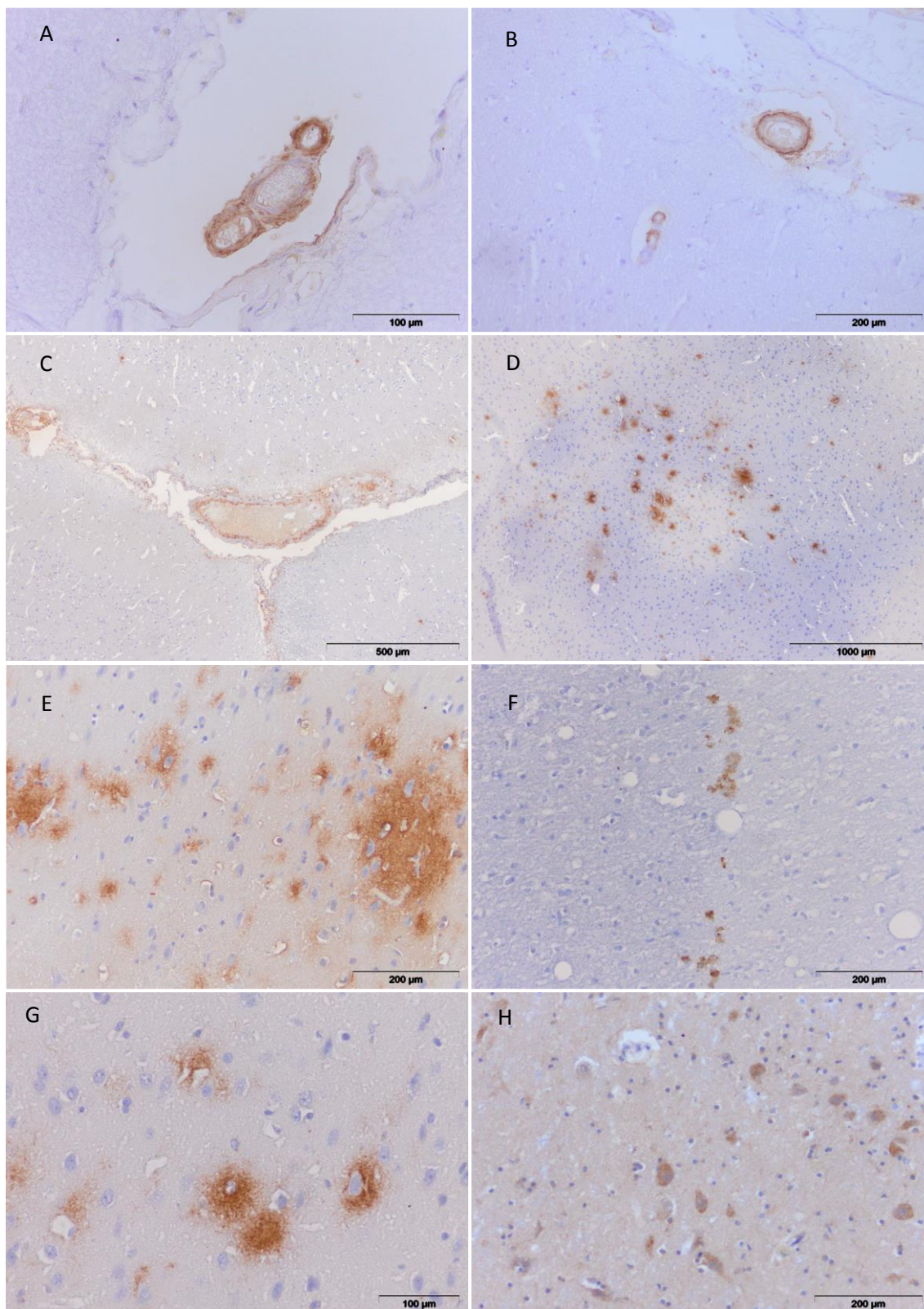
Depoziti amiloida u obliku difuznih plakova u mozgu pasa dokazani su sa oba antitela (Grafikon 4). Tako je 19 pasa (63,33%) bilo imunohistohemijski pozitivno na difuzne plakove sa A β 1-14, a 18 pasa (60%) sa A β 1-42. Difuzni plakovi su se uočavali kao fibrilarne strukture u okviru kojih su mogli ponegde da se uoče „zarobljeni“ neuroni očuvane građe. Neuroni u okviru difuznih plakova su bili negativni na β amiloid (Slika 9D, E, F i G).

Imunohistohemijski pozitivni signal difuznih plakova je varirao u intenzitetu od slabog do jako intenzivnog. Uočeno je, da je pozitivni signal difuznih plakova, kao i depozita u krvnim sudovima, bio jačeg intenziteta pri imunohistohemijskom bojenju sa A β 1-42. Pozitivni signali difuznih plakova sa oba antitela su detektovani u sivoj masi frontalnog i parijetalnog režnja i u molekularnom sloju hipokampusa. Ipak, frontalna kora je regija mozga koja je najčešće zahvaćena ovom promenom. U segmentima mozga u kojima je dijagnostikovano amiloid, plakovi su bili različitog oblika i veličine od malih pojedinačnih jasno ograničenih, do velikih nejasno ograničenih, sastavljenih od više manjih plakova (Slika 9D, E, F i G). U zavisnosti od stepena razvijenosti promena u frontalnoj i parijetalnoj kori plakovi su mogli da se uoče od površnih slojeva pa skroz do dubokih slojeva sive supstance. Zapaženo je, da su se masivniji depoziti u dubljim slojevima javljali kod starijih pasa iz eksperimentalne grupe.

Amiloid u difuznim plakovima dokazan sa A β 1-14, uočen je u frontalnoj kori kod 19 pasa (63,33%), u parijetalnoj kori kod 16 pasa (53,33%), i u hipokampusu kod 13 pasa (43,33%), dok je sa A β 1-42 dokazan u frontalnoj kori kod 18 pasa (60%), parijetalnoj kori 15 pasa (50%), i hipokampusu kod 14 pasa (46,67%).

Grafikon 5. Rezultati imunohistohemijskog bojenja na amiloid po ispitivanim segmentima

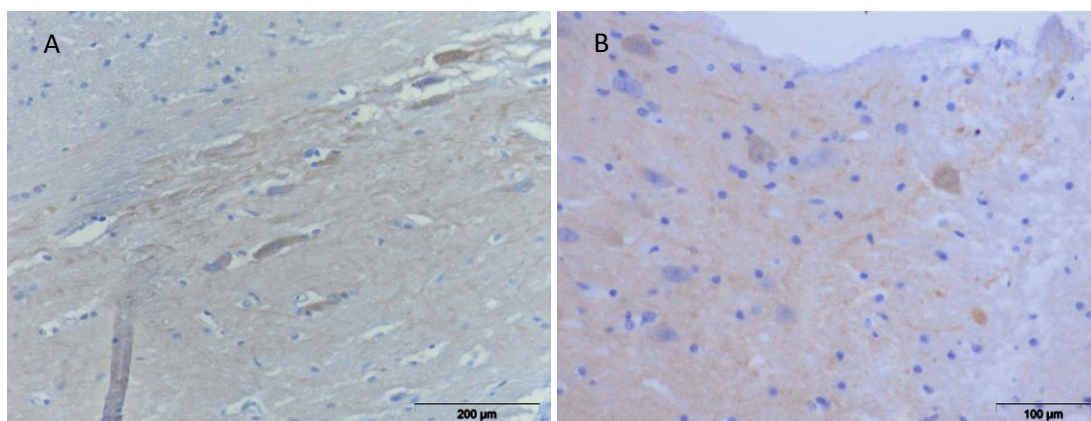




Slika 9. Aβ1-42 u frontalnom režnju, IHC: **A-** u zidu meningealnih krvnih sudova, pas 17 god., **B-** u zidu meningealnih i parenhimskih krvnih sudova, pas 17 god., **C-** u difuznom plaku i u zidu meningealnih krvnih sudova, pas 15god., **D-** u difuznim plakovima, pas 15 god., **E-** u difuznim plakovima, pas 15 god. Aβ1-42 u parijetalnom režnju, IHC, **F-** u difuznim plakovima, pas 12 god., **G-** u difuznim plakovima, pas 15 god., **H-** Aβ1-14 u neuronima parijetalnog režnja, IHC, pas 12 god.

5.7. AMILOID PREKURSOR PROTEIN (APP)

Za dokazivanje prisustva APP korišćeno je poliklonsko antitetelo (C terminus, C99), koje se vezuje od 85. do 99. aminokiseline u polipeptidnom lancu amiloid prekursor proteina. Imunohistohemijskim bojenjem, prisustvo APP dokazano je samo u neuronima (Slika 10.), dok u zidu krvnih sudova i senilnim plakovima APP nije dokazan. Pozitivni signal u neuronima se javljao perinuklearno u telu neurona kao i njihovim produžecima (aksonima i dendritima). Primećeno je, da je pozitivni signal pri imunohistohemijskom bojenju na APP intenzivniji kod starijih pasa.



Slika 10. **A-** APP u neuronima i nervnim produžecima, IHC, parijetalni režanj, pas 12 god., **B-** APP u neuronima i nervnim produžecima, IHC, parijetalni režanj, pas 17 god.

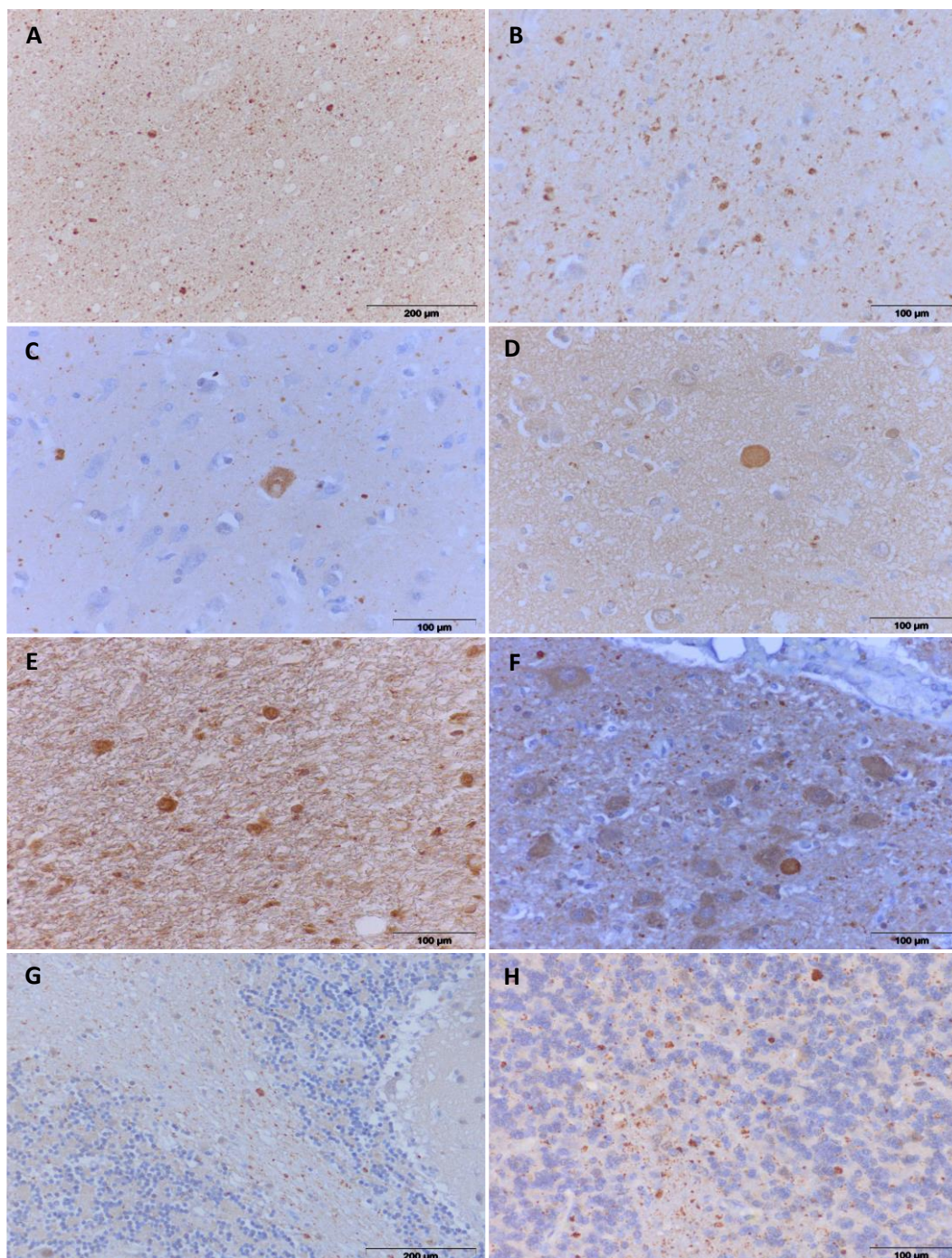
5.8. TAU PROTEIN

Za imunohistohemijsko ispitivanje eventualnog prisustva patoloških nakupina fosforilisanog tau proteina u neuronima korišćeno je poliklonsko antitelo za humani tau protein. U ispitivanim segmentima mozga pasa kontrolne i eksperimentalne grupe imunohistohemijskim bojenjem sa antitelom za humani tau protein nije dokazano prisustvo patoloških nakupina fosforilisanog tau proteina.

5.9. UBIKVITIN

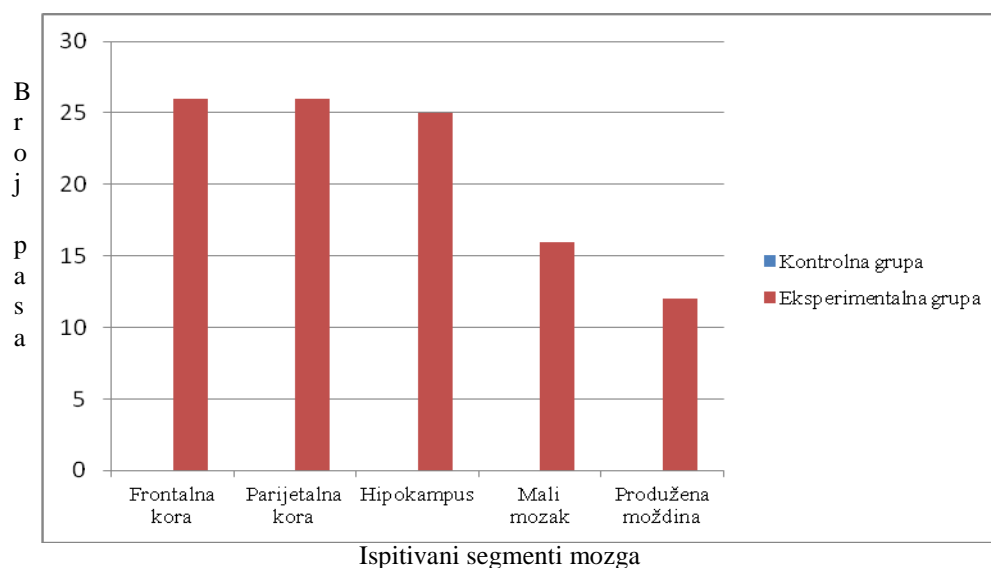
Prisustvo ubikvitina u tkivnim preparatima dokazivano je primenom imunohistohemijskog bojenja sa primarnim monoklonskim antitelom za ubikvitin (Slika 11.). Pozitivna ubikvitin imunohistohemijska reakcija nije detektovana u tkivnim isečcima mozga pasa kontrolne grupe. U ispitivanim segmentima mozga pasa eksperimentalne grupe u različitom procentu detektovan je pozitivni imunohistohemijski signal na ubikvitin (Grafikon 7.). Ubikvitin pozitivna

imunohistochemijska reakcija ustanovljena je u hipokampusu, frontalnoj i parijetalnoj regiji kod velikog broja pasa eksperimentalne grupe (83-87%). U malom mozgu i produženoj moždini pozitivna imunohistochemijska reakcija na ubikvitin dokazana je kod oko 50% pasa (Grafikon 7.).



Slika 11. Ubikvitin, IHC: **A**- frontalni režanj, bela supstanca, pas 13god., **B**- frontalna kora, pas 15 god., **C**- frontalna kora, pas 14 god., **D**- parijetalna kora, pas 14 god., **E**- hipokampus, pas 14 god., **F**- produžena moždina, pas 18 god., **G**- mali mozak, pas 15 god., **H**- mali mozak, pas 17 god.

Grafikon 7. Grafički prikaz rezultata imunohistohemijskog bojenja na ubikvitin



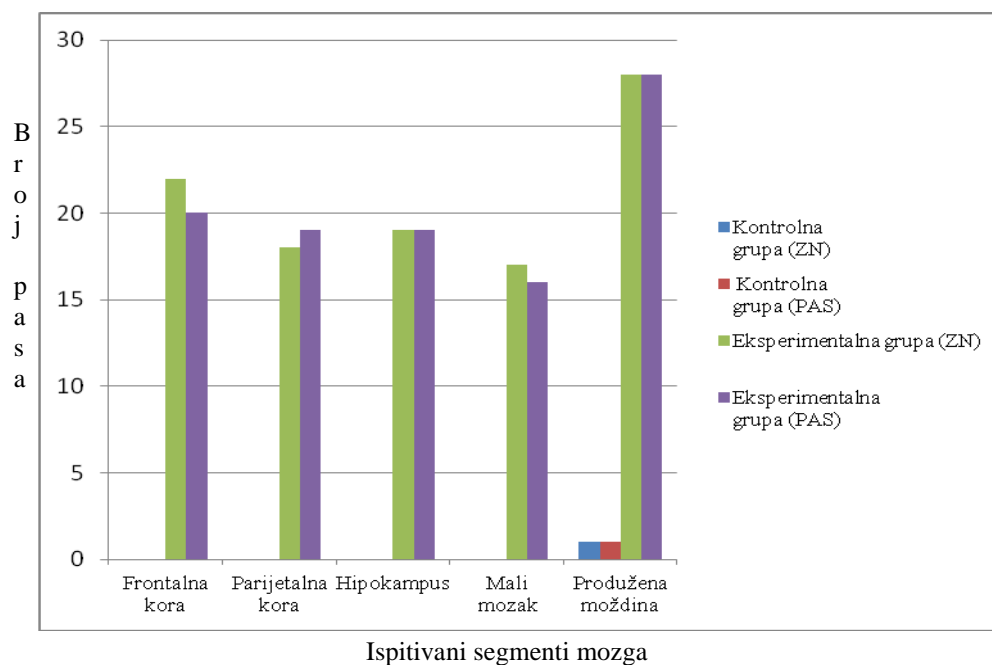
U tkivnim preparatima pozitivna ubikvitin imunohistohemijska reakcija je uočena u obliku granula i globula čija je veličina varirala. Ubikvitinske granule i globule su se nalazile u većoj količini difuzno rasute po celoj beloj supstanci ispitivanih regiona, dok su u sivoj supstanci bile fokalno raspoređene. U beloj supstanci ubikvitinske granule su bile prisutne u citoplazmi glija ćelija kao i u aksonskim vlaknima neurona. Jedra ćelija ispitivanih regiona moždanog tkiva su u pojedinačnim slučajevima bila imunohistohemijski pozitivna na ubikvitin. U sivoj supstanci ubikvitin se nešto češće nalazio u glija ćelijama nego u neuronima. Takođe, u malom mozgu pozitivni signal je bio jačeg intenziteta u beloj supstanci nego u sivoj supstanci, u kojoj su se najčešće nalazili manji fokusi imunohistohemijski pozitivnih ćelija. U produženoj moždini kod 12 pasa dokazana je pozitivna ubikvitin imunohistohemijska reakcija u pojedinim ćelijama, a kod najstarijih pasa eksperimentalne grupe fokalno su uočene grupe pozitivnih neurona. Primećeno je, takođe, da je imunohistohemijska reaktivnost ubikvitina bila intenzivnija kod veoma starih pasa eksperimentalne grupe u odnosu na pozitivnu imunohistohemijsku reakciju kod mlađih pasa iz ove grupe.

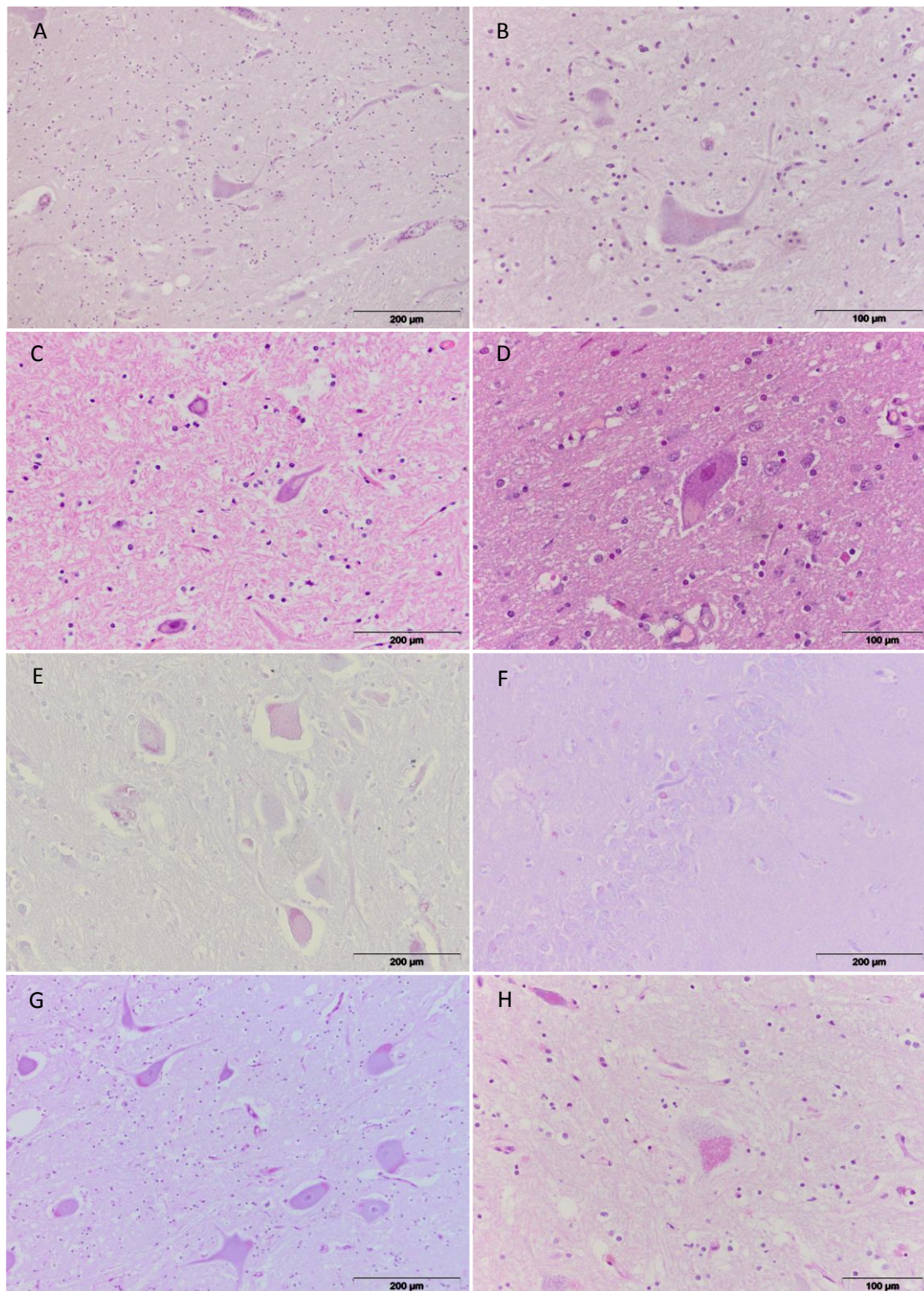
5.10. LIPOFUSCIN

Na preparatima bojenim hematoksilin-eozin metodom lipofuscin ima granularnu strukturu koja je svetložute do smeđe boje i lako se razlikuje od ružičaste boje citoplazme. U citoplazmi neurona granule lipofuscina zajedno grade vrećastu strukturu u okviru koje su zbijene jedne do drugih. Od specifičnih bojenja za dokazivanje

prisustva lipofuscina u neuronima korišćene su modifikovana metoda *Ziehl Neelsen* i PAS metoda. Lipofuscin je dokazan samo u nekoliko velikih neurona produžene moždine kod jednog psa iz kontrolne grupe (Slika 12A i B), a bio je deponovan u maloj količini u citoplazmi pravilno raspoređen oko jedra u vidu finih granula, koje su se PAS bojenjem obojile karmin crveno. Količina lipofuscina u mozgu pasa eksperimentalne grupe bila je znatno veća (Slika 12C, D, E i F, G i H). U svim ispitivanim segmentima moždanog tkiva u različitim procentima dokazane su nakupine lipofuscina u neuronima, a granule lipofuscina su smeštene perinuklearno kao i u dendritskom „stablu“ i aksonskom „brežuljku“. Primenom obe metode specifičnog bojenja na lipofuscin, kod skoro svih starijih pasa od deset godina prisustvo pigmenta je dokazano u krupnim neuronima pojedinih jedara produžene moždina kod 28 pasa (93,33%). Pored produžene moždine u svim ostalim ispitivanim segmentima, ustanovljeno je prisustvo lipofuscinskih granula u neuronima pasa eksperimentalne grupe modifikovanom metodom *Ziehl Neelsen* (56%-74%), kao i PAS metodom bojenja (60% - 76%) (Grafikon 6.).

Grafikon 6. Distribucija lipofuscina po ispitivanim segmentima (modifikovana *Ziehl Neelsen* i PAS metoda)





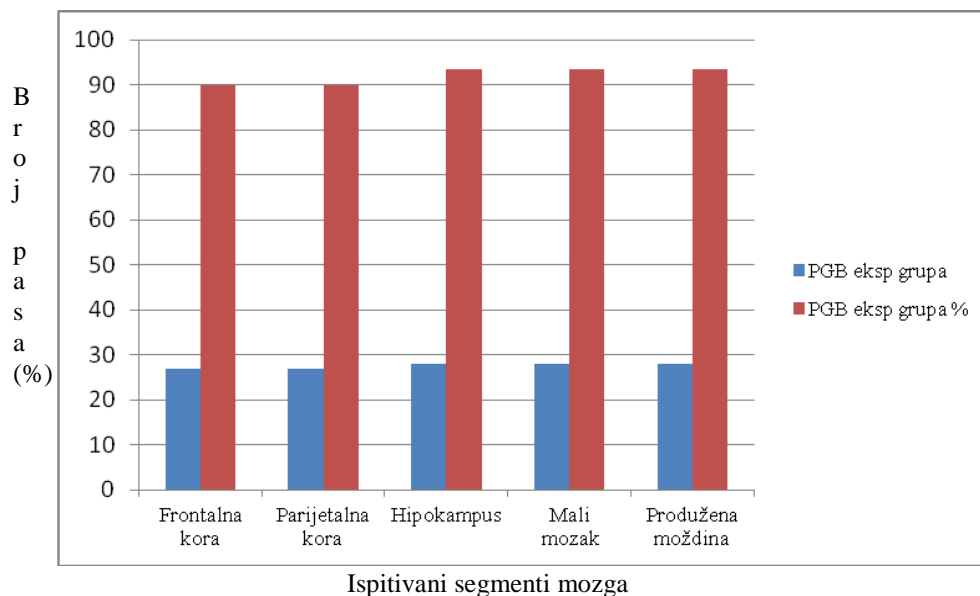
Slika 12. Lipofuscinske granule u neuronima: **A-** produžena moždina, modifikovana *Ziehl Neelsen* metoda, pas 5 god., **B-** produžena moždina, modifikovana *Ziehl Neelsen* metoda, pas 5 god., **C-** parijetalna kora, HE, pas 10 god., **D-** parijetalna kora, HE, pas 14 god., **E-** produžena moždina, modifikovana *Ziehl Neelsen* metoda, pas 12 god., **F-** hipokampus (Amonov rog), modifikovana *Ziehl Neelsen* metoda, pas 18 god., **G-** produžena moždina, PAS metoda, pas 12 god., **H-** produžena moždina, PAS metoda, pas 18 god.

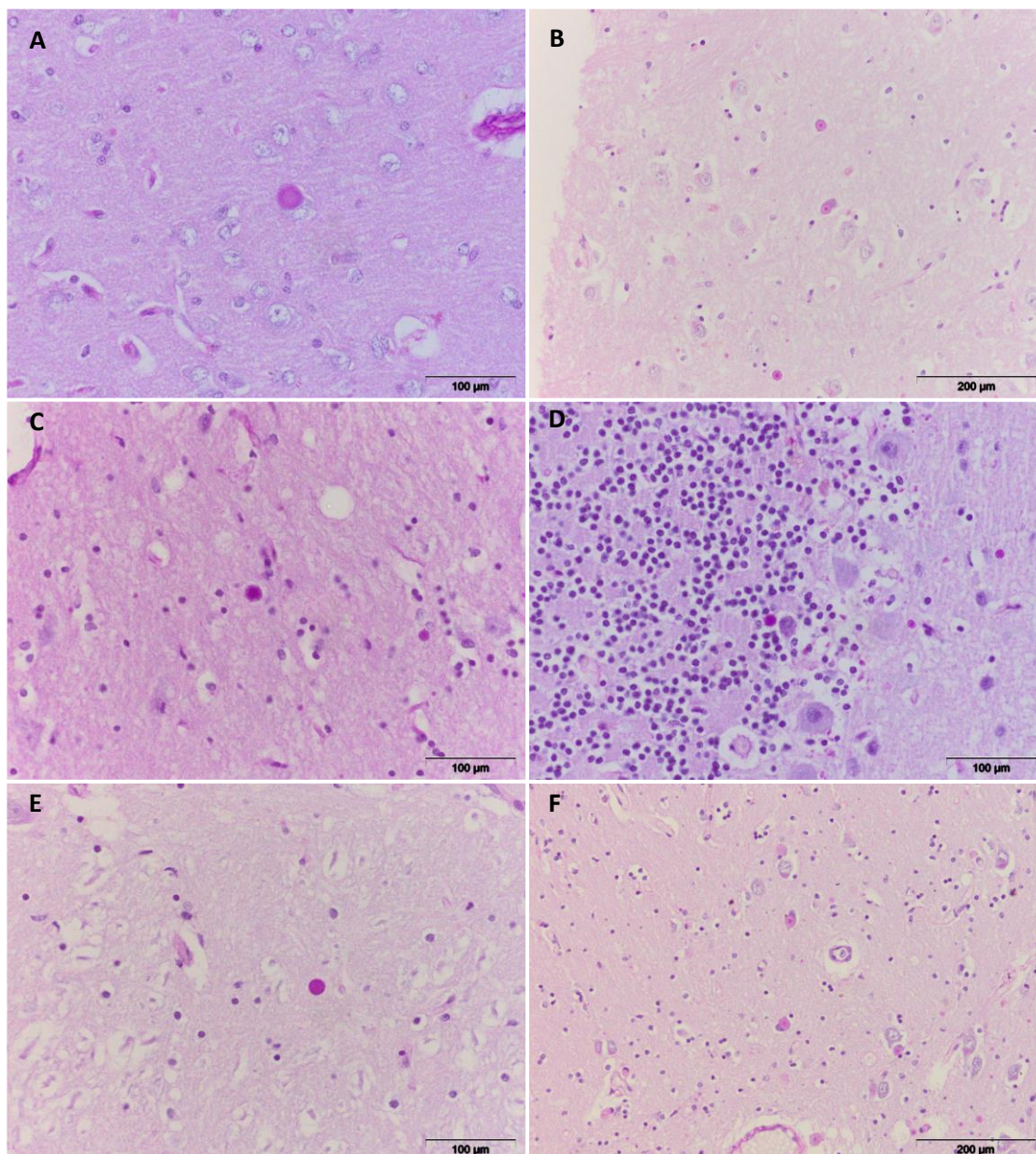
5.11. POLIGLUKOZANSKA TELA

Poliglukozańska tela (*Polyglucosan bodies*, PGB, eng.) ispoljavaju se kao PAS pozitivni sferoidi i uglavnom su uočena u neuropilu. Morfološki ona su izgledala dvojako, u prvom slučaju kao loptaste tvorevine sa centralnim delovima tamnoružičaste do ljubičaste boje oko koga se nalazi svetlo ružičasta do ružičasta halo zona, a u drugom slučaju kao homogeni sferoidi ružičaste boje (Slika 13.).

PGB su dokazana kod skoro svih pasa eksperimentalne grupe, dok u kontrolnoj grupi nisu bila prisutna (Grafikon 8). Prisustvo PGB u svim ispitivanim segmentima pasa eksperimentalne grupe je uglavnom dokazano u neuropilu, a samo u pojedinačnim slučajevima intracelularno. Intracelularno smeštena poliglukozańska tela su uočena u neuronima i glija ćelijama u hipokampusu, parijetalnom režnju i malom mozgu pasa starijih od petnaest godina. Poliglukozańska tela u malom mozgu, frontalnoj i parijetalnoj kori su najčešće lokalizovana u molekularnim slojevima, dok su u produženoj moždini difuzno raspoređena. Uočena je zavisnost između broja prisutnih poliglukozańskih tela i starosti pasa eksperimentalne grupe. Kod starijih pasa je ustanovljeno prisustvo većeg broja poliglukozańskih tela u neuropilu i intracelularno.

Grafikon 8. Grafički prikaz rezultata bojenja PAS metodom na PGB





Slika 13. PAS pozitivna poliglukozańska tela: **A**- intracelularno, frontalni reżanj, pas 18 god., **B**- ekstracelularno i intracelularno, hipokampus, pas 16 god., **C**- ekstracelularno, hipokampus, pas 12 god., **D**- ekstracelularno mali mozak, pas 12 god., **E**- ekstracelularno, produžena moždina, pas 15 god., **F**- intracelularno, parijetalni reżanj, pas 16 god.

6. DISKUSIJA

Makroskopske starosne promene u mozgu životinja u literaturi su mnogo ređe opisivane od promena u vezi sa starenjem kod ljudi. U ovom istraživanju ustanovljeno je da se kod pasa starijih od deset godina javljaju atrofija moždanih vijuga i proširenje moždanih brazda u 16,67% slučajeva, blago proširenje moždanih komora kod 63% pasa i zadebljanje mekih moždanica kod 76% pasa. Iako pojedini autori smatraju da neke makroskopske promene na mozgu, kao što su atrofija moždanih vijuga i proširenje moždanih komora (*Reifinger, 1997., Dimakopoulos and Mayer, 2002.*), nisu u korelaciji sa starosnim histološkim promenama, ipak dobijeni rezultati u ovom ispitivanju upućuju na zaključak da su obe grupe promena u određenoj korelaciji. Najčešće dijagnostikovane makroskopske starosne promene na moždanom tkivu ljudi su cerebralna atrofija i proširenje moždanih komora. Pomenute promene se dovode u vezu sa gubitkom kortikalnih neurona (*Cummings et al., 1996c, Reifinger, 1997., Borrás et al., 1999., Dimakopoulos and Mayer, 2002.*).

Najčešće ustanovljene patohistološke promene su astrogljoza (oko 80%), astrocitoza (oko 35%), satelitoza i neuronofagija (oko 75%). Astrogljoza i astrocitoza su termini, koji označavaju promene na astrocitima, a manifestuju se u prvom slučaju kao hipertrofija i u drugom kao povećanje broja astrocita. Satelitoza i neuronofagija su dva procesa u CNS-u koji prate jedan drugi. Javljaju se kada dođe do oštećenja neurona usled dejstva neke štetne nokse ili promene u perineuronalnoj mikrokolini. Posle narušavanja homeostaze neurona, perineuronska satelit oligodendroglija hipertrofiše i proliferiše, a mikroglija ćelije vrše fagocitozu oštećenih neurona. Dobijeni patohistološki nalazi zajedno sa makroskopskim promenama ukazuju da u moždanom tkivu starijih pasa dolazi do gubitka neurona u značajnijoj meri, a samim tim slabljenja ili prestanka funkcije zahvaćenih delova mozga. Pored toga, u ispitivanju je ustanovljeno da su kod pasa hipokampus, frontalna i parijetalna kora najčešće zahvaćeni patohistološkim promenama, koje ukazuju da dolazi do gubitka neurona. Na osnovu razvijenih promena u pomenutim delovima moždanog tkiva može se očekivati smanjenje kognitivnih sposobnosti starijih pasa slično kao i kod starijih ljudi, kod kojih se razvijaju slične starosne promene u istim segmentima centralnog nervnog sistema. Prethodno navedeno je u skladu sa istraživanjima izvesnog broja autora, koji su

proučavali promene u ponašanju starijih pasa i njihovu povezanost sa pojedinim histološkim promenama u centralnom nervnom sistemu (*Head et al., 2010*). Morfološke promene i promene u ponašanju kod starih pasa, u literaturi se pominju kao oblik senilne demencije *Alzheimer* tipa koja se javlja kod pasa (*canine counterpart of the senile dementia of the Alzheimer type, ccSDAT, eng.*) (*Rofina et al., 2003., Rofina et al., 2006.*). Takođe, treba napomenuti da je selektivan gubitak neurona tokom procesa starenja kod različitih životinjskih vrsta u literaturi veoma retko opisivani (*Borras et al., 1999.*).

Tokom starenja javljaju se i promene na krvnim sudovima moždanog tkiva, koje mogu bitno da utiču na vitalnost neurona i glija ćelija, a samim tim i na očuvanost građe i funkcije centralnog nervnog sistema. Promene na krvnim sudovima mogu da se jave perivaskularno, u samom zidu ili u lumenu krvnog suda. U procesu starenja najznačajnije i najčešće su promene u samom zidu moždanih krvnih sudova, usled čije pojave može doći do promene u propustljivosti, ovim procesom se narušava normalan dotok glukoze i kiseonika do neurona i glija ćelija, tako da hipoksija i nedostatak hranljivih materija dovodi do oštećenja ćelija (*Dimakopoulos and Mayer, 2002.*).

Fibroza zida cerebralnih krvnih sudova u ovom ispitivanju je bila veoma čest nalaz kod starijih pasa (do 70% pasa iz eksperimentalne grupe). Rezultati ispitivanja po pojedinim delovima ukazuju da je fibroza zida cerebralnih krvnih sudova najizraženija u frontalnom režnju (70%) zatim hipokampusu (66,67%), i parijetalnom režnju (63,33%). Takođe, zapaženo je da se fibroza krvnih sudova javila kod svih pasa starijih od 13 godina, što navodi na zaključak da ova promena na krvnim sudovima nastaje u procesu starenja.

Kod malog broja pasa iz eksperimentalne grupe, tj. samo kod najstarijih pasa (starijih od 16 godina), lumen pojedinih moždanih krvnih sudova zahvaćenih fibrozom bio je sužen. Za razliku od ljudi, aterosklerotične promene na krvnim sudovima starih pasa se ređe uočavaju (*McGavin and Zachary, 2007*). Nalaz malog broja suženih krvnih sudova samo kod veoma starih pasa, sugeriše da se tokom procesa starenja značajno ne smanjuje lumen krvnih sudova, ali da oštećenje zida krvnih sudova dovodi do slabije perfuzije, oksidativnog stresa i stvaranja slobodnih radikala, koji oštećuju ćelijske elemente u moždanom tkivu.

Prema nekim autorima lumen moždanih krvnih sudova kod starih pasa uglavnom je očuvan, mada često dolazi do povećanja perivaskularnog prostora (*Dimakopoulos and Mayer, 2002.*). Perivaskularni edem je zapažen u ovom istraživanju kod velikog broja životinja kontrolne i eksperimentalne grupe, što navodi na zaključak da ova promena oko krvnih sudova nije starosno zavisna. Uočeni perivaskularni edem kod pasa obe ispitivane grupe može se javiti i kao posledica agonalnog stanja u kome se životinja nalazi pre uginuća ili nastaje kao posledica eutanazije. Takođe, uočeno je da se perivaskularni edem ne javlja u produženoj moždini pasa ni kod jedne ispitivane grupe.

Nalaz mononuklearnih perivaskularnih infiltrata u moždanicama i u moždanom parenhimu pojedinih pasa eksperimentalne grupe govori najverovatnije o virusnoj infekciji. S obzirom na starost životinja, verovatno se radi o *encephalitis*-u starih pasa (*old dog encephalitis*, eng.), perzistentnoj infekciji modifikovanim virusom štenećaka. Ovaj nalaz se ni u kom slučaju ne može dovesti u vezu sa starošću, ali može izazavati manifestacije koje se klinički mogu zameniti sa promenama u ponašanju, koje nastaju kao posledica starosti.

Nakupljanje amiloida u zidu krvnih sudova je veoma značajna promena, koja se javlja u procesu starenja, a označava se kao cerebralna amiloidna angiopatija (CAA). U humanoj populaciji CAA je uzrokovana depozitima A β i sreće se normalno u procesu starenja, kod pacijenata sa familijarnom CAA i kod skoro svih pacijenata sa *Alzheimer*-ovim oboljenjem (*Vinters et al., 1996., Revesz et al., 2002., Kumar-Singh, 2008.*). U ovom ispitivanju je ustanovljena akumulacija amiloida u zidu cerebralnih krvnih sudova kod 70% pasa starosti preko 10 godina, na osnovu čega se može pretpostaviti da je ova promena starosno zavisna.

Amiloid se nakuplja u mišićnom sloju leptomeningealnih i parenhimskih krvnih sudova. Smatra se da A β akumuliran u zidu cerebralnih krvnih sudova ima toksično dejstvo na vaskularne elemente, pa endotelne ćelije, a isto tako periciti, podležu degeneraciji (*Farkas and Luten, 2001., Kumar-Singh et al. 2002.*). Na taj način amiloid utiče na propustljivost krvnih sudova, slabiju perfuziju i tako posredno dovodi do oštećenja neurona. Dobijeni rezultati u ovom ispitivanju su pokazali da je kod većine pasa eksperimentalne grupe prisutna CAA i da su ovom promenom bili zahvaćeni

leptomenigealni i parenhimski krvni sudovi istovremeno, a da je kod malog broja pasa ustanovljeno prisustvo amiloida samo u zidu leptomeningealnih krvnih sudova.

Smatra se takođe, da je nastanak CAA kod ljudi povezan sa pojavom demencije. Pored toga što je CAA faktor koji utiče na javljanje dementnosti, predstavlja faktor rizika za nastanak moždanog udara (*Kumar-Singh, 2008*). U ovom ispitivanju nisu uočena krvavljenja u mozgu, mada neki autori navode da su ona u pozitivnoj korelaciji sa CAA (*Revesz et al., 2002., Kumar-Singh, 2008*).

Ekstracelularno nakupljanje amiloida kod senilne demencije tipa Alchajmer ispoljava se u formi amiloidnih plakova, koji se morfološki mogu podeliti u dva tipa, zreli (primitivni i neuritik) i difuzni (*Tekirian et al., 1996.*). Zreli plakovi sastoje se od mreže fibrila, koja se boje kongo crvenim, dok se difuzni ne boje kongo crvenim.

Prisustvo amiloida u moždanom tkivu ispitivanih pasa dokazivano je metodom kongo crveno i imunohistohemijskim bojenjem. Imunohistohemijskim bojenjem na amiloid sa antitelima anti A β 1-14 i anti A β 1-42 ekstracelularne nakupine amiloida u mozgu bile su imunohistohemijski pozitivne kod oko 60% pasa eksperimentalne grupe. U nekim slučajevima u okviru plakova mogli su da se uoče neuroni očuvane građe. Ekstracelularne nakupine (plakovi) amiloida u mozgu pasa nisu se obojile metodom kongo crveno, tj. bile su negativne. Dobijeni rezultati u ovom istraživanju bojenjem metodom kongo crveno i imunohistohemijskim bojenjem na amiloid ukazuju da kod starijih pasa nastaju plakovi difuznog tipa, što je u skladu sa literaturnim podacima o plakovima difuznog tipa (*Dimacopoulos and Mayer, 2002., Brellou et al., 2005., Kumar-Singh, 2008.*). Iako se smatra da se zreli plakovi (primitivni i neuritik tip) ne javljaju u mozgu starih pasa, ipak se ne može isključiti mogućnost njihove pojave na šta ukazuju rezultati nekih istraživanja (*Cummings et al., 1993b, Cummings et al., 1996d, Papaioannou et al., 2001., Dimacopoulos and Mayer, 2002.*).

Značajna karakteristika difuznih plakova kod pasa je njihova rasprostranjenost i broj, koji je često jednak ili čak veći od broja plakova u mozgu ljudi obolelih od *Alzheimer*-ove bolesti, a ipak smanjenje kognitivne sposobnosti kod tih pasa može se smatrati kao pre *Alzheimer* faza. Šta više, plakovi kod pasa su često mnogo veći od onih uočenih u mozgu ljudi sa *Alzheimer*-ovim oboljenjem (*Cummings et al., 1993a,*

Dimacopoulos and Mayer, 2002.). U okviru plakova kod ljudi sa *Alzheimer*-ovim oboljenjem postoji glijalna reaktivnost, tj. visok nivo mikroglialne reaktivnosti. Međutim, kod pasa u okviru difuznih plakova nema povećane mikroglialne reaktivnosti, već je uočena astrocitna reaktivnost. Ova slika se menja ukoliko dođe do formiranja zrelijih plakova. Konačno, kod pasa postoji paradoks, koji se odnosi na ćelijski integritet neurona, koji se nalaze u okviru plakova, jer uprkos stavu da je amiloid destruktivan za neurone, u ovim plakovima se mogu naći neuroni očuvanog integriteta. Ovo se možda može objasniti da A β ima neurotoksično dejstvo kada formira zrele plakove, a da je neurotropan u rastvorljivom stanju (*Dimacopoulos and Mayer, 2002.*).

Razlog zbog kog su plakovi u ovom ispitivanju dokazani kod 60% pasa, a ne u većem procentu, može da bude činjenica ta da su eksperimentalnu grupu činili psi različitog rasnog sastava. Poznato je da neke rase pasa imaju kraći životni vek pa bi kod njih trebalo očekivati ranije razvoj starosnih promena nego kod pasa, čiji je životni vek znatno duži. Kod mešanaca i rasa pasa, koji se po svojoj konstituciji svrstavaju u grupu manjih rasa pasa, razvoj starosnih promena u centralnom nervnom sistemu treba očekivati kasnije pa verovatno zbog toga kod tih pasa nije ni dokazano prisustvo senilnih plakova.

Plakovi su dokazani imunohistohemijski u hipokampusu, frontalnoj i parijetalnoj kori, dok u malom mozgu i produženoj moždini njihovo prisustvo nije ustanovljeno. Frontalna i parijetalna kora su češće zahvaćeni ovom promenom od hipokampusa. Ovi nalazi su u skladu sa literaturnim podacima i sa nalazima drugih istraživača, a ukazuju da se kod starijih živih životinja mogu očekivati klinički znaci slabljenja kognitivnih sposobnosti (*Head et al., 1998., Dimacopoulos and Mayer, 2002., Head et al., 2010.*).

Pored ekstracelularnog prisustva amiloida imunohistohemijskim bojenjem sa antitelom A β 1-14, dokazano je njegovo prisustvo i u neuronima. Od sedam pasa, kod kojih je dokazano intracelularno prisustvo amiloida, pet pasa su bili stariji od 16 godina. Takođe, primećeno je da su imunohistohemijski pozitivni neuroni na amiloid bili smešteni u okolini plakova, a ne u samim plakovima. Ovakav nalaz ide u prilog pretpostavci da se jedan deo amiloida stvara u ćeliji pa se zatim najverovatnije procesom egzocitoze transportuje iz ćelije u ekstracelularni prostor, tj. u područje plaka.

Dokazano je da su toksičnije forme amiloida one koje su rastvorljive, kao što su monomeri, dimeri, oligomeri amiloida i zreli fibrili A β 1-40, dok su zreli fibrili A β 1-42 nerastvorljivi i manje neurotoksični. Postoje brojni dokazi da je za formiranje nerastvorljivih agregata amiloida bitan C-terminus (*Soreghan et al. 1994., Bitan et al., 2003., Head et al. 2010., Ahmed et al. 2010.*). Smatra se, da se formiranjem nerastvorljivih agregata amiloida smanjuje njegova neurotoksičnost. Na osnovu toga, može se pretpostaviti da je stvaranje plakova od nerastvorljivih formi amiloida možda jedan vid odbrane organizma od neurotoksičnog delovanja rastvorljivih formi amiloida.

Pored toga što utiče na propustljivost krvnih sudova i tako indirektno oštećuje nervno tkivo, amiloid može direktno da deluje toksično na ćelije centralnog nervnog sistema vezujući se za pojedine receptore na membranama ćelija ili menjanjem arhitekture ćelijskih membrana. Arhitekturu ćelijskih membrana amiloid može dvojako da menja stvaranjem otvora u membranama, koji su slični porama ili da utiče da premeštanje fosfatidilserina na spoljašnju stranu (*Ciccotosto et al., 2011.*). U istraživanjima u određenoj populaciji neurona, utvrđeno je da povećano premeštanje fosfatidilserina na spoljašnju stranu plazma membrane u korelaciji sa povećanjem količine A β vezanog za plazma membranu (*Simakova and Arispe, 2007., Ciccotosto et al., 2011.*). Takođe, smatra se da amiloid u reakciji sa oksido-reduktivno aktivnim metalima može da generiše reaktivne kiseonikove radikale (*reactive oxygen species - ROS, eng.*). Neki autori smatraju da stvoreni slobodni radikali inhibiraju komplekse I i IV u mitohondrijama, zbog čega se oni još u većoj količini stvaraju pa aktiviraju matriks metaloproteinaze 9, koje dovode do izražene ekspresije kaspaza i posledičnog nastupanja ćelijske smrti (*Vargas et al., 2010.*).

Povišen nivo slobodnih radikala dovodi do aktivacije odbrambenih mehanizama za njihovo uklanjanje. Na osnovu ovoga može se pretpostaviti, a i dobijeni rezultati u ovom istraživanju ukazuju na povišen nivo ekspresije metalotioneina I i II, koji učestvuju u odbrambenoj ulozi, tj. u uklanjanju slobodnih radikala u centralnom nervnom sistemu. Ustanovljen je povišen nivo ekspresije metalotioneina prvenstveno u astrocitima. Uočena je povećana reaktivnost astrocita oko samih plakova, a bez promena na drugim glijama ćelijama. Statistički podaci ukazuju da postoji statistička značajnost imunohistohemijski pozitivnih ćelija na metalotioneine I i II i GFAP

pojedinih delova mozga starijih u odnosu na imunohistohemijski pozitivne delove mozga mlađih jedinki. Statistička značajnost postoji u hipokampusu, frontalnoj i parijetalnoj kori starijih pasa u odnosu na pomenute regione mlađih jedinki. Može se smatrati da je ova astrocitna reaktivnost posledica oštećenja neurona i promena na neuronima koje nastaju u procesu starenja (*Borras et al., 1999.*). Zbog razvoja starosnih promena u hipokampusu, frontalnom i parijetalnom režnju, na čije postojanje ukazuje i astrocitna reaktivnost, trebalo bi očekivati smanjenje funkcija, koje su pod kontrolom pomenutih regiona.

Dobijena razlika u intenzitetu imunohistohemijskog pozitivnog signala na metalotioneine I i II u sivoj i beloj supstanci navodi na zaključak da se intenzivnije boje fibrozni astrociti, prisutni uglavnom u beloj supstanci, u odnosu na protoplazmatske, koji se nalaze uglavnom u sivoj supstanci. Takođe, to možda ukazuje na pojačane metaboličke procese pri čemu se povećava koncentracija slobodnih radikala, koji stimulišu aktiviranje odbrambenih mehanizama za neutralisanje i uklanjanje slobodnih radikala, među kojima je pojačana sinteza metalotioneina.

Amiloid prekursor protein (APP) je veoma rašireni transmembranski protein za koji se smatra da ima neurotrofičku i neuroprotektivnu ulogu. Pretoliza ovog proteina nastaje pod dejstvom enzima sekretaza (α , β i γ). Dejstvom β i γ sekretaze na APP nastaje u velikom procentu rastvorojivi A β peptid heliksne strukture, koji se vezivanjem za ganglioziide GM-1 pretvara u nerastvorljivi A β protein, koji ima nabranu β strukturu čijom polimerizacijom nastaju amiloidne fibrile. Proteolitičkim razlaganjem APP pod dejstvom β i γ sekretaza nastaje u manjoj količini nerastvorljivi A β peptid, čijim se ekstracelularnim nakupljanjem formiraju plakovi.

Primećeno je da se ekspresija APP mRNA (*messenger ribonucleic acid*-mRNA, eng.) povećava u neuronima i glija ćelijama nakon oštećenja mozga (*Ramirez et al. 2001.*). Dobijeni rezultati u ovom istraživanju ukazuju da se količina ukupnog APP povećava, što je je u skladu sa mišljenjem pojedinih autora, koji pretpostavljaju da veća količina ukupnog APP dovodi do intenzivnijeg nakupljanja A β . Međutim, ima i suprotnih mišljenja, tako *Pop i sar.* na osnovu dobijenih rezultata u njihovim istraživanjima ukazuju da se ukupna količina APP kod starijih pasa smanjuje u svim

ispitivanim regionima mozga (prefrontalni, parijetalni, okcipitalni korteks i hipokampus) (*Pop et al., 2010.*).

Poznato je da je ubikvitin visoko konzervirani protein, čija je uloga vezivanje za proteine, koji će biti razgrađeni uz pomoć proteazoma. Ubikvitin pored obeležavanja proteina, koji će biti proteolitički razgrađeni, ima druge brojne fiziološke uloge u ćeliji kao što je učesće u mehanizmima reparacije DNK, kontroli ćelijskog ciklusa i odgovoru na stres. Ubikvitin imunohistohemijski pozitivne granule se kod ljudi javljaju u procesu starenja, ali i u nekim neurodegenerativnim oboljenjima kao što su *Alzheimer*-ova bolest, Parkinsonova bolest i bolest motornih neurona (*Borras et al., 1998., Upadhyia and Hegde, 2007.*).

Dobijeni rezultati imunohistohemijskog bojenja na ubikvitin u ovom istraživanju ukazuju da u toku procesa starenja dolazi do oštećenja ćelija centralnog nervnog sistema, pri čemu su u ćelijama intenzivirani proteolitički procesi. Naime, u ovom istraživanju dobijena je pozitivna imunohistohemijska reakcija na ubikvitin kod 83-87% pasa eksperimentalne grupe u hipokampusu, frontalnoj i parijetalnoj regiji i kod 50% pasa produženoj moždini i malom mozgu, dok u kontrolnoj grupi nije bilo pozitivne imunohistohemijske reakcije. Iz ovog se može zaključiti da je količina ubikvitina znatno povećana u ćelijama nervnog sistema kod starijih jedinki. Ovakav nalaz ukazuje na regresivne promene u ovim ćelijama.

Pored prisustva imunohistohemijskog pozitivnog signala u citoplazmi ćelija, on je bio prisutan u jedrima ćelija moždanog tkiva pasa eksperimentalne grupe, a to ukazuje da su neki jedarni proteini bili vezani za ubikvitin ili da su aktivirani mehanizmi reparacije DNK. Na osnovu ovoga može se pretpostaviti da u procesu starenja dolazi do oštećenja DNK i jedarnih proteina čime se narušava funkcionalnost jedra, a samim tim i ćelije.

Tau protein je protein koji se nalazi u neuronima, a ima ulogu u stabilizaciji mikrotubula uključenih u aksonski transport. Fosforilacija tau proteina dovodi do njegovog nakupljanja i formiranja neurofibrilarnih klubadi u ćeliji. U ovom ispitivanju neurofibrilarna klubad nisu dokazana u mozgu pasa što je u skladu sa literaturnim podacima. Neki smatraju da akumulacija fosforilisanog tau proteina izostaje zbog

relativno kratkog životnog veka pasa (*Papaioannau et al., 2001., Yu et al., 2011.*). Pojedini istraživači su mišljenja da se neurofibrilarna klubad stvaraju u dužem vremenskom periodu, a da bi se kod pasa to desilo morali bi da imaju duži životni vek (*Nakayama et al., 2004., Yu et al., 2011.*). Drugi razlog zbog kog se formiraju neurofibrilarna klubad leži u činjenici da kod ljudi postoje brojna mesta fosforilacije u strukturi tau proteina (aminokiseline na pozicijama 189., 194., 202., 205., 207., 231., 262., 396. i 404.). Fosforilacijom aminokiselina u okviru polipetidnog lanca tau proteina stvaraju se helikoidne strukture, koje utiču na formiranje neurofibrilarne klubadi kod ljudi. Međutim, kod pasa se smatra da postoji mali broj mesta u strukturi tau proteina (aminokiseline na poziciji 189., 207. i 396.), gde dolazi do fosforilacije i da je to razlog zbog kog se ne formiraju neurofibrilarna klubad (*Yu et al., 2011.*).

Pored toga, što u brojnim ispitivanjima neurofibrilarna klubad nisu dokazana kod pasa, zapaženo je da se gustina granularnih agregata ubikvitina u aksonima sa mijelinskim omotačem povećava u toku procesa starenja. U ovom ispitivanju je imunohistohemijski pozitivan signal na ubikvitin u aksonskim vlaknima bele supstance bio intenzivniji kod starijih pasa u odnosu na mlađe pse iz eksperimentalne grupe. *Yu i sar.* su dokazali kolokalizaciju ubikvitina i fosforilisanog serina na 396. poziciji u primarnoj strukturi tau proteina (*p-tau 396. Ser., eng.*) kod pasa sa kognitivnom disfunkcijom, na osnovu čega autori smatraju da ubikvitin može imati važnu ulogu u formiranju neurofibrilarne klubadi. Ovi istraživači su ustanovili da je intenzivniji imunohistohemijski pozitivan signal na ubikvitin i p-tau 396. Ser. kod pasa sa kognitivnim disfunkcijama nego kod ljudi sa *Alzheimer*-ovim oboljenjem. Uzimajući u obzir prethodno navedene činjenice, oni smatraju da su psi dobar eksperimentalni model, koji može da se koristi u razjašnjavanju patogeneze *Alzheimer*-ove bolesti kao i za preklinička testiranja terapijskih sredstava, koja bi mogla da se koriste za ranu dijagnozu i lečenje ovog teškog poremećaja ljudi (*Yu et al., 2011.*).

Nakupljanje lipofuscina u dugoživećim postmitotičkim ćelijama predstavlja važnu morfološku promenu procesa starenja organizma. Lipofuscin je prvi put opisan pre jednog veka, ali je u poslednjih nekoliko godina u fokusu brojnih ispitivanja u cilju otkrivanja biohemijskih procesa i patoloških stanja vezanih za proces starenja. Kardiomiociti, epitelne ćelije retine i neuroni su dugoživeće postmitotičke ćelije u

kojima se lipofuscin nakuplja i u kojima je najuočljiviji. Pretpostavlja se da u drugim ćelijama, kao što su ćelije kostne srži, intestinalnog epitela i druge, dolazi do nakupljanja lipofuscina, ali da se njegova količina razređuje zahvaljujući njihovim čestim deobama pa nakupine pigmenta u njima ostaju neuočljive. Treba napomenuti da u brojnim patološkim stanjima dolazi do nakupljanja ceroida (ceroidna lipofuscinoza), ali za razliku od lipofuscina, on se nakuplja ekstracelularno i intracelularno u veoma kratkom vremenskom roku.

Utvrđeno je da lipofuscin uglavnom grade proteini i lipidi, a da u maloj količini sadrži neke ugljene hidrate i jone nekih metala. Proteinsku komponentu lipofuscina čini heterogena grupa belančevina različitog aminokiselinskog sastava. Lipidna komponenta je sačinjena od triglicerida, slobodnih masnih kiselina, holesterola, fosfolipida, dolihola i fosforilisanog dolihola. Ugljenohidratna komponenta predstavlja samo od 4 do 7% sadržaja lipofuscina i to su uglavnom manozna, N-acetil-D-galaktozamin i sijalinska kiselina (*Terman and Brunk, 1998b, Double et al., 2008.*). Od jona metala granule staračkog pigmenta sadrže gvožđe, bakar, cink i mangan, pri čemu se gvožđe nalazi u najvećem procentu (*Jung et al., 2010.*).

Lipofuscin u ćeliji nastaje nepotpunom razgradnjom istrošenih ćelijskih organela, prvenstveno mitohondrija. Mitohondrije pri proizvodnji energije u obliku molekula ATP generišu stvaranje reaktivnih kiseonikovih grupa (*reactive oxygen species* - ROS, eng.). Istrošene i oštećene mitohondrije sa velikom količinom ROS-a se unose u lizosome u obliku makroautofagozoma, gde bi trebale biti u potpunosti razgrađene. Međutim, do potpune razgradnje istrošenih mitohondrija ne dolazi zbog kovalentnog povezivanja proteina uslovljenih većom količinom ROS-u u njima. Uporedo sa ovim procesom u lizozomima se stvaraju nerazgradivi polimeri kao što su hidroksinonenol, malonilaldehid i druge. Ove nerazgradive strukture su osnov za formiranje granula lipofuscina koje svojom količinom mogu da blokiraju normalnu funkciju lizozoma i tako uslovljavaju stvaranje novih količina pigmenta. Ovako objašnjenje je poznato kao hipoteza mitohondrijalno-lizozomska osovina starenja postmitotičkih ćelija (*Brunk and Terman, 2002b*).

Nakupine lipofuscina u neuronima starih jedinki su u literaturi opisane kod mnogih vrsta (*Borras et al., 1999.*). Prisustvo nakupina lipofuscina je dokazano i kod

mladih jedinki, kod kojih se nalaze u manjoj količini u velikim neuronima određenih regija. Iako je ustanovljeno prisustvo lipofuscina kod mlađih jedinki većina ispitivanja su vršena kod starijih jedinki (*Terman et al., 2007.*).

U ovom radu ispitano je prisustvo lipofuscina u nervnim ćelijama u pojedinim delovima centralnog nervnog sistema kod pasa različite životne dobi. Preparati su bojeni hematoksilin eozin metodom i sa dve metode specifičnog bojenja lipofuscina, modifikovanom *Ziehl Neelsen* i PAS metodom. Dobijeni rezultati sa obe metode specifičnog bojenja ukazuju da se lipofuscin nakuplja u najvećoj meri u krupnim neuronima pojedinih jedara produžene moždine, tj. kod 93% pasa je dokazano prisustvo staračkog pigmenta, dok je u ostalim ispitivanim segmentima taj procenat nešto niži. Primenom obe metode specifičnog bojenja na istim segmentima moždanog tkiva dobijena je mala razlika u procentima pozitivnih jedinki na lipofuscin. Modifikovanom metodom *Ziehl Neelsen* procenat pozitivnih jedinki u svim ispitivanim segmentima osim produžene moždine kretao se u rasponu od 56% do 70%, a PAS metodom taj procenat bio je u rasponu od 60% do 76%. Ovo ukazuje da se PAS metoda na lipofuscin pokazala nešto senzitivnija u odnosu na modifikovanu *Ziehl Neelsen* metodu.

Smatra se da PAS pozitivnost lipofuscina potiče od nerastvorljivih lipidnih komponenti, pošto su PAS pozitivne supstance glikolipidi ili glikoproteini (*Benavides et al., 2002.*). Ustanovljeno je, da se intenzitet bojenja lipofuscina sa karbol fuksinom pojačava sa starošću, a razlog za ovu pojavu nije sasvim jasan. Poznato je, da mikobakterije pokazuju acidorezistentnost zbog sadržaja mikolične kiseline, koja ima veliku molekulsku težinu, jer je sastavljena od velikog broja hidroksilovanih masnih kiselina, analogno tome, smatra se da bi pozitivnost lipofuscina na *Ziehl Neelsen* bojenje mogla poticati zbog prisustva polimerizovanih masnih kiselina.

Količina nakupljenog lipofuscina kod pasa eksperimentalne grupe je varirala, ali je najintenzivnije nakupljanje ustanovljeno kod najstarijih pasa, što je u skladu sa literaturnim podacima (*Borras et al., 1999.*). Takođe, količina akumuliranog lipofuscina se razlikovala i po segmentima, a produžena moždina je deo u kome su nakupine bile najobimnije, što se podudara sa navodima drugih autora (*Double et al., 2008.*).

Prema literaturnim podacima konstantan nalaz u centralnom nervnom sistemu starih pasa je prisustvo poliglukozanskih tela ekstracelularno i/ili intracelularno. Pod terminom PGB se podrazumeva više različitih inkluziona tela, koja su uglavnom izgrađena od polimera glukoze (*Borras et al., 1999.*). Pojedini autori smatraju da postoje korpora amilacea, Lafora tela, „tela slična Lafora telima“ i druga poliglukozanska tela. Ovi autori smatraju da se CA nalaze normalno u CNS-u u procesu starenja ljudi, Lafora tela su prisutna u velikom broju intracelularno kod pacijenata sa miokloničnom epilepsijom, a da se „tela slična Lafora telima“ sreću u mozgu kod starih pasa (*Cavanagh, 1999.*). Drugi autori su označili PGB prisutna u astrocitima kao CA, a u neuronima kao Lafora tela. U humanoj populaciji CA i Lafora tela se normalno sreću u mozgu u procesu starenja, dok je njihov broj izrazito povećan kod pacijenata sa *Alzheimer*-ovim oboljenjem ili sa miokloničnom epilepsijom (*Borras et al., 1999., Lohi et al., 2005.*). Takođe, pomenute dve vrste PGB, koja se sreću kod ljudi, dobro su imunohistohemijski definisane. Za razliku od humanih, PGB kod životinja nisu u potpunosti definisani, tj. u brojnim ispitivanjima dobijeni su različiti rezultati (*Borras et al., 1999., Gredal et al., 2003.*). U nekim imunohistohemijskim ispitivanjima na više markera u različitim segmentima moždanog tkiva pasa, dobijene imunohistohemijske pozitivne reakcije su se razlikovale od regije do regije. Zbog toga, neki smatraju da PGB u malom mozgu potiču iz neurona, a da iz ostalih delova mozga mogu poticati iz neurona i glija ćelija (*Gredal et al., 2003.*).

Za dokazivanje poliglukozanskih tela u moždanog tkiva pasa u ovom istraživanju korišćena je PAS metoda. Prisustvo PGB je ustanovljeno kod velike većine (oko 93%) pasa eksperimentalne grupe, dok u kontrolnoj grupi njihovo prisustvo nije dokazano. U svim ispitivanim segmentima moždanog tkiva pasa eksperimentalne grupe su dokazana PGB (od 90% do 93%). Dobijeni rezultati ukazuju da se kod najstarijih jedinki iz eksperimentalne grupe PGB nalaze ekstracelularno i intracelularno, a kod ostalih samo ekstracelularno. Uzimajući u obzir prvenstveno ekstracelularnu lokalizaciju većine PGB u ispitivanim segmentima pasa, ona se ne bi mogla označiti ni kao korpora amilacea ni kao Lafora tela.

Iako pojava PGB u mozgu starih pasa nema za posledicu neke neurološke poremećaje, ipak bi trebalo detaljnije istražiti njihov udeo u kognitivnoj disfunkciji

naročito zbog sličnosti Lafora bolesti ljudi i oboljenja mladih pasa sa epilepsijom i depresijom.

U procesu starenja u nervnom sistemu pasa nastaju brojne promene, koje zahvataju sve činioce nervnog tkiva kao što su neuroni, glija ćelije, krvni sudovi i meninge. Oksidativni stres je jedan od faktora koji utiče na proces starenja, a mozak predstavlja najosetljiviji organ u poređenju sa ostalim tkivima i organima. Ovo proističe iz činjenice da mozak poseduje visok nivo lipida posebno nezasićenih masnih kiselina, visok nivo metabolizma, visok nivo reaktivnih mikroelemenata, što utiče na stvaranje slobodnih radikala koji dovode do peroksidacija masti i oksidacije proteina. Velika količina slobodnih radikala se oslobađa još i putem neurotransmitterske aktivnosti. U procesu starenja usled oksidacije proteina smanjuje se sposobnost neurona da održavaju normalnu neuralnu signalizaciju pri narušavanju sinapsi i integriteta citoskeleta bitnog za intracelularni transport. Usled poremećaja homeostaze centralnog nervnog sistema dolazi i do nakupljanja amiloida intracelularno i ekstracelularno u neuropilu i zidu krvnih sudova, akumulacije lipofuscina, stvaranja poliglukozanskih tela ekstracelularno i intracelularno, formiranja ubikvitinskih granula i globula i dr. Na sve ove promene reaguju glija ćelije, tj. dolazi do prvenstveno astroglioze i u manjem procentu astrocitoze. Značaj svih ustanovljenih promena u mozgu starih pasa za kognitivne disfunkcije ostaje nerazjašnjen i trebalo bi da bude detaljnije ubuduće ispitivan. Svi dobijeni rezultati ukazuju da postoji sličnost između svih opisanih promena u ovom radu sa promenama, koje su opisane kao normalne u procesu starenja ljudi, ali i kod pacijenata sa neurodegenerativnim oboljenjima, kao što je *Alzheimer*-ovo oboljenje, što je još jedan od brojnih dokaza da stari psi predstavljaju veoma dobar animalni model za proučavanje normalnog procesa starenja ili neurodegenerativnih oboljenja. Takođe, buduća istraživanja bi mogla dati odgovor u kojoj meri relativna starost (starost jedinke u odnosu na životni vek rase) utiče na razvoj promena u mozgu i kakav je uticaj tih promena na njihove kognitivne sposobnosti.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu sprovedenih istraživanja i dobijenih rezultata izvedeni su sledeći zaključci:

1. Makroskopske promene u mozgu starih pasa manifestovale su se kao zadebljanje moždanica, atrofija kortikalne supstance i proširenje lateralnih moždanih komora.
2. Patohistološke promene ispoljavale su se u vidu fibroze moždanica i zida krvnih sudova, neuronofagije i satelitoze kao i astrocitoze i astroglioze. Promene su bile najintenzivnije u frontalnoj kori a zatim u parijetalnoj kori i hipokampusu.
3. U meningealnim i parenhimskim moždanim krvnim sudovima metodom bojenja kongo crvenim dokazani su depoziti amiloida, a imunohistohemijski su bili pozitivni na A β 1-14 i A β 1-42.
4. U moždanom parenhimu starih pasa amiloid se nakuplja u vidu plakova i intracelularno. Amiloid u plakovima je bio imunohistohemijski pozitivan na A β 1-14 i A β 1-42, a intracelularno samo na A β 1-14, dok je u oba oblika bio negativan na bojenje kongo crvenim. Morfološke i tinktorijalne osobine amiloidnih plakova ukazuju da se radi o plakovima difuznog tipa.
5. Kod starih pasa u odnosu na kontrolnu mlađu grupu ustanovljeno je u neuronima povećanje amiloid prekursor proteina - APP.
6. Neurofibrilarna klubad nisu ustanovljena u neuronima starih pasa niti kod kontrolnih životinja.
7. Imunohistohemijska pozitivnost na ubikvitin u neuronima starih pasa govori o pojačanoj proteolizi i regresivnim promenama u ovim ćelijama.
8. Prisustvo metalotioneina I i II u astrocitima ukazuje na prisustvo slobodnih radikala i pojačanu reaktivnost ovih ćelija.
9. Poliglukozanska tela su bila redovan nalaz u mozgu starih pasa. Zbog pretežno ekstracelularnog nalaza poliglukozanskih tela, ove tvorevine nije bilo moguće svrstati ni u korpora amilacea niti u Lafora tela.
10. Nakupljanje lipofuscina je povećano u neuronima starih pasa. Pored količine lipofuscina povećan je i broj ćelija u kojima se on nakuplja.

8. LITERATURA

1. Adams B, Chan A, Callahan H, Siwak C, Tapp D, Ikeda-Douglas C, Atkinson P, Head E, Cotman CW, Milgram NW: Use of a delayed non-matching to position task to model age-dependent cognitive decline in the dog. *Behav Brain Res* 2000, 108:47–56.
2. Adlard PA, West AK, Vickers J: Increased Density of Metallothionein I/II-Immunopositive Cortical Glial Cells in the Early Stages of Alzheimer's Disease. *Neurobiol Dis* 1998, 5(5):349-56.
3. Ahmed M, Davis J, Aucoin D, Sato T, Ahuja S, Aimoto S, Elliott JI, Van Nostrand WE, Smith SO: Structural conversion of neurotoxic amyloid-beta(1-42) oligomers to fibrils. *Nat Struct Mol Biol* 2010, 17(5):561-7.
4. Anderson AJ, Ruehl WW, Fleischmann LK, Stentstrom K, Entrinken L, Cummings BJ: DNA damage and apoptosis in the aged canine brain: relationship to A-beta deposition in the absence of neuritic pathology. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2000, 24:787-89.
5. Anezaki T, Ishiguro H, Hozumi I, Inuzuka T, Hiraiwa M, Kobayashi H, Yuguchi T, Wanaka A, Uda Y, Miyatake T, Yamada K, Tohyama M, Tsuji S: Expression of growth inhibitory factor (GIF) in normal and injured rat brains. *Neurochem Int* 1995, 27:89–94.
6. Arispe N: Architecture of the Alzheimer's A β P ion channel pore. *J Membr Biol* 2004, 197(1):33-48.
7. Baud O, Li J, Zhang Y, Neve RL, Volpe JJ, Rosenberg PA: Nitric oxide-induced cell death in developing oligodendrocytes is associated with mitochondrial dysfunction and apoptosis-inducing factor translocation. *Eur J Neurosci* 2004, 20(7):1713-26.
8. Beck M, Bigl V, Rossner S: Guinea pigs as a nontransgenic model for APP processing in vitro and in vivo. *Neurochem Res* 2003, 28:637–44.

9. Benavides SH, Monserrat AJ, Fariña S, Porta EA: Sequential histochemical studies of neuronal lipofuscin in human cerebral cortex from the first to the ninth decade of life. *Arch Gerontol Geriatr* 2002, 34(3):219-31.
10. Bingol B, Schuman EM: Synaptic protein degradation by the ubiquitin proteasome system. *Curr Opin Neurobiol* 2005, 15(5):536-41.
11. Bitan G, Kirkitadze MD, Lomakin A, Vollers SS, Benedek GB, Teplow DB: Amyloid beta-protein (A β) assembly: A β 40 and A β 42 oligomerize through distinct pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100(1):330-5.
12. Blanc EM, Toborek M, Mark RJ, Hennig B, Mattson MP: Amyloid β -peptide induces cell monolayer albumin permeability, impairs glucose transport, and induces apoptosis in vascular endothelial cells. *J Neurochem* 1997, 68(5):1870-81.
13. Bons N, Rieger F, Prudhomme D, Fisher A, Krause KH: *Microcebus murinus*: a useful primate model for human cerebral aging and Alzheimer's disease. *Genes Brain Behav* 2006, 5:120-130.
14. Borlikova GG, Trejo M, Mably AJ, Mc Donald JM, Frigerio CS, Regan CM, Murphy KJ, Masliah E, Walsh DM: Alzheimer brain-derived amyloid β -protein impairs synaptic remodeling and memory consolidation. *Neurobiol Aging* 2013, 34(5):1315-27.
15. Borrás D, Ferrer I, Pumarola M: Age-related changes in the brain of the dog. *Vet Pathol* 1999, 36:202-11.
16. Bosetti F, Brizzi F, Barogi S, Mancuso M, Siciliano G, Tendi EA, Murri L, Rapoport SI, Solaini G: Cytochrome c oxidase and mitochondrial F1F0-ATPase (ATP synthase) activities in platelets and brain from patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2002, 23(3):371-6.
17. Brellou G, Viemmas I, Lekkas S, Papaioannou N: Immunohistochemical investigation of amyloid β -protein (A β) in the brain of aged cats. *Histol Histopathol* 2005, 20:725-31.
18. Brown GC, Borutaite V: Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Radic Biol Med* 2002, 33(11):1440-50.

19. Brunk TU, Ericsson JLE: Electron microscopical studies of rat brain neurons. Localization of acid phosphatase and mode of formation of lipofuscin bodies. *J Ultrastruct Res* 1972, 38:1-15.
20. Brunk UT, Terman A: Lipofuscin: Mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free rad biol med* 2002a, 33(5):611-9.
21. Brunk UT, Terman A: The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging Accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur J Biochem* 2002b, 269(8):1996–2002.
22. Bush AI: The metallobiology of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 2003, 26:207–14.
23. Butterfield DA, Drake J, Pocernich C, Castegna A: Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide. *Trends Mol Med* 2001, 7:548–54.
24. Cappai R, Barnham KJ: Delineating the Mechanism of Alzheimer's disease A β peptide neurotoxicity. *Neurochem Res* 2007, 33:526–32.
25. Capucchio MT, Márquez M, Pregel P, Foradada L, Bravo M, Mattutino G, Torre C, Schiffer D, Catalano D, Valenza F, Guarda F, Pumarola M: Parenchymal and vascular lesions in ageing equine brains: histological and immunohistochemical studies. *J Comp Pathol* 2010, 142(1):61-73.
26. Carrodeguas JA, Rodolosse A, Garza MV, Sanz-Clemente A, Perez-Pé R, Lacosta AM, Lacosta AM, Domínguez L, Monleón I, Sánchez-Díaz R, Sorribas V, Sarasa M: The chick embryo appears as a natural model for research in beta-amyloid precursor protein processing. *Neuroscience* 2005, 134:1285–300.
27. Casley CS, Canevari L, Land JM, Clark JB, Sharpe MA: Beta-amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme activity. *J Neurochem* 2002, 80(1):91-100.
28. Cavanagh JB: Corpora-amylacea and the family of polyglucosan diseases. *Brain Res Brain Res Rev* 1999, 2-3:265-95.

29. Ciccotosto GD, Tew D, Curtain CC, Smith D, Carrington D, Masters CL, Bush AI, Cherny RA, Cappai R, Barnham KJ: Enhanced toxicity and cellular binding of a modified amyloid beta peptide with a methionine to valine substitution. *J Biol Chem* 2004, 279(41):42528-34
30. Ciccotosto GD, Tew DJ, Drew SC, Smith DG, Johanssen T, Lal V, Lau TL, Perez K, Curtain CC, Wade JD, Separovic F, Masters CL, Smith JP, Barnham KJ, Cappai R: Stereospecific interactions are necessary for Alzheimer disease amyloid- β toxicity. *Neurobiol Aging* 2011, 32(2):235-48.
31. Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, Shankar GM, Kuskowski MA, Selkoe DJ, Ashe KH: Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci* 2005, 8:79–84.
32. Cummings BJ, Head E, Reuhl WW, Miligram NW, Cotman CW: Beta-amyloid accumulation correlates with cognitive dysfunction in the aged canine. *Neurobiol Laern Mem* 1996a, 66(1):11-23.
33. Cummings BJ, Head E, Ruehl W, Milgram W, Cotman CW: The canine as an animal model of human aging and dementia. *Neurobiol Aging* 1996b, 17(2):259–68.
34. Cummings BJ, Pike CJ, Shankle R, Cotman CW: Beta-amyloid deposition and other measures of neuropathology predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1996c, 17:921–33.
35. Cummings BJ, Satou T, Head E, Milgram NW, Cole GM, Savage MJ, Podlisny MB, Selkoe DJ, Siman R, Greenberg BD, Cotman CW: Diffuse plaques contain C-terminal A beta 42 and not A beta 40 evidence from cats and dogs. *Neurobiol Aging* 1996d, 17(4):653–9.
36. Cummings BJ, Su JH, Cotman CW: Neuritic involvement within bFGF immunopositive plaques of Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 1993a, 124(2):315–25.
37. Cummings BJ, Su J, Cotman CW, White R, Rusell M: β -A-miloid accumulation in the aged canine brain: a model of early plaque formation in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1993b, 14:653-59.

38. Dalton T, Pazdernik T, Wagner J, Samson F, Andrews G: Temporalspatial patterns of expression of metallothionein-I and -III and other stress related genes in rat brain after kainic acid-induced seizures. *Neurochem Int* 1995, 27, 59–71.
39. Dani SU: Mechanisms of aging. *Principles of Neural Aging*. Elsevier, Amsterdam 1997, 5-18.
40. Deane R, Zlokovic BV: Role of the blood-brain barrier in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2007, 4(2):191-7.
41. Delacourte A, Sergent N, Wattez A, Mauraige CA, Lebert F, Pasquire F, David JP: Tau aggregation in the hippocampal formation: an ageing or a pathological process. *Exp Gerontol* 2002, 37(10-11):1291-6.
42. DeMattos RB, Bales KR, Cummins DJ, Dodart JC, Paul SM, Holtzman DM: Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98(15):8850–5.
43. Demuro A, Mina E, Kaye R, Milton SC, Parker I, Glabe CG: Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J Biol Chem* 2005, 280(17):17294-300.
44. Devi L, Prabhu BM, Galati DF, Avadhani NG, Anandatheerthavarada HK: Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial dysfunction. *J Neurosci* 2006, 26(35):9057-68.
45. Dietrich MO, Spuch C, Antequera D, Rodal I, de Yébenes JG, Molina JA, Bermejo F, Carro E: Megalin mediates the transport of leptin across the blood–CSF barrier. *Neurobiol Aging* 2008, 29(6):902-12.
46. Dimakopoulos AC, Mayer RJ: Aspects of Neurodegeneration in the Canine Brain. *J Nutr* 2002, 132(6):1579S-82S.
47. Dorfman VB, Pasquini L, Riudavets M, López-Costa JJ, Villegas A, Troncoso JC, Lopera F, Castaño EM, Morelli L: Differential cerebral deposition of IDE and NEP in sporadic and familial Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2010, 31(10):1743-57.

48. Double LK, Dedov NV, Fedorov H, Kettle E, Halliday MG, Garner B, Brunk TU: The comparative biology of neuromelanin and lipofuscin in the human brain. *Cell Mol Life Sci* 2008, 65(11):1669-82.
49. Drögemüller C, Wölke A, Distl O: Characterization of Candidate Genes for Neuronal Ceroid Lipofuscinosis in Dog. *J Hered* 2005, 96(7):735-8.
50. Du AT, Schuff N, Chao LL, Kornak J, Ezekiel F, Jagust WJ, Kramer JH, Reed BR, Miller BL, Norman D, Chui HC, Weiner MW: White matter lesions are associated with cortical atrophy more than entorhinal and hippocampal atrophy. *Neurobiol Aging* 2005, 26:553-9.
51. Ebadi M, Iversen P, Hao R, Cerutis D, Rojas P, Happe H, Murrin L, Pfeiffer R: Expression and regulation of brain metallothionein. *Neurochem Int* 1995, 27:1-22.
52. Elfenbein HA, Rosen RF, Stephens SL, Switzer RC, Smith Y, Pare J, Mehta PD, Warzok R, Walker LC: Cerebral beta-amyloid angiopathy in aged squirrel monkeys. *Histol Histopathol* 2007, 22(2):155-67.
53. Erickson J, Hollopeter G, Thomas S, Froelick G, Palmiter R: Disruption of the MT-III gene in mice: Analysis of brain zinc, behavior, and neuron vulnerability to metals, aging and seizures. *J Neurosci* 1997, 17:1271-81.
54. Estus S, Tucker HM, Van Rooyen C, Wright S, Brigham EF, Wogulis M, Rydel RE: Aggregated amyloid- β protein induces cortical neuronal apoptosis and concomitant "apoptotic" pattern of gene induction. *J Neurosci* 1997, 17(20):7736-45.
55. Ezekiel F, Chao L, Kornak J, Du AT, Cardenas V, Truran D, Jagust W, Chui H, Miller B, Yaffe K, Schuff N, Weiner M: Comparisons between global and focal brain atrophy rates in normal aging and Alzheimer disease: boundary shift integral versus tracing of the entorhinal cortex and hippocampus. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2004, 18:196-201.
56. Farkas E, Luiten PGM: Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 2001, 64:575-611.

57. Figueroa S, Oset-Gasque MJ, Arce C, Martinez-Honduvilla CJ, González MP: Mitochondrial involvement in nitric oxide-induced cellular death in cortical neurons in culture. *J Neurosci Res* 2006, 83(3):441-9.
58. Fukui H, Diaz F, Garcia S, Moraes CT: Cytochrome c oxidase deficiency in neurons decreases both oxidative stress and amyloid formation in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, 104(35):14163-8.
59. Gasche Y, Copin JC, Sugawara T, Fujimura M, Chan PH: Matrix metalloproteinase inhibition prevents oxidative stress-associated blood-brain barrier disruption after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001, 21(12):1393-400.
60. Gewurz H, Zhang XH, Lint TF: Structure and function of the pentraxins. *Curr Opin Immun* 1995, 7(1):54-64.
61. Giannini C, Kloß A, Gohlke S, Mishto M, Nicholson TP, Sheppard PW, Kloetzel PM, Dahlmann B: Poly-Ub-substrate-degradative activity of 26S proteasome is not impaired in the aging rat brain. *PLoS One* 2013, 8(5):e64042. doi: 10.1371/journal.pone.0064042. Print 2013.
62. González-Martínez Á, Rosado B, Pesini P, Suárez ML, Santamarina G, García-Belenguer S, Villegas A, Monleón I, Sarasa M: Plasma β -amyloid peptides in canine aging and cognitive dysfunction as a model of Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* 2011, 46(7):590-6.
63. Gouras GK, Almeida CG, Takahashi RH: Intraneuronal A β accumulation and origin of plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2005, 26(9):1235-44.
64. Gouras KG, Tsai J, Naslund J, Vincent B, Edgar M, Checler F, Greenfield JP, Haroutunian V, Buxbaum JD, Xu H, Greengard P, Relkin NR: Intraneuronal A β 1-42 accumulation in human brain. *Am J Path* 2000, 156(1):15-20.
65. Gowing E, Roher AE, Woods AS, Cotter RJ, Chaney M, Little SP, Ball MJ: Chemical characterization of A beta 17-42 peptide a component of diffuse amyloid deposits of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 1994, 269:10987-90.
66. Gray DA, Woulfe J: Lipofuscin and Aging: A Matter of Toxic Waste, *Sci. Aging Knowledge Environ* 2005, 2005(5):re1.

67. Gredal H, Berendt M, Leifsson PS: Progressive myoclonus epilepsy in a beagle. *J Small Anim Pract* 2003, 44(11):511-4.
68. Gu Z, Kaul M, Yan B, Kridel SJ, Cui J, Strongin A, Smith JW, Liddington RC, Lipton SA: S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science* 2002, 297(5584):1186-90.
69. Haass C, De Strooper B: The presenilins in Alzheimer's disease-proteolysis holds the key. *Science* 1999, 286: 916-9.
70. Hardy J, Cullen K: Amyloid at the blood vessel wall. *Nat Med* 2006, 12:756-7.
71. Hardy J, Selkoe DJ: The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002, 297(5590):2209.
72. Hayashi H, Kimura N, Yamaguchi H, Hasegawa K, Yokoseki T, Shibata M, Yamamoto N, Michikawa M, Yoshikawa Y, Terao K, Matsuzaki K, Lemere CA, Selkoe DJ, Naiki H, Yanagisawa K: A seed for Alzheimer amyloid in the brain. *J Neurosci* 2004, 24(20):4894-902.
73. Head E, Torp R: Insights into Abeta and presenilin from a canine model of human brain aging. *Neurobiol Dis* 2002, 9(1):1-10.
74. Head E, Callahan H, Muggenburg BA, Miligram NW, Cotman CW: Visual discrimination learning ability and beta amyloid accumulation in the dog. *Neurobiol Aging* 1998, 19(5):415-25.
75. Head E, Pop V, Sarsoza F, Kaye R, Beckett TL, Studzinski CM, Tomic JL, Glabe CG, Murphy P: Amyloid β -Peptide and Oligomers in the Brain and CSF of Aged Canines: *J Alzheimers Dis* 2010, 20(2):637-46.
76. Head E, Pop V, Vasilevko V, Hill M, Saing T, Sarsoza F, Nistor M, Christie LA, Milton S, Glabe C, Barrett E, Cribbs D: A two-year study with fibrillar beta-amyloid (Abeta) immunization in aged canines: effects on cognitive function and brain Abeta. *J Neurosci* 2008, 28(14):3555-66.
77. Hegde AN, Ubiquitin-proteasome-mediated local protein degradation and synaptic plasticity. *Prog Neurobiol* 2004, 73(5):311-57.

78. Höhn A, Sittig A, Jung T, Grimm S, Grune T: Lipofuscin is formed independently of macroautophagy and lysosomal activity in stress-induced prematurely senescent human fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 2012, 53(9):1760-9.
79. Inoue S, Kisilevsky R: A high resolution ultrstructural study of experimental murine AA amyloid. *Lab Inv* 1996, 74(3):670-83.
80. Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y: Visualization of A β 42(43) and A β 40 in senile plaques with end-specific A β monoclonals: evidence that an initially deposited species is A β 42(43). *Neuron* 1994, 13:45–53.
81. Jang H, Zheng J, Nussinov R: Models of β -Amyloid Ion Channels in the Membrane Suggest That Channel Formation in the Bilayer Is a Dynamic Process. *Biophys J* 2007, 93:1938–49.
82. Johnston JA, Ward CL, Kopito RR: Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol* 1998, 143(7):1883-98.
83. Johnstone EM, Chaney MO, Norris FH, Pascual R, Little SP: Conservation of the sequence of the Alzheimer's disease amyloid peptide in dog, polar bear and five other mammals by cross-species polymerase chain reaction analysis. *Brain Res Mol Brain Res* 1991, 10:299–305.
84. Jung T, Bader N, Grune T: Lipofuscin - Formation Distribution and Metabolic Consequences. *Ann NY Acad Sci* 2007, 1119:97-111.
85. Jung T, Höhn A, Grune T: Lipofuscin: Detection and Quantification by Microscopic Techniques. *Methods Mol Biol* 2010, 594:173-93.
86. Kalaria RN: The blood-brain barrier and cerebrovascular pathology in Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci* 1999, 893:113-25.
87. Kaye R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW, Glabe CG: Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 2003, 300(5618):486–9.
88. Keil U, Bonert A, Marques CA, Scherping I, Weyermann J, Strosznajder JB, Müller-Spahn F, Haass C, Czech C, Pradier L, Müller WE, Eckert A: Amyloid

beta-induced changes in nitric oxide production and mitochondrial activity lead to apoptosis. *J Biol Chem* 2004, 279(48):50310-20.

89. Klubin I, Betts V, Welzel AT, Blennow K, Zetterberg H, Wallin A, Lemere CA, Cullen WK, Peng Y, Wiwniewski T, Selkoe DJ, Anwyl R, Walsh DM, Rowan MJ: Amyloid beta protein dimercontaining human CSF disrupts synaptic plasticity: prevntion by systemic passive immunization. *J Neurosc* 2008, 28(16):4231-7.
90. Knežević M, Jovanović M: *Opšta patologija, Makarije, Beograd* 1999, 88-92.
91. Kojima S, Shimada A, Morita T, Yamano Y, Umemura T: Localization of Metallothioneins- I & -II and -III in the Brain of Aged Dog. *J Vet Med Sci* 1999, 61(4):343-9.
92. Kumar-Singh S: Cerebral amyloid angiopathy: pathogenetic mechanisms and link to dense amyloid plaques. *Genes Brain Behav* 2008, 1:67-82.
93. Kumar-Singh S, Cras P, Wang R, Kros JM, Van Swieten J, Lübke U, Ceuterick C, Serneels S, Vennekens K, Timmermans JP, Van Marck E, Martin JJ, Van Duijn CM, Van Broeckhoven C: Dense-core senile plaques in Flemish variant of Alzheimer's disease are vasocentric. *Am J Pathol* 2002, 161(2):507-20.
94. Kumar-Singh S, De Jonghe C, Cruts M, Kleinert R, Wang R, Mercken M, De Strooper B, Vanderstichele H, Lofgren A, Vanderhoeven I, Backhovens H, Vanmechelen E, Kroisel PM, Van Broeckhoven C: Nonfibrillar diffuse amyloid deposition due to a gamma(42)-secretase site mutation points to an essential role for N-truncated abeta(42) in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 2000, 9:2589-98.
95. Kuroki K, Uchida K, Kiapattanasakul W, Nakamura S, Yamaguchi R, Nakayama H, Doi K, Tateyama S: Immunohistochemical detection of tau protein in varius non-human animal brains. *Neuropathology* 1997, 17:174-80.
96. Kurz T, Eaton JW, Brunk UT: Redox activity within the lysosomal compartment: implications for aging and apoptosis. *Antioxid Redox Signal* 2010, 13(4):511-23.
97. Kurz T, Terman A, Brunk UT: Autophagy, ageing and apoptosis: the role of oxidative stress and lysosomal iron. *Arch Biochem Biophys* 2007, 462(2):220-30.

98. LaFerla FM, Green KN, Oddo S: Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 2007, 8:499-509.
99. Layfield R, Cavey JR, Lowe J: Role of ubiquitin-mediated proteolysis in the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Ageing Res Rev* 2003, 2:343.
100. Lee JM, Yin KJ, Hsin I, Chen S, Fryer JD, Holtzman DM, Hsu CY, Xu J: Matrix metalloproteinase-9 and spontaneous hemorrhage in an animal model of cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol* 2003, 54(3):379-82.
101. Lesne S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M, Ashe KH: A specific amyloid- β protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 2006, 440(7082):352-7.
102. Lins L, Flore C, Chapelle L, Talmud PJ, Thomas A, Brasseur R: Lipid-interacting properties of the N-terminal domain of human apolipoprotein C-III. *Protein Eng* 2002, 15:513-20.
103. Lohi H, Ianzano L, Zhao XC, Chan EM, Turnbull J, Scherer SW, Ackerley CA, Minassian BA: Novel glycogen synthase kinase 3 and ubiquitination pathways in progressive myoclonus epilepsy. *Hum Mol Gen* 2005, 14:2727-36.
104. Loo DT, Copani A, Pike CJ, Whittmore ER, Walencewicz AJ, Cotman CW, Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90(17):7951-5.
105. Lüth HJ, Holzer M, Gärtner U, Staufenbiel M, Arendt T: Expression of endothelial and inducible NOS-isoforms is increased in Alzheimer's disease, in APP23 transgenic mice and after experimental brain lesion in rat: evidence for an induction by amyloid pathology. *Brain Res* 2001, 913(1):57-67.
106. Mann DM, Iwatsubo T, Fukumoto H, Ihara Y, Odaka A, Suzuki N: Microglial cells and amyloid beta protein (A beta) deposition; association with A beta 40-containing plaques. *Acta Neuropathol* 1995, 90(5):472-7.
107. Marco S, Skaper SD: Amyloid β -peptide₁₋₄₂ alters tight junction protein distribution and expression in brain microvessel endothelial cells. *Neurosci Lett* 2006, 401:219-34.

108. Márquez M, Pérez L, Serafín A, Teijeira S, Navarro C, Pumarola M: Characterisation of Lafora-like bodies and other polyglucosan bodies in two aged dogs with neurological disease. *Vet J* 2010, 183(2):222-5.
109. Matsui T, Ingelsson M, Fukumoto H, Ramasamy K, Kowa H, Frosch MP, Irizarry MC, Hyman BT: Expression of APP pathway mRNAs and proteins in Alzheimer's disease. *Brain Res* 2007, 1161:116-23.
110. Maurer K, Hoyer S: Alois Alzheimer revisited: differences in origin of the disease carrying his name. *J Neural Transm* 2006, 113:1645-58.
111. McGavin DM, Zachary JF: *Pathologic basis of veterinary disease*, Mosby, St. Louise 2007, 924-5.
112. Michikawa M, Gong JS, Fan QW, Sawamura N, Yanagisawa K: A novel action of Alzheimer's amyloid β -protein ($A\beta$): oligomeric $A\beta$ promotes lipid release. *J Neurosci* 2001, 21:7226-35.
113. Miller DL, Papayannopoulos IA, Styles J, Bobin SA, Lin YY, Biemann K, Iqbal K: Peptide compositions of the cerebrovascular and senile plaque core amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Arch Biochem Biophys* 1993, 301(1):41-52.
114. Miyakawa T, Kimura T, Hirata S, Fujise N, Ono T, Ishizuka K, Nakabayashi J: Role of blood vessels in producing pathological changes in the brain with Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci* 2000, 903:46-54.
115. Miyawaki K, Nakayama H, Matsuno S, Tamaoka A, Doi K: Three-dimensional and fractal analyses of assemblies of amyloid beta protein subtypes [A β 40 and A β 42(43)] in canine senile plaques. *Acta Neuropathol* 2002, 103(3):228-36.
116. Nagase H, Woessner JF Jr: Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999, 274(31):21491-4.
117. Nakajima K, Suzuki K: Immunochemical detection of metallothionein in brain. *Neurochem Int* 1995, 27:73-87.
118. Nakamura S, Tamaoka A, Sawamura N, Kiatipattanasakul W, Nakayama H, Shoji S, Yoshikawa Y, Doi K: Deposition of amyloid beta protein (A β) subtypes [A

- beta 40 and A beta 42(43)] in canine senile plaques and cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol* 1997, 94(4):323-8.
119. Nakayama H, Kiatipattanasakul W, Nakamura S, Miyawaki K, Kikuta F, Uchida K, Kuroki K, Makifuchi T, Yoshikawa Y, Doi K: Fractal analysis of senile plaque observed in various animal species. *Neurosci Lett* 2001, 297(3):195-8.
 120. Nakayama H, Uchida K, Doi K: A comparative study of age-related brain pathology-are neurodegenerative diseases present in nonhuman animals? *Med Hypotheses* 2004, 63(2):198-202.
 121. Natta R, de Boer WI, Maat-Schieman ML, Baelde HJ, Vinters HV, Roos RA, Van Duinen SG: Amyloid beta precursor protein-mRNA is expressed throughout cerebral vessel walls. *Brain Res* 1999, 828:179-83.
 122. Papaioannou N, Tooten PC, Van Ederen AM, Bohl JR, Rofina J, Tsangaris T, Gruys E: Immunohistochemical investigation of the brain of aged dogs. I. Detection of neurofibrillary tangles and of 4-hydroxynonenal protein, an oxidative damage product, in senile plaques. *Amyloid* 2001, 8(1):11-21.
 123. Pavlović DM, Pavlović AM, Žugić S: Patogeneza Alchajmerove bolesti. *Vojnosanit Pregl* 2007, 64(11):765-72.
 124. Pifer PM, Yates EA, Legleiter J: Point mutations in A β result in the formation of distinct polymorphic aggregates in the presence of lipid bilayers. *PLoS One* 2011, 6(1):e16248. doi: 10.1371/journal.pone.0016248.
 125. Pirici D, Van Cauwenberghe C, Van Broeckhoven C, Kumar-Singh S: Fractal analysis of amyloid plaques in Alzheimer's disease patients and mouse models. *Neurobiol Aging* 2011, 32(9):1579-87.
 126. Pomorski T, Holthuis JC, Herrmann A, Van Meer G: Tracking down lipid flippases and their biological functions. *J Cell Sci* 2004, 117(Pt 6):805-13.
 127. Pop V, Head E, Berchtold NC, Glabe CG, Studzinski CM, Weidner AM, Murphy MP, Cotman CW: A β aggregation profiles and shifts in APP processing favor amyloidogenesis in canines. *Neurobiol Aging* 2012, 33(1):108-20.
 128. Porta EA: Pigments in Aging: An Overview, *Ann NY Acad Sci* 2002, 959:57-65.

129. Ramirez MJ, Heslop KE, Francis PT, Rattray M: Expression of amyloid precursor protein, tau and presenilin RNAs in rat hippocampus following deafferentation lesions. *Brain Res* 2001, 907(1-2):222-32.
130. Reifinger M: Volumetric examination of senile brain involution in dogs. *Anat Histol Embriol* 1997, 26:141-6.
131. Revesz T, Holton JL, Lashley T, Plant G, Rostagno A, Ghiso J, Frangione B: Sporadic and familial cerebral amyloid angiopathies. *Brain Pathol* 2002, 12:343-57.
132. Rodriguez MT, Calella AM, Silva S, Munna E, Modena P, Chiesa R, Terrevazzi S, Ruggieri RM, Palermo R, Piccoli F, Confalonieri R, Tiraboschi P, Fragiaco C, Quadri P, Lucca U, Forloni G: Apolipoprotein E and intronic polymorphism of presenilin 1 and alpha-1-antichymotrypsin in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2000, 11(5):239-44.
133. Rofina J, Van Andel I, Van Ederen AM, Papaioannou N, Yamaguchi H, Gruys E: Canine counterpart of senile dementia of the Alzheimer type: amyloid plaques near capillaries but lack of spatial relationship with activated microglia and macrophages. *Amyloid* 2003, 10:86-96.
134. Rofina JE, Van Ederen AM, Toussaint MJM, Secrève M, Van der Spek A, Van der Meer I, Van Eerdenburg FJCM, Gruys E: Cognitive disturbances in old dogs suffering from the canine counterpart of Alzheimer's disease. *Brain Res* 2006, 1069(1):216-26.
135. Roher AE, Lowenson JD, Clarke S, Woods AS, Cotter RJ, Gowing E, Ball MJ: Beta-Amyloid-(1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: implications for the pathology of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci* 1993, 90(22):10836-40.
136. Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE: Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke* 1998, 29(10):2189-95.

137. Saido TC, Iwata N: Metabolism of amyloid beta peptide and pathogenesis of Alzheimer's disease. Towards presymptomatic diagnosis, prevention and therapy. *Neurosci Res* 2006, 54:235-53.
138. Sarasa M, Pesini P: Natural non transgenic animal models for research in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2009, 6(2):171-8.
139. Satou T, Cummings BJ, Head E, Nelson KA, Hahn FF, Milgram NW, Velazquez P, Cribbs DH, Tenner AJ, Cotman CW: The progression of β -amyloid deposition in the frontal cortex of the aged canine. *Brain Res* 1997, 774(1-2):35-43.
140. Schröder BA, Wrocklage C, Hasilik A, Saftig P: The proteome of lysosomes. *Proteomics* 2010, 10(22):4053-76.
141. Selkoe DJ: Normal and abnormal biology of the beta-amyloid precursor protein. *Annu Rev Neurosci* 1994, 17:489-517.
142. Selkoe DJ: Alzheimer's disease: genes, proteins and therapy. *Psychol Rev* 2001, 81:741-66.
143. Selkoe DJ: Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 2002, 298(5594):789-91.
144. Selkoe DJ, Bell DS, Podlisny MB, Price DL, Cork LC: Conservation of brain amyloid proteins in aged mammals and humans with Alzheimer's disease. *Science* 1987, 235(4791):873-7.
145. Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, Selkoe DJ: Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brain impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 2008, 14 (8):837-42.
146. Shibata M, Yamada S, Kumar SR, Calero M, Bading J, Frangione B, Holtzman DM, Miller CA, Strickland DK, Ghiso J, Zlokovic BV: Clearance of Alzheimer's amyloidss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J Clin Invest* 2000, 106:1489-99.
147. Simakova O, Arispe NJ: The cell-selective neurotoxicity of the Alzheimer's A β peptide is determined by surface phosphatidylserine and cytosolic ATP levels.

- Membrane binding is required for Abeta toxicity. *J Neurosci* 2007, 27(50):13719-29.
148. Smith DP, Smith DG, Curtain CC, Boas JF, Pilbrow JR, Ciccotosto GD, Lau TL, Tew DJ, Perez K, Wade JD, Bush AI, Drew SC, Separovic F, Masters CL, Cappai R, Barnham KJ: Copper-mediated amyloid-beta toxicity is associated with an intermolecular histidine bridge. *J Biol Chem* 2006, 281(22):15145-54.
 149. Soreghan B, Kosmoski J, Glabe C: Surfactant properties of Alzheimer's A beta peptides and the mechanism of amyloid aggregation. *J Biol Chem* 1994, 269(49):28551-4.
 150. Sparks DL, Friedland R, Petanceska S, Schreurs BG, Shi J, Perry G, Smith MA, Sharma A, Derosa S, Ziolkowski C, Stankovic G: Trace copper levels in the drinking water, but not zinc or aluminum influence CNS Alzheimer-like pathology. *J Nutr Health Aging* 2006, 10:247-54.
 151. Sparks DL: Cholesterol metabolism and brain amyloidosis: evidence for a role of copper in the clearance of Abeta through the liver. *Curr Alzheimer Res* 2007, 4:165-9.
 152. Sparr E, Engel MFM, Sakharov DV, Sprong M, Jacobs J, de Kruijff B, Höppener JW, Killian JA: Islet amyloid polypeptide-induced membrane leakage involves uptake of lipids by forming amyloid fibers. *FEBS Lett* 2004, 577:117-20.
 153. Stefani M: Protein misfolding and aggregation: new examples in medicine and biology of the dark side of the protein world. *Biochim Biophys Acta* 2004, 1739:5-25.
 154. Su MY, Head E, Brooks WM, Wang Z, Muggenburg BA, Adam GE, Sutherland RJ, Cotman CW, Nalcioglu O: Magnetic Resonance Imaging of Anatomic and vascular characteristic in canine model of human aging. *Neurobiol Aging* 1998, 19(5):479-85.
 155. Suhara T, Magrané J, Rosen K, Christensen R, Kim HS, Zheng B, McPhie DL, Walsh K, Querfurth H: Abeta42 generation is toxic to endothelial cells and inhibits eNOS function through an Akt/GSK-3beta signaling-dependent mechanism. *Neurobiol Aging* 2003, 24(3):437-51.

156. Swindell RW: Metallothionein and biology of aging. *Ageing Res Rev* 2011, 10(1):132-45.
157. Tamaoka A, Kondo T, Odaka A, Sahara N, Sawamura N, Ozawa K, Suzuki N, Shoji S, Mori H: Biochemical evidence for the long-tail form (A β 1-42/43) of amyloid beta protein as a seed molecule in cerebral deposits of Alzheimer's disease, *Biochem. Biophys Res Commun* 1994, 205(1):834-42.
158. Tekirian TL, Cole GM, Russel MJ, Yang F, Wekstein DR, Patel E, Snowdon DA, Markesbery WR, Geddes JW: Carboxy terminal of β -amyloid deposits in aged human, canine and polar bear brains. *Neurobiol Aging* 1996, 17(2):249-57.
159. Terman A, Brunk UT: Ceroid/lipofuscin formation in cultured human fibroblasts: the role of oxidative stress and lysosomal proteolysis. *Mech Ageing Dev* 1998a, 104:277-91.
160. Terman A, Brunk UT: Lipofuscin: mechanisms of formation and increase with age. *APMIS* 1998b, 106:265-76.
161. Thinakaran G, Koo EH: Amyloid Precursor Protein Trafficking, Processing, and Function. *J Biol Chem* 2008, 283(44):29615-19.
162. Thirumalai D, Klimov DK, Dima RI: Emerging ideas on the molecular basis of protein and peptide aggregation. *Curr Opin Struct Biol* 2003, 13:1-14.
163. Tiraboschi P, Hansen LA, Thal LJ, Corey-Bloom J: The importance of neuritic plaques and tangles to the development and evolution of AD. *Neurology* 2004, 62:1984-89.
164. Torp R, Head E, Cotman CW: Ultrastructural analyses of β -amyloid in the aged dog brain: neuronal β -amyloid is localized to the plasma membrane. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2000, 24(5):801-10.
165. Uchida K, Nakayama H, Goto N: Pathological studies on cerebral amyloid angiopathy, senile plaques and amyloid deposition in visceral organs in aged dogs. *J Vet Med Sci* 1991, 53(6):1037-42.
166. Uchida Y: Molecular mechanisms of regeneration in Alzheimer's disease brain. *Geriatr Gerontol Int* 2010, 10:S158-68.

167. Uchida Y, Gomi F, Masumizu T, Miura Y: Growth inhibitory factor prevents neurite extension and the death of cortical neurons caused by high oxygen exposure through hydroxyl radical scavenging. *J Biol Chem* 2002, 277:32353-9.
168. Upadhyya SC, Hegde AN: Role of the ubiquitin proteasome system in Alzheimer's disease. *BMC Biochem* 2007, 8 Suppl. 1:S12.
169. Urkasemsin G, Linder KE, Bell JS, de Lahunta A, Olby NJ: Mapping Purkinje neuron loss and polyglucosan body accumulation in hereditary cerebellar degeneration in Scottish terriers. *Vet Pathol* 2012, 49(5):852-9.
170. Valincius G, Heinrich F, Budvytyte R, Vanderah DJ, McGillivray DJ, Sokolov Y, Hall JE, Lösche M: Soluble Amyloid β -Oligomers Affect Dielectric Membrane Properties by Bilayer Insertion and Domain Formation: Implications for Cell Toxicity. *Biophys J* 2008, 95:4845-61.
171. Van Broeck B, Vanhoutte G, Pirici D, Van Dam D, Wils H, Cuijt I, Vennekens K, Zabielski M, Michalik A, Theuns J, De Deyn PP, Van der LA, Van Broeckhoven C, Kumar-Singh S: Intraneuronal amyloid beta and reduced brain volume in a novel APP T714I mouse model for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2008, 29:241-52.
172. Vandeveld M, Fatzer R: Neuronal Ceroid-lipofuscinosis in Older Dachshunds. *Vet Pathol* 1980, 17:686-92.
173. Vargas T, Ugalde C, Spuch C, Antequera D, Morán MJ, Martín MA, Ferrer I, Bermejo-Pareja F, Carro E: Abeta accumulation in choroid plexus is associated with mitochondrial-induced apoptosis. *Neurobiol Aging* 2010, 31(9):1569-81.
174. Verdier Y, Penke B: Binding sites of amyloid beta-peptide in cell plasma membrane and implications for Alzheimer's disease. *Curr Protein Pept Sci* 2004, 5(1):19-31.
175. Vinters HV, Wang ZZ, Secor DL: Brain parenchymal and microvascular amyloid in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 1996, 6:179-95.
176. Walker LC: Animal models of cerebral β -amyloid angiopathy. *Brain Res Brain Res Rev* 1997, 25(1):70-84.

177. Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ: Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 2002, 416(6880):535–9.
178. Wegiel J, Wisniewski HM, Dziwiatkowski J, Tarnawski M, Nowakowski J, Dziwiatkowska A, Soltysiak Z: The origin of amyloid in cerebral vessels of aged dogs. *Brain Res* 1995, 705(1-2):225-34.
179. Werb Z: ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* 1997, 91(4):439-42.
180. White AR, Guirguis R, Brazier MW, Jobling MF, Hill AF, Beyreuther K, Barrow CJ, Masters CL, Collins SJ, Cappai R: Sublethal concentrations of prion peptide PrP106-126 or the amyloid beta peptide of Alzheimer's disease activates expression of proapoptotic markers in primary cortical neurons. *Neurobiol Dis* 2001, 8(2):299-316.
181. Wirths O, Multhaup G, Bayer TA: A modified beta-amyloid hypothesis: intraneuronal accumulation of the beta-amyloid peptide the first step of a fatal cascade. *J Neurochem* 2004, 91:513-20.
182. Wirths O, Multhaup G, Czech C, Blanchard V, Moussaoui S, Tremp G, Pradier L, Beyreuther K, Bayer TA: Intraneuronal A β accumulation precedes plaque formation in betaamyloid precursor protein and presenilin-1 double-transgenic mice. *Neurosci Lett* 2001, 306:116-20.
183. Wisniewski T, Lalaowski M, Bobik M, Russel M, Strosznajder J, Frangione B: Amyloid beta 1-42 deposits do not lead to Alzheimer's neuritic plaques in aged dogs. *Biochem J* 1996, 313:575-80.
184. Wohlsein P, Deschl U, Baumgärtner W: Nonlesions, unusual cell types, and postmortem artifacts in the central nervous system of domestic animals. *Vet Pat* 2013, 50(I):122-43.
185. Wyss-Coray T, Loike JD, Brionne TC, Lu E, Anankov R, Yan F, Silverstein SC, Husemann J: Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat Med* 2003, 9:453-7.

186. Xu J, Chen S, Ku G, Ahmed SH, Xu J, Chen H, Hsu CY: Amyloid beta peptide-induced cerebral endothelial cell death involves mitochondrial dysfunction and caspase activation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001, 21(6):702-10.
187. Yao M, Nguyen TV, Pike CJ: β -Amyloid-induced neuronal apoptosis involves c-Jun N-terminal kinase-dependent downregulation of Bcl-w. *J Neurosci* 2005, 25(5):1149-58.
188. Yin KJ, Hsu CY, Hu XY, Chen H, Chen SW, Xu J, Lee JM: Protein phosphatase 2A regulates bim expression via the Akt/FKHRLi signaling pathway in amyloid- β peptide-induced cerebrovascular endothelial cell death. *J Neurosci* 2006, 26(8):2290-9.
189. Yin KJ, Lee JM, Chen SD, Xu J, Hsu CY: Amyloid- β induces Smac release via AP-1/Bim activation in cerebral endothelial cells. *J Neurosci* 2002, 22(22):9764-70.
190. Yu CH, Song GS, Yhee JY, Kim JH, Im KS, Nho WG, Lee JH, Sur JH: Histopathological and immunohistochemical comparison of the brain of human patients with Alzheimer's disease and the brain of aged dogs with cognitive dysfunction. *J Comp Pathol* 2011, 145(1):45-58.
191. Zhao H, Tuominen EKJ, Kinnunen PKJ: Formation of amyloid fibers triggered by phosphatidylserine-containing membranes. *Biochemistry* 2004, 43:10302-7.
192. Zheng H, Berman N, Klaassen C: Chemical modulation of metallothionein I and III mRNA in mouse brain. *Neurochem Int* 1995, 27:43-58.
193. Zlokovic BV: Clearing amyloid through the blood-brain barrier. *J Neurochem* 2004, 89(4):807-11.

БИОГРАФИЈА

Слађан Нешић је рођен 01.07.1981. године у Шапцу. Шабачку гимназију је завршио 2000. године као одличан ђак. Основне студије Факултета ветеринарске медицине уписао је 2000. године. Дипломирао је у року 18.12.2006. године са просечном оценом 8,66. Током студија био је стипендиста Фонда за младе таленте-Владе Републике Србије, Министарства просвете и задужбине Драгољуба Маринковића. На Катедри за патолошку морфологију је запослен 2007. године као стручни сарадник. Докторске академске студије на Факултету ветеринарске медицине уписао је 2008. године. Од 2009 до 2010. године био је ангажован на пројекту ТР 20061 Министарства за науку и технолошки развој. На Катедри за патолошку морфологију, Факултета ветеринарске медицине, Универзитета у Београду запослен је од 01.11.2010. године у звању асистента. У Лабораторији за патологију, Катедре за патолошку морфологију, ангажован је као испитивач и администратор система квалитета. До сада је као аутор и коаутор објавио 13 научних публикација у страним и домаћим часописима. Постао је члан Charles Louis Davis DVM Foundation и European Society of Veterinary Pathology 2011. године. Учествовао у организацији и био учесник Конгреса патолога југоисточне Европе одржаног на Катедри за патологију, Факултета ветеринарске медицине 2007. године. Похађао је курс из цитологије и онкологије 2010. године у Мађарској. Исте године учествовао је у организацији и био је учесник 28. ESVP и ECVP симпозијума, у организацији Катедре за патологију, Факултета ветеринарске медицине. Похађао је међународни курс из патологије дојке, 2011. године у Новом Саду у организацији Европске Школе Патолога (ESP) и Европског Савеза Патолога (EscoP). Учествовао је 2011. године на семинару-обуци под називом „Процена параметара валидације и ревалидације аналитичких метода“, који је организовао Савез хемијских инжењера Србије на Технолошко-металуршком факултету, Универзитета у Београду. Учествовао је на 14. Конгресу удружења патолога и цитолога Србије са међународним учешћем 2012. године у Београду. Исте године је учествовао на 30. ESVP и ECVP симпозијуму, који је одржан у Леону, у Шпанији.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани Слађан Нешић

број индекса 15/8

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Патоморфолошке и имунохистохемијске карактеристике промена у мозгу
старих паса**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, јун 2014.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Слађан Нешић

Број индекса 15/8

Студијски програм докторске академске студије

Наслов рада

**Патоморфолошке и имунохистохемијске карактеристике промена у
мозгу старих паса**

Ментор Проф. др Милијан Јовановић

Потписани Слађан Нешић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, јун 2014.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**Патоморфолошке и имунохистохемијске карактеристике промена у мозгу
старих паса**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, јун 2014.

