

**UNIVERZITET U BEOGRADU**  
**BIOLOŠKI FAKULTET**

**Divna Lazić**

**DOPRINOS POREMEĆAJA**  
**KRVNO-MOŽDANE BARIJERE**  
**PATOFIZIOLOGIJI**  
**ALCHAJMEROVE BOLESTI U**  
**TRANSGENIM ANIMALNIM MODELIMA**

**Doktorska disertacija**

Beograd, 2019.

**UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY**

**Divna Lazić**

**CONTRIBUTION OF  
BLOOD-BRAIN BARRIER DISRUPTION  
TO THE PATHOPHYSIOLOGY OF  
ALZHEIMER'S DISEASE IN  
TRANSGENIC ANIMAL MODELS**

**Doctoral dissertation**

Belgrade, 2019.

## **MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE**

### **Mentori:**

Dr Selma Kanazir, naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“,  
Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

Dr Milka Perović, viši naučni saradnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“,  
Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

### **Članovi komisije:**

Dr Selma Kanazir, naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“,  
Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

Dr Milka Perović, viši naučni saradnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“,  
Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

Dr Nadežda Nedeljković, redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu,  
Beograd, Srbija

Datum odbrane:

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije je urađen u Laboratoriji za Molekularnu neurobiologiju, Odeljenja za neurobiologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, u okviru projekta „*Plastičnost mozga tokom starenja: uticaj dijetalne restrikcije i anestezije*“ (#173056), koji finansira Ministarstvo za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, pod rukovodstvom dr Selme Kanazir, i na Zilka institutu za neurogenetiku, Univerziteta Južne Kalifornije, u okviru Fogarty International Research Collaboration Award (FIRCA, #R03AG046216) „*Caloric restriction and Alzheimer’s A $\beta$  clearance pathway*“ pod rukovodstvom dr Berislava V. Zloković i dr Selme Kanazir.

**Dr Selma Kanazir**, hvala Vam na konstantnoj brizi i toplini koju ste mi pružili. Na poverenju i pruženoj mogućnosti da odem u Ameriku i na razumevanju što se moj prvobitno kratkotrajni boravak od 6 meseci produžio do skoro 6 godina. Hvala Vam na pruženom znanju i savetima, naučnim i ličnim, na pokretačkoj energiji, na podršci i strpljenju da moj doktorski status u Beogradu ne pati, na prijateljstvu i što razdaljina nijednog trenutka nije uticala na naš odnos. Hvala što ste uvek nesebično odvajali vreme za mene i hvala Vam na svim druženjima na oba kontinenta.

**Dr Berislav V. Zloković**, hvala Vam najpre na ukazanoj prilici i poverenju da se uključim u izuzetne projekte koje vodite, da konstantno učim od Vas i da publikujem u svetskim časopisima. Hvala za pružene mogućnosti da steknem znanje, razvijem talente i ljubav prema nauci. Hvala Vam na dostupnosti, razumevanju, na podršci i savetima. Hvala Vam što ste me prihvatili u Vaš tim, kao i za sve fenomenalne događaje na koje ste me vodili – naučne i muzičke.

**Dr Milka Perović**, hvala ti na nesebičnoj eksperimentalnoj i moralnoj podršci i na prijateljstvu. Naročito hvala na ukazanom poverenju prilikom pisanja rada o dijetei, na strpljenju i istrajnosti, kao i na čitanju moje teze, diskutovanju i ispravljanju mog srpskog jezika. Znam da si imala pametnije stvari da radiš subotom uveče, hvala ti za požrtvovanost.

Moja draga profesorka **dr Nadežda Nedeljković**, ti si bila inicijalna inspiracija za moj naučno-istraživački rad još pred sam završetak osnovnih studija. Tvoja predavanja su uvek bila besprekorna, a najviše sam se divila jednostavnosti kojom si uspevala da objasniš komplikovane procese. Ti si prva uporedila nauku i kuvanje kao vrlo slične procese i svakim danom sam sve više uverena u tačnost te izjave. Hvala ti na apsolutnoj podršci i na brzim i detaljnim odgovorima na milion pitanja koja sam imala, naročito u toku poslednjih 5 godina.

**Dr Vesna Tešić**, hvala na podršci, iskrenosti i prijateljstvu. Na dugim i više nego potrebnim telefonskim razgovorima. I na tvojim kiflicama.

**Dr Sabera Ruždijić**, hvala Vam na podršci tokom studija, na podršci da dođem u Ameriku i na izlaženju u susret kada su u pitanju bili ispiti. Takođe hvala na zabavnim trenucima u San Francisku.

*Hvala svim profesorima na razumevanju i prilici da neke ispite položim preko seminara.*

*Hvala članovima laboratorija **dr Selme Kanazir i dr Berislava Zloković**, sa kojima sam imala priliku da sarađujem (i da se družim) u toku mog naučno-istraživačkog razvoja. Nataša, Kiki, Sanja, Smiljo, Kosara, Aleksandra, Deso, Velika Vesna, Željko i Marjana, hvala vam na mentorstvu, savetima i drugarstvu. Abhay, Kassandra, Mariangela, Maricarmen, Amy, Axel, Mikko, Erica, Ruu, Ashim, Melanie, Zhen, Sanket, Sam, Alex G., Alex A, Guisepppe, Yaoming, Matthew, Zhonghua, and Helen, thank you for all your support, knowledge, friendship and all the fun stuff we did together, especially our visits to Barbara's and for all the recipes (and protocols) we exchanged! Thank you for always making me feel like home. I am lucky to have met you all and I definitely made lifetime friends.*

*Hvala svim inspirativnim ljudima koje sam upoznala u toku poslednjih nekoliko godina, naročito **dr Maria Carrillo**.*

*Hvala **dr Miri Mihajlović i Jasni Kovačević**, koje su bile tu za sva moja pitanja i dileme.*

*Hvala profesorki **dr Jeleni Lozo** na brzim odgovorima na e-mejllove i atipičnim uverenjima koja su mi bila potrebna tokom boravka u Americi.*

*Hvala celoj **Studentskoj službi** Biološkog fakulteta.*

*Hvala celom IBISS-u, naročito Verki, Tanji, drugarima iz Laboratorije 30 i 25, i Laboratorije za populacionu genetiku na druženju, a **dr Pavlu Pavlović**, na razumevanju kada su bile u pitanju potvrde za američke vize.*

*Hvala **Mileni Jović**, najvećoj duši na svetu, na prijateljstvu, bezbrojnim skeniranim potvrdama, upisima godine i čuvanju mog indeksa i što me je neumorno podsećala koji je broj. Hvala **dr Sandra Schrenk, dr Nevena Todorović i dr Goran Vukotić** na prijateljstvu i podršci.*

*Hvala skajpu i viberu na besplatnim prekookeanskim pozivima.*

*Hvala najdivnijoj učiteljici joge, **Sam Barber**, koja mi je pomogla da dišem.*

*Hvala **Zori Mihajlović** i zvuku njenog klavira.*

*Hvala svim prijateljima, novim i starim, Srbima, Amerikancima, Meksikancima i Indijcima koji su bili uz mene.*

***Ed Zuniga**, my soul mate, thank you for the infinite love, support, care, patience and courage you have shown me. Thank you for all your help with the experiments, for understanding when our weekends get short because of them, thank you for all the late nights and for always waiting for me. Thank you for knowing better than me what I sometimes needed, and for putting up with all the craziness. Thank you for all the adventures, for constantly coming up with new songs and for making me laugh.*

*The most special thanks to our **Grumpy**, the ultimate soul healer. Without you, I wouldn't be able to cope with anything.*

*Beskrajno hvala najboljoj majci na svetu **Bosiljki** i najboljoj sestri (i najboljoj MoH!) **Milani** na ogromnoj podršci, ljubavi i strpljenju. Na razumevanju i konstantnom trudu da premostimo fizičku daljinu. Na njihovoj spremnosti da se nose sa svim „iznenađenjima“ koja sam im priredila. Na čokoladnoj torti u koferu. Hvala **Andělu** na nebu što me čuva. Ova teza je posvećena vama.*

# **Doprinos poremećaja krvno-moždane barijere patofiziologiji Alchajmerove bolesti u transgenim animalnim modelima**

## **Sažetak**

Krvno-moždana barijera (KMB) je ključna strukturna i funkcionalna prilagođenost krvnih sudova u centralnom nervnom sistemu, neophodna za njegovo normalno funkcionisanje. Osnovni zadatak KMB je da spreči slobodan prolazak humoralnih i hemijskih faktora i ćelija iz krvi u moždani parenhim i obrnuto. Periciti su ćelije koje naležu na endotelne ćelije krvnih kapilara, i zajedno sa endotelnim ćelijama, kao i proširenjima astrocitnih nastavaka i bazalnom membranom, čine KMB. Periciti, osim uloge u svim aspektima funkcionisanja i propustljivosti KMB, imaju ulogu u regulaciji protoka krvi, angiogeneze, čišćenja toksičnih materija iz mozga, neuroinflamaciji, kontrolišu ekspresiju proteina poreklom iz endotelnih ćelija koji ulaze u sastav adherentnih i čvrstih veza endotelnog sloja, a opisana su i njihova svojstva slična nervnim matičnim ćelijama.

Alchajmerova bolest (AB) je neurodegenerativno oboljenje i najčešći oblik demencije kod ljudi starijih od 65 godina. AB se na neuropatološkom nalazu karakteriše akumulacijom vanćelijskog amiloida  $\beta$  i unutarćelijskog tau proteina u moždanom tkivu, kao i gubitkom neurona. Dodatno, istraživanja su pokazala da se promene u moždanoj cirkulaciji, protoku krvi i propustljivosti kapilara mogu primetiti i pre pojave kliničke slike sporadičnog oblika AB.

Cilj ove teze je bio da se ispita integritet KMB i uloga pericita u prisustvu i odsustvu AB patologije. Dodatni cilj je bio i da se ispita uloga PICALM proteina, jer se pokazalo da mutacije u ne-kodirajućem regionu *PICALM* gena mogu da predstavljaju faktor rizika za razvoj AB u kasnijem dobu (eng. *late-onset*). Uloga PICALM-a je praćena zasebno na endotelnim ćelijama i neuronima, a ispitana je i posledica farmakološkog povećanja ekspresije PICALM-a na nivo amiloida  $\beta$ . Konačno, ispitana je dijetalna restrikcija kao potencijalna intervencija u cilju smanjenja patologije vezane za AB.

Da bi se ispitala uloga pericita korišćena su dva mišija modela: a) životinje koje imaju mutacije u receptoru PDGFR $\beta$ , koji je specifično eksprimiran na pericitima i vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama i ima ključnu ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa, diferencijacije, rasta i razvoja i b) novouspostavljeni model akutnog gubitka pericita. Dodatno, da bi se ispitali poremećaji KMB u AB, korišćene su transgene životinje kao modeli AB - Tg2576, 3xTg i 5XFAD koje imaju jednu ili više mutacija u genima amiloidnog prekursorog proteina i presenilina. Da bi se ispitale uloge PICALM-a u endotelnim ćelijama i neuronima, korišćeni su specijalni transgeni sojevi koji eksprimiraju Cre rekombinazu pod promotorom koji se specifično nalazi u endotelnim ćelijama (*Cdh5-Cre*) i neuronima (*Camk2a-CreER*), kako bi se osigurala specifična delecija PICALM-a iz ovih ćelija. Dijetalni režim ishrane svaki drugi dan (eng. *every-other-day*, EOD), je bio primenjen na ženke 5XFAD miševa. Svi eksperimenti su uključivali i odgovarajuće kontrolne životinje iz istog okota, a rezultati su prikupljeni analizom imunoblotova, imunohistohemijkih i histoloških bojenja, i testova ponašanja.

Rezultati su pokazali da hronični gubitak pericita dovodi do demijelinizacije neuronskih nastavaka u beloj masi mozga, što dovodi do poremećaja u ponašanju, a da akutni gubitak pericita u adultnom životu može da dovede do gubitka nervnih ćelija u korteksu i hipokampusu i poremećaja u memoriji koja zavisi od normalne funkcije hipokampusa. Ispitivanje propustljivosti KMB u modelima AB je pokazalo, pored „klasične“ patologije – akumulacije amiloida, i izraženu narušenost KMB, čak i pre gubitka neurona. Dalje su rezultati otkrili da je PICALM protein izuzetno važan za čišćenje amiloida iz moždanog parenhima i da farmakološko povećanje ekspresije PICALM-a dovodi do smanjene količine amiloida u mozgu. Takođe, prisustvo PICALM-a u neuronima je važno za normalno ponašanje i zdravlje neurona. Primena dijetalne intervencije nije pokazala pozitivne efekte na smanjenje AB patologije. Naprotiv, ovakva intervencija je izazvala veću inflamaciju i dovela do drastičnog pada sinaptičkih proteina i čak smrti neurona kod ženki 5XFAD soja.

Rezultati prikazani u ovoj disertaciji ukazuju na važnost održanja ne samo strukturnog integriteta KMB, već i optimalnog nivoa proteina koji ulaze u sastav ćelija KMB. Dodatno, rezultati ukazuju da promene na KMB mogu da dovedu do funkcionalnih promena i u odsustvu patologije izazvane A $\beta$ . Takođe, s obzirom da svi ispitani modeli AB imaju

promene na KMB, važno je da se uključi i ova komponenta prilikom dijagnostifikovanja AB. Na kraju, iako je dijetalna restrikcija u prethodnim rezultatima pokazala uglavnom odlaganje ili umanjenje AB patologije; pol i starost jedinke, kao i tip i dužina trajanja dijetalne restrikcije treba pažljivo da se uzme u obzir pre odluke da se uvede kao tretman.

Ključne reči: Periciti, Krvno-moždana barijera, Alchajmerova bolest, Životinjski modeli,

Učenje i pamćenje, Ponašanje

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Neurobiologija

# **Contribution of blood-brain barrier disruption to the pathophysiology of Alzheimer's disease in transgenic animal models**

## **Abstract**

The blood-brain barrier (BBB) is a key structural and functional adaptation of blood vessels in the central nervous system, necessary for its normal functioning. The basic task of BBB is to prevent the free passage of humoral and chemical factors and cells from the blood into the brain parenchyma and *vice versa*. Pericytes are cells that attach to the endothelial cells of the blood capillaries, and together with the endothelial cells, as well as astrocytic end-feet and the basement membrane, constitute BBB. Pericytes, in addition to their role in all aspects of the functioning and permeability of BBB, play a role in regulation of blood flow, angiogenesis, clearance of toxic substances from the brain, neuroinflammation, control the expression of various proteins in endothelial cells, especially adherent and tight junctions proteins of the endothelial layer, and their properties similar to nerve stem cells are also described.

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease and the most common form of dementia in people over 65 years of age. AD on neuropathological findings is characterized by accumulation of extracellular amyloid  $\beta$  and intracellular tau protein in brain tissue, as well as neuronal loss. In addition, studies have shown that changes in cerebral circulation, blood flow, and capillary permeability can be observed even before the onset of clinical presentation of sporadic AD.

The aim of this thesis was to investigate the integrity of BBB and the role of pericytes in the presence and absence of AD pathology. Additional aim was to investigate the role of PICALM proteins, as it has been shown that mutations in the non-coding region of the PICALM gene may represent a risk factor for the development of late-onset AD. The role of PICALM was studied separately on endothelial cells and neurons, and the consequence of the pharmacological increase in PICALM expression to amyloid  $\beta$  levels was

examined. Finally, dietary restriction was examined as a potential intervention to reduce AD-related pathology.

Two mouse models were used to examine the role of pericyte: a) animals that have mutations in the PDGFR $\beta$  receptor, which is specifically expressed on pericytes and vascular smooth muscle cells and plays a key role in cell cycle regulation, differentiation, growth and development, and b) newly established model of acute pericyte loss. Additionally, to examine KMB disorders in AD, transgenic animals were used as models of AD - Tg2576, 3xTg, and 5XFAD that have one or more mutations in the genes of amyloid precursor protein and presenilin. To examine the roles of PICALM in endothelial cells and neurons, special transgenic strains expressing Cre recombinase were used under a promoter specifically found in endothelial cells (*Cdh5-Cre*) and neurons (*Camk2a-CreER*), to provide specific deletion of PICALM from these cells. Every-other-day (EOD) diet regimen was administered to female 5XFAD mice. All experiments included appropriate control animals from the same litter, and the results were acquired by immunoblot analysis, immunohistochemical and histological staining, and behavioral tests.

The results showed that chronic loss of pericytes leads to demyelination of neural processes in the brain white matter, which leads to behavioral deficits, and that acute loss of pericytes in adult brain can lead to loss of neurons in the cortex and hippocampus, and hippocampal-dependent memory deficits. Analysis of BBB permeability in AD models revealed, that in addition to "classical" pathology - amyloid accumulation, there is a significant BBB breakdown, which often occurs even before neuronal loss. The results further revealed that the PICALM protein is extremely important for the clearance of amyloid from the brain parenchyma and that the pharmacological increase in PICALM expression leads to a decreased level of amyloid in the brain. Also, the presence of PICALM in neurons is important for the normal behavior and neuronal health. And lastly, the use of dietary intervention showed no positive effects on the reduction of AB pathology. On the contrary, such an intervention caused greater inflammation and led to a drastic fall in synaptic proteins and even neuronal death in females of the 5XFAD strain.

The results presented in this dissertation indicate the importance of maintaining not only the structural integrity of BBB, but also the optimal level of proteins expressed within

different cells of BBB cells. In addition, the results indicate that changes in BBB can lead to functional changes even in the absence of pathology caused by A $\beta$ . Also, since all AD models tested in this study showed BBB breakdown, it is important to include this component when diagnosing AD. Lastly, although dietary restriction in the previous results showed a major delay or reduction of AD pathology; the sex and age of the individual as well as the type and length of dietary restriction should be carefully considered before deciding to introduce it as a treatment.

Key words: Pericytes, Blood-brain barrier, Alzheimer's disease, Animal models, Learning and memory, Behavior

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Neurobiology

## LISTA SKRAĆENICA

- $\alpha$ SMA – glatki mišićni aktin  $\alpha$
- 4-OHT - 4-hidroksitamoksifen
- A $\beta$  - amiloid beta
- AB – Alchajmerova bolest
- ADAB - autozomalno dominantna AB
- AL – lat. *ad libitum*
- AMPA – amino-3-hidroksi-5-metil-izoksazol propionska kiselina
- APP – amiloidni prekursorski protein
- AQP-4 – akvaporin 4
- BDNF – faktor rasta poreklom iz mozga
- BSA – goveđi serum albumin
- BSA – normalni goveđi serum
- CA – lat. *cornu ammonis*
- CAA – cerebralna amiloidna angiopatija
- CaMKIIa – kalcijum/kalmodulin - zavisna protein kinaza IIa
- CC – lat. *corpus callosum*
- CNS – centralni nervni sistem
- CORT – kortikosteron
- CSPG4 – hondroitin sulfatni proteoglikan 4
- Ctx – korteks
- DHA – dokozaheksaenska kiselina
- DMN – podrazeumevane mreže (eng. *default mode network*)
- DT – toksin difterije
- DTR – receptor toksina difterije
- EAAT2 – transporter ekscitatornih amino kiselina
- EOD – svaki drugi dan (eng. *every-other day*)
- FDA – administracija za hranu i lekove
- FR – restrikcija hrane

GAP43 – protein 43 asociran sa rastom  
GAPDH – gliceraldehid 3-fosfatna dehidrogenaza  
DAPI – 4', 6 – diamidino-2-fenilindol  
GFAP – glijski fibrilarni kiseli protein  
GRP75 – protein regulisan glukozom 75  
GWAS – studije vezane za genom  
Hpp – hipokampus  
HSP70 – protein toplotnog stresa 70  
i.p. - intraperitonealno injeciranje  
Iba-1 – jonizovani adapter koji vezuje kalcijum  
iDTR – indukovani receptor difterije toksina  
KMB – krvno-moždana barijera  
MAM – membrane asocirane sa mitohondrijama  
MAP2 – protein asociran sa mikrotubulama 2  
MAPK – mitogenom aktivirana protein kinaza  
MBP – mijelin bazni protein  
NeuN – neuronski nuklearni antigen  
NGF – nervni faktor rasta  
NMDA - N-metil-D-aspartat  
OCT – optimalna temperatura sečenja  
OPC – oligodendrocitne prekursorske ćelije  
PBS – natrijumski fosfatni pufer  
PCR – lančana reakcija polimeraze  
PDGFR $\beta$  - receptor faktora rasta beta poreklom iz trombocita (eng. *platelet derived growth factor receptor  $\beta$* )  
PFA - paraformaldehid  
PICALM – fosfatidil-inozitol vezujući klatrin sastavni protein (eng. *phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein*)  
PSD – postsinaptička gustina  
PSD95 – protein 95 postsinaptičke gustine

PTN – plejotrofin

ROS – reaktivne kiseonične vrste

SDS-PAGE – natrijum dodecil sulfat poliakrilamid elektroforeza

siRNA – male interferišuće RNK

SNP – polimorfizmi u jednom nukleotidu

sPDGFR $\beta$  - solubilni receptor faktora rasta beta poreklom iz trombocita

TBS – Tris - natrijumski pufer (eng. *Tris-buffered saline*)

TBST – Tris - pufer sa deterdzentom (eng. *Tris-buffered saline Tween 20*)

TNF $\alpha$  - tumor nekroze faktor alfa

VSD – boja osetljive na voltažu (eng. *voltage sensitive dye*)

ZO1 – zonula okludens 1

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Alchajmerova bolest</b> .....	<b>1</b>
1.1.1. Amiloidna hipoteza .....	3
1.1.2. Nasledna osnova Alchajmerove bolesti .....	5
1.1.3. Transgeni modeli Alchajmerove bolesti .....	8
1.1.4. Kliničke studije .....	10
<b>1.2. Krvno-moždana barijera</b> .....	<b>11</b>
1.2.1. Metodologija izučavanja krvno-moždane barijere .....	13
1.2.2. Vaskularna hipoteza Alchajmerove bolesti .....	15
1.2.3. Periciti .....	17
1.2.3.1. PDGFR $\beta$ -PDGFBB signalni put .....	20
<b>1.3. Terapeutici koji ciljaju krvno-moždanu barijeru</b> .....	<b>21</b>
<b>1.4. Vaskularni faktori rizika, faktori sredine i životni stil</b> .....	<b>25</b>
1.4.1. Ne-farmakološke intervencije i dijetalni suplementi .....	26
1.4.2. Restrikcija hrane .....	27
<b>2. CILJ RADA</b> .....	<b>29</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>32</b>
<b>3.1. Eksperimentalne životinje</b> .....	<b>32</b>
<b>3.2. Određivanje genotipa</b> .....	<b>33</b>
<b>3.3. Restrikcija hrane</b> .....	<b>34</b>
<b>3.4. Tretman supstancom T-65</b> .....	<b>35</b>
<b>3.5. Tretman tamoksifenom i difterija toksinom</b> .....	<b>35</b>
<b>3.6. Praćenje ponašanja životinja</b> .....	<b>36</b>
3.6.1. Test iskopavanja peleta .....	36
3.6.2. Test pravljenje gnezda .....	37
3.6.3. Test zakopavanja klikera .....	38
3.6.4. Test otvorenog polja .....	39
3.6.5. Test prepoznavanja novog objekta ili lokacije .....	39
3.6.6. Test uslovljavanja straha (testiranje dugotrajne i sposobnosti prisećanja) .....	40
3.6.7. Radijalni lavirint .....	41

3.6.8.	Rotarod .....	42
3.6.9.	Kompleksni točak za trčanje .....	42
3.6.10.	Test hodanja po gredi .....	43
3.6.11.	Uklanjanje adheziva .....	43
<b>3.7.</b>	<b>Merenje protoka krvi u mozgu .....</b>	<b>44</b>
<b>3.8.</b>	<b>Prikupljanje uzoraka .....</b>	<b>45</b>
3.8.1.	Transkardijalna perfuzija .....	45
3.8.2.	Izolacija moždanog tkiva .....	45
<b>3.9.</b>	<b>Određivanje nivoa proteina Western blot analizom .....</b>	<b>45</b>
3.9.1.	Izolovanje ukupnih proteina iz mozga .....	45
3.9.2.	Određivanje koncentracije proteina u totalnim ćelijskim ekstraktima .....	46
3.9.3.	Elektroforeza proteina .....	46
3.9.4.	Elektrotransfer proteina .....	47
3.9.5.	Imunološka detekcija proteina specifičnim antitelima – Western blot metoda .....	47
3.9.6.	Semikvantitativna analiza imunoblotova .....	49
<b>3.10.</b>	<b>Histološke analize .....</b>	<b>49</b>
3.10.1.	Priprema uzoraka za imunohistohemijsku analizu .....	49
3.10.2.	Imunohistohemijsko obeležavanje .....	49
3.10.3.	Kvantifikacija broja Iba-pozitivnih mikroglijskih i GFAP-pozitivnih astrocitnih ćelija .....	52
3.10.4.	Kvantifikacija zastupljenosti amiloid- $\beta$ depozita i plaka obeleženih sa Tioflavin S bojom .....	52
3.10.5.	Kvantifikacija nivoa fibrinogena i IgG .....	52
3.10.6.	Kvantifikacija cerebralne amiloidne angiopatije .....	53
3.10.7.	Kvantifikacija pokrivenosti krvnih sudova pericitima .....	53
3.10.8.	Određivanje i kvantifikacija depozita hemosiderina .....	54
3.10.9.	Određivanje PICALM signala u MAP2-pozitivnim neuronima .....	54
3.10.10.	Određivanje broja NeuN-pozitivnih i NeuN/tdTomato-duplo pozitivnih ćelija, kao i SMI312 i MBP-pozitivnog signala .....	54
<b>3.11.</b>	<b>Određivanje koncentracije humanog A<math>\beta</math>42 ELISA metodom .....</b>	<b>55</b>
<b>3.12.</b>	<b>Statistička i grafička obrada rezultata .....</b>	<b>55</b>
<b>4.</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>56</b>
<b>4.1.</b>	<b>Nedostatak pericita dovodi do deficita u ponašanju u odsustvu patologije izazvane <math>\beta</math>-amiloidom .....</b>	<b>56</b>
4.1.1.	Karakterizacija životinjskog modela hroničnog gubitka pericita .....	56
4.1.1.1.	Karakterizacija KMB .....	56
4.1.1.2.	Gubitak pericita ne dovodi do promena u ponašanju u testu generalne aktivnosti .....	59
4.1.1.3.	Gubitak pericita ne dovodi do promena u ponašanju u sensorimotornim testovima .....	61
4.1.1.4.	Gubitak pericita dovodi do promena u ponašanju u rotarod testu i testu trčanja na kompleksnom točku .....	62
4.1.1.5.	Gubitak pericita dovodi do deficita u povlačenja memorije u uslovljavanju straha .....	65
4.1.1.6.	Gubitak pericita dovodi do oštećenja bele mase .....	66
4.1.2.	Karakterizacija životinjskog modela akutnog gubitka pericita .....	67
4.1.2.1.	Akutni gubitak pericita dovodi do gubitka neurita i smrti neurona .....	69

4.1.2.2.	Akutni gubitak pericita dovodi do deficita u pamćenju.....	71
<b>4.2.</b>	<b>Narušenost strukturnog integriteta krvno-moždane barijere u različitim modelima</b>	
	<b>Alchajmerove bolesti .....</b>	<b>74</b>
4.2.1.	Tg2576 i 3xTg-AD modeli .....	75
4.2.2.	5XFAD model.....	76
<b>4.3.</b>	<b>Uloga PICALM proteina u endotelnim ćelijama krvno-moždane barijere i neuronima.....</b>	<b>79</b>
4.3.1.	Povećana ekspresija PICALM proteina nakon tretiranja supstancom T-65 .....	79
4.3.2.	Delecija PICALM proteina u neuronima dovodi do gubitka neurona i poremećaja u ponašanju ..	83
<b>4.4.</b>	<b>Efekti restrikcije hrane na patologiju AB.....</b>	<b>90</b>
4.4.1.	Restrikcija hrane EOD ne menja zastupljenost A $\beta$ u korteksu i hipokampusu 5XFAD miševa ....	90
4.4.2.	EOD nema uticaja na integritet krvno-moždane barijere kod 5XFAD miševa .....	92
4.4.3.	EOD pogoršava inflamaciju kod 5XFAD miševa .....	94
4.4.4.	EOD dovodi do smanjenja ekspresije markera sinaptičke plastičnosti kod 5XFAD miševa .....	98
4.4.5.	EOD dovodi do povećanja broja distrofičnih neurita i gubitka neurona kod 5XFAD miševa .....	101
<b>5.</b>	<b>DISKUSIJA .....</b>	<b>103</b>
<b>5.1.</b>	<b>Uticaj hroničnog gubitka pericita KMB na neurone i ponašanje.....</b>	<b>103</b>
<b>5.2.</b>	<b>Uticaj akutnog gubitka pericita KMB na neurone i ponašanje .....</b>	<b>108</b>
<b>5.3.</b>	<b>Poremećenost KMB u modelima AB .....</b>	<b>110</b>
<b>5.4.</b>	<b>Uloga PICALM-a u AB .....</b>	<b>111</b>
<b>5.5.</b>	<b>Uticaj restrikcije hrane na patologiju 5XFAD ženki miševa .....</b>	<b>117</b>
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČAK .....</b>	<b>126</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>131</b>

# 1. UVOD

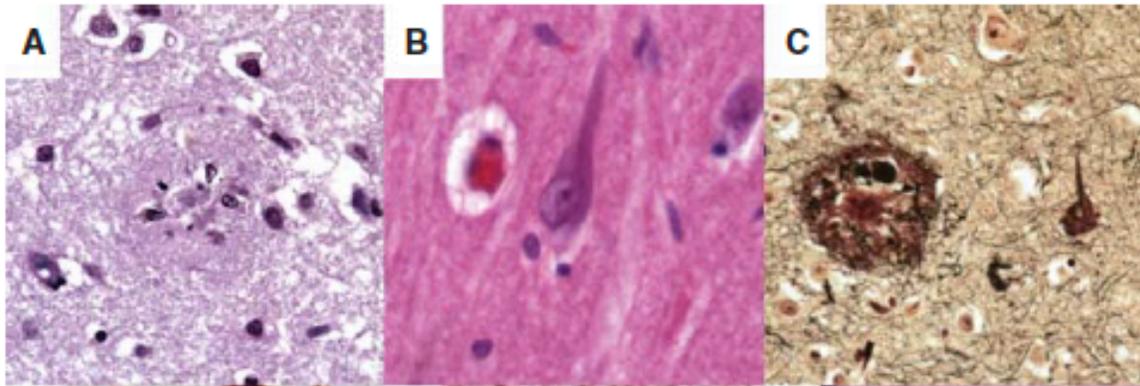
## 1.1. Alchajmerova bolest

Alchajmerova bolest (AB) je ireverzibilna neurodegenerativna bolest koju karakteriše progresivan gubitak kognitivnih sposobnosti i dalji poremećaji u ponašanju koji konačno dovode do gubitka sposobnost pacijenta da izvodi najjednostavnije svakodnevne aktivnosti i vodi brigu o sebi. AB predstavlja 60-80% svih demencija u populaciji starijih osoba i procenjeno je da trenutno više od 5,5 miliona Amerikanaca starijih od 65 godina boluje od demencije čiji je uzrok AB. AB je istovremeno i jedan od šest najčešćih uzročnika smrti u Sjedinjenim Američkim Državama (Alzheimer's Association, 2011). Većina slučajeva AB su sporadične forme koje se javljaju u kasnijem dobu (eng. *late-onset*), dok je samo mali broj slučajeva autozomalno dominantna AB (eng. *early-onset autosomal dominant Alzheimer's disease*) (Tanzi, 2012).

Dijagnoza AB je veoma kompleksna. Samo u pojedinim slučajevima, dijagnoza se pouzdano može postaviti tokom života, neurološkim snimanjem mozga (Panza et al., 2019). Naime, usled nedostatka odgovarajućih bioloških markera, postavljanje definitivne dijagnoze se i dalje uglavnom zasniva na histopatološkoj analizi nakon smrti kao i na posrednim kliničkim nalazima i porodičnoj istoriji pacijenta. Pokazano je, međutim, i da klinička slika i neuropatološki nalazi prilikom autopsije često nisu konzistentni (Jack et al., 2018), kao i da se tzv. senilne plake kao glavni patološka obeležja oboljenja mogu detektovati i kod osoba sa očuvanim kognitivnim sposobnostima. Sve ovo jasno ukazuje da je neophodno da se bolje okarakterišu postojeći biološki markeri, da se definišu novi, kao i da se razviju naprednije tehnike snimanja mozga. U zajedničkoj publikaciji Nacionalnog instituta za starenje SAD (eng. *National Institute on Aging, NIA*) i Asocijacije za Alchajmerovu bolest (eng. *Alzheimer's Association, AA*) postavljen je istraživački okvir u kome se predlaže da se termin AB prvenstveno odnosi na neuropatološke promene i da se AB definiše biomarkerima tokom života i prilikom autopsije, a ne kliničkim simptomima (Jack et al., 2018).

Psihijatar i neuropatolog, Alois Alzheimer je 1906. godine na sastanku nemačkih psihijataru u Tibingenu, prvi put opisao simptome pacijentkinje stare 56 godina, Auguste

Deter, koji danas svakako predstavljaju jedne od karakteristika Alchajmerove bolesti. Međutim, 1901. godine kada je dr Alzheimer prvi put upoznao Augustu koja se žalila najpre na probleme u spavanju, nemir i oslabljenoj memoriji, on je opisao njene neuropsihološke simptome kao što su zaboravljanje imena objekata, problem u čitanju i razumevanju i preliminarno dijagnostikovao njenu bolest kao arterosklerotsku atrofiju mozga i prepisao joj tople kupke koje bi joj ublažile nervozu. Nakon Augustine smrti, 1906. godine, uradio je histološko bojenje srebrom na presecima njenog mozga i prvi put opisao senilne plake, neurofibrilarnu klubad i amiloidnu angiopatiju – najupečatljivije karakteristike bolesti koja nosi njegovo ime, Alchajmerova bolest (**Slika 1**) (Bondi et al., 2017; Toodayan, 2016).



**Slika 1. Fotomikrografije patoloških lezija nađenih u Alchajmerovoj bolesti.** (A) Plake nakon bojenja čone kore velikog mozga hematoksilinom i eozinom (H&E) , (B) neurofibrilarna klubad u hipokampalnim piramidnim neuronima, H&E bojenje, (C) bojenje srebrom pokazuje plake i neurofibrilarnu klubad. Preuzeto i modifikovano iz Serrano-Pozo i saradnici, 2011 (Serrano-Pozo et al., 2011).

Pored senilnih plaka i neurofibrilarne klubadi, AB se karakteriše i intenzivnom gliozom i gubitkom neurona (Lane et al., 2018; Zlokovic, 2011). Ipak, sve je više dokaza i da vaskularna disfunkcija značajno doprinosi demenciji i AB (Snyder et al., 2015).

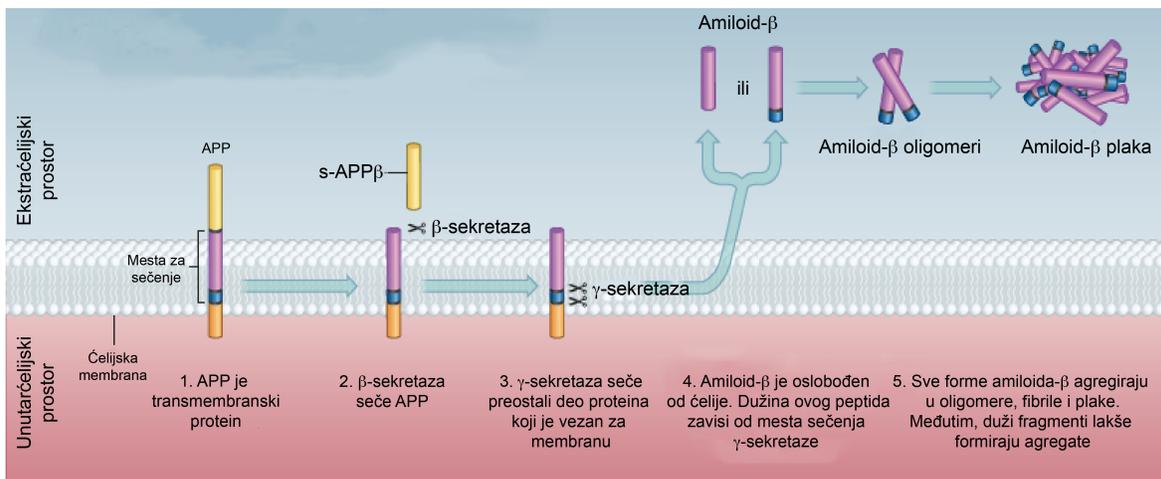
Vaskularni faktori rizika (hipertenzija, dijabetes) i neki od genetičkih faktora rizika za AB (kao što je gen apolipoprotein E  $\epsilon$ 4, *APOE4*), mogu dovesti do oštećenja moždanog krvotoka i cerebrovaskularnih poremećaja povezanih sa AB (Alzheimer's Association, 2011; Zlokovic, 2011, 2008). Razumevanje mehanizama koji su u osnovi vaskularne patofiziologije AB i nalaženje novih terapeutika koji bi se na njima zasnivali je jedan od svetskih naučnih prioriteta (Montine et al., 2014; Snyder et al., 2015).

### 1.1.1. Amiloidna hipoteza

Etiologija AB, kao i detaljni mehanizmi progresije bolesti, još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni. Prva od hipoteza, danas označena kao amiloidna hipoteza, postavljena je pre više od 25 godina. Po ovoj hipotezi, akumulacija amiloid beta peptida ( $A\beta$ ) u moždanom parenhimu je glavni uzrok AB (Makin, 2018). Istraživači su pretpostavili da nagomilavanje molekula  $A\beta$  i formiranje njegovih agregata, senilnih plaka, pokreće neurodegenerativne procese koji dovode do gubitka memorije i kognitivnih sposobnosti.

Neuropatološki nalaz mozga AB pacijenata, naime karakteriše prisustvo vanćelijskih agregata amiloida  $\beta$ , označenih kao senilne plake, kao i agregata tau proteina koji su označeni kao neurofibrilarna klubad. Iako su obe neuropatološke karakteristike opisane još 1906. godine, tek je 1984. godine George Glenner, izolovao  $A\beta$  i pronašao da je  $A\beta$  proizvod većeg proteina, amiloidnog prekursorskog proteina (APP) koji se u fiziološkim uslovima nalazi na ćelijskoj membrani. Dalja istraživanja su pokazala da je APP supstrat za više enzima:  $\alpha$ -sekretazu,  $\beta$ -sekretazu i  $\gamma$ -sekretazu i da različite kombinacije ovih enzima mogu dovesti do obrade APP tzv. neamiloidogenim ili pak amiloidogenim, patološkim putem koji rezultuje proizvodnjom  $A\beta$  (**Slika 2**). Ukoliko se se isecanje APP odvija posredstvom  $\alpha$ -sekretaze, nastaje solubilni peptid sAPP $\alpha$ , pri čemu u membrani ostaje tzv.  $\alpha$ -C-terminalni fragment CTF ( $\alpha$ CTF peptid). Aktivnošću  $\gamma$ -sekretaze, od  $\alpha$ CTF peptida dalje nastaju peptid P83, koji se izlučuje i brzo degraduje, kao i AICD (eng. *amyloid precursor protein intracellular domain*) koji ima funkciju u regulaciji unutarćelijskog prometa APP. Međutim, ukoliko se APP iseca aktivnošću  $\beta$ -sekretaze, dolazi do nastanka solubilnog peptida označenog kao sAPP $\beta$  i membranskog  $\beta$ CTF-a, koji je dalje supstrat za  $\gamma$ -sekretazu i od koga nastaje  $A\beta$

(Zhang et al., 2011). Iako je još dr George Glenner postavio hipotezu da je  $A\beta$  uzrok AB, amiloidna hipoteza nije bila široko prihvaćena sve dok nisu pronađene dominantne mutacije koje su bile odgovorne za nasledne forme AB. Prva mutacija je otkrivena 1991. godine i to u genu APP (Goate et al., 1991), a zatim su pronađene i mutacije u genima koji kodiraju komponente enzimskog kompleksa  $\gamma$ -sekretaze koga čine presenilin 1 (PSEN 1) i presenilin 2 (PSEN 2), a koje su bitne za mesto isecanja APP-a  $\gamma$ -sekretazom (Scheuner et al., 1996). Mutacije favorizuju proizvodnju dužih varijanti  $A\beta$  koje se lakše grupišu i na taj način omogućuju stvaranje većih struktura tzv. oligomera. Dalja akumulacija dovodi do produkcije ne-solubilnih fibrila, koji zatim agregiraju u senilne plake, karakteristike AB, koje su često okružene solubilnim oligomerima.



**Slika 2. Amiloidogeni put obrade APP.** Preuzeto i modifikovano iz Makin, 2018 (Makin, 2018).

Činjenica da su pronađene genske mutacije koje dovode do povećane akumulacije i agregacije  $A\beta$ , uslovile su postavljanje amiloidne hipoteze AB. Prema toj hipotezi, agregacija  $A\beta$  započinje kaskadu procesa koji dalje dovode do inflamacije, formacije neurofibrilarnih klubadi, disfunkcije sinapsi i ćelijske smrti, što direktno dovodi do demencije. Kako je familijalnu formu AB ponekad teško odvojiti od sporadične, prihvaćeno je da je  $A\beta$  prvi korak u lancu progresije bolesti za sve forme AB (Makin, 2018).

Dalja istraživanja su pokazala da neurotoksičnost A $\beta$  potiče i od difuznih molekula, kao i od oligomera A $\beta$ . Dinamička priroda ovih amiloidnih vrsta, kao i mehanizmi njihove toksičnosti su ipak i osnova kontroverzi u polju AB (Karran et al., 2011). Pokazano je tako da se plake mogu javiti i kod kognitivno normalnih osoba, da se prisustvo neurofibrilane klubadi javlja kod demencija i u odsustvu A $\beta$  plaka, kao i da kognitivni simptomi korelišu sa brojem i lokacijom tau agregata. Dodatno, mnogi lekovi (antitela, inhibitori  $\beta$ - ili  $\gamma$ -sekretaze) koji su specifično kreirani tako da ciljano deluju na amiloidni put su imali razočaravajuće ishode, što čini amiloidnu hipotezu nepotpunom i neodgovarajućom za sve oblike, kao i faze AB (Makin, 2018).

#### 1.1.2. Nasledna osnova Alchajmerove bolesti

Autozomalno dominantna Alchajmerova bolest (ADAB) je nasledna forma AB izazvana mutacijama u genima koji kodiraju APP, presenilin 1 i 2 (PSEN1 i PSEN2). ADAB slučajevi su zastupljeni sa oko 1% slučajeva svih oblika AB i ispoljavaju se rano u životnom dobu, pre 65. godine starosti) (Basun et al., 2008; Filley et al., 2007). Za nekoliko od APP i PSEN1 mutacija je pokazano da dovode do poremećaja krvno-moždane barijere i cerebrovaskularne patologije. Međutim, najveći broj slučajeva AB su sporadične forme, koje se javljaju u kasnijem dobu i čija se etiologija i principi nasleđivanja ne mogu u potpunosti korelisati. Mutacije u apolipoproteinu E4 (*APOE4*) su prvi i najviše dokumentovani faktori rizika za sporadičnu AB (Holtzman et al., 2012). Pokazano je da mutacije u APOE4 dovode do oštećenja krvno-moždane barijere, vaskularne patologije i smanjenog uklanjanja A $\beta$  kroz krvno-moždanu barijeru (Sweeney et al., 2019). GWAS studije (eng. *genome-wide association studies*) su identifikovale mnoge dodatne lokuse asocirane sa AB, uključujući *PICALM*, *CLU*, *ABCA7*, *SORL1*, *CR1*, *TREM2* i *BINI* gene (Sweeney et al., 2019).

#### Amiloidni prekursorski protein (APP)

Prijavljeno je oko 40 mutacija u APP-u za koje je pokazano da mogu biti u osnovi AB (Bateman et al., 2011). Mutacije u APP mogu dovesti do cerebrovaskularne patologije, uključujući oštećenje KMB i cerebralnu amiloidnu angiopatiju (CAA) (Sweeney et al., 2019). CAA je uzrokovana depozitima A $\beta$  u zidu krvnih sudova malih arterija i kapilara i

razvija se kao rezultat poremećenog balansa između proizvodnje i uklanjanja A $\beta$ , a pre svega nepravilnog transvaskularnog i perivaskularnog uklanjanja A $\beta$  iz mozga (Sweeney et al., 2019). CAA je najposredniji uzrok degeneracije glatkih mišićnih ćelija krvnih sudova što je povezano sa oštećenjem KMB na nivou arterija i arteriola i koje se manifestuje mikrokrvaranjima, infaktom, promenama u beloj masi i kognitivnim problemima (Saito and Ihara, 2016). Osobe sa vaskulotropnim APP mutacijama u regionu A $\beta$ 21-23, uključujući tzv. *Dutch* (E693Q), *Arctic* 856 (E693G), *Iowa* (D694N) i italijansku (E693K) mutaciju razvijaju izraženu CAA, što dalje dovodi do obimne cerebrovaskularne patologije (Sweeney et al., 2019). Za razliku od vaskulotropnih mutacija, N-terminalne mutacije APP kao što je *Swedish* (KM670/671NL) mutacija, kao i C-terminalne mutacije uključujući A713T, A714I, A714A, V715M (*French*), V715A (*German*), I716V (*Florida*), I716T, V717I (*London*), V717F (*Indiana*), V717G, V717L, i L723P (*Australian*) mutacije dovode do abnormalne i povećane produkcije A $\beta$  usled remećenja  $\beta$ - i  $\gamma$ -sekretazne aktivnosti u obradi APP i imaju manje zastupljenu CAA i cerebrovaskularnu patologiju (Sweeney et al., 2019). Mutacija na N-terminusu, označena kao *Icelandic*, međutim, dovodi do smanjene produkcije A $\beta$  u parenhimu, ali i do značajne CAA i vaskularne patologije (Jonsson et al., 2012; Kero et al., 2013).

#### Presenilini (*PSEN1* i *PSEN2*)

Do danas je otkriveno 228 *PSEN1* mutacija koje uzrokuju ADAB (Sweeney et al., 2019). *PSEN1* je katalitička komponenta  $\gamma$ -sekretaze i mutacije u *PSEN1* genu povećavaju proizvodnju dužeg A $\beta$  peptida, dovodeći do brže konverzije solubilnog u fibrilarni A $\beta$ 42 što pospešuje nagomilavanje amiloida u parenhimu mozga (Makin, 2018; Sweeney et al., 2019). Pojedine od *PSEN1* mutacija dovode do veoma rane ADAB (<35 godinastarost) (Filley et al., 2007; Karch et al., 2014). Nosioци ovih mutacije imaju izrazito oštećenu KMB, cerebrovaskularnu disfunkciju, CAA, oštećenje moždanica i smanjen transport <sup>18</sup>F-fluorodeoksiglukoze kroz KMB (Sweeney et al., 2019). *PSEN2* mutacije su zastupljene kod oko 5% svih ADAB slučajeva, od kojih su najčešće mutacije M239V i N141I. Kod nosilaca ovih mutacija se javlja značajna CAA, hemoragički šlog, iako su retko prisutni parenhimalni amiloidni depoziti kao i tau neurofibrilarna klubad (Sweeney et al., 2019).

### Apolipoprotein E4 (APOE4)

Pokazano je da su mutacije u APOE4 genu dominantan faktor rizika sporadične AB (Nelson et al., 2016; Sweeney et al., 2019). Jedna kopija *APOE4* povećava rizik za oko 3,8 puta, dok dve kopije povećavaju rizik za AB oko 12 puta u poređenju sa mutacijama u *APOE3*. Za APOE4 mutacije je pokazano da dovode do toksičnih efekata na cerebrovaskularni sistem i neurone, a pokazan je i uticaj na proces eliminacije A $\beta$ , njegovo deponovanje i neurodegeneraciju asociranu sa tau proteinom (Sweeney et al., 2019). APOE u mozgu se primarno sintetiše od strane astrocita i mikroglije, a za APOE3 je pokazano da pospešuje razgradnju A $\beta$  u mikrogliji, i to mnogo efikasnije od APOE4 (Jiang et al., 2008; Vanlandewijck et al., 2018).

### Fosfatidil-inozitol vezujući klatrin sastavni protein (PICALM)

Većina SNP polimorfizamau *PICALM* genu nalazi se izvan kodirajućeg regiona i utvrđena je njihova veza sa kasnijim oblicima AB. Aleli *rs3851179* i *rs10792832* dovode do smanjene ekspresije izoforme 2 *PICALM* gena u čeonom i slepoočnom korteksu, što ukazuje da smanjeni nivoi PICALM-a mogu povećati rizik pojave AB (Sweeney et al., 2019; R. S. Thomas et al., 2016). N-kraj PICALM proteina sadrži NH<sub>2</sub>-domen za vezivanje fosfatidilinozitol-4,5-difosfata, što dozvoljava PICALM-u da detektuje membransku površinu i reguliše veličinu klatrinskih vezikula (Itoh et al., 2001; Petralia et al., 2013). PICALM kontroliše internalizaciju receptora i njihov intracelularni promet omogućujući fuziju klatrinskih vezikula sa endozomom, koja je posredovana R-SNARE proteinima (Harel et al., 2008). Ove funkcije su centralne u eliminaciji A $\beta$  kroz KMB (Zhao et al., 2015b) i tau proteina putem autofagije (Moreau et al., 2014). PICALM se nalazi u velikim količinama u endotelu krvnih sudova, uključujući kapilare i njegova zastupljenost je redukovana kod AB pacijenata (Zhao et al., 2015b). Kao što je prikazano kod *Picalm*<sup>+/-</sup>; *APP*<sup>Swe</sup><sup>+/0</sup> miševa, smanjen nivo PICALM-a na KMB ubrzava amiloidnu patologiju i deficite u ponašanju (Zhao et al., 2015b). Endotelne ćelije koje su dobijene od humanih indukovanih stem ćelija (eng. *induced pluripotent stem cells*, iPSC) koje sadrže protektivni *rs3851179A* alel pokazuju povećanu ekspresiju PICALM-a i poboljšan transvaskularni transport i eliminaciju A $\beta$  kroz model KMB *in vitro*, u poređenju sa iPSC ćelijama koje su sa *rs3851179G* alelom rizika

(Zhao et al., 2015b). Dodatno, pojačana ekspresija PICALM-a u primarnim neuronima izolovanim iz pacova umanjuje toksičnost od solubilnih A $\beta$  oligomera (Treusch et al., 2011).

### Klasterin (CLU)

Nekoliko GWAS studija je identifikovalo SNP polimorfizme u *CLU* (tzv. i *APOJ*) genu kao značajne genetičke faktore rizika sporadične AB (Foster et al., 2019; Sweeney et al., 2019). Na koji način *CLU* doprinosi AB nije u potpunosti razjašnjeno, ali se pokazalo da pored uloge u transportu lipida, reciklaži membrana, ćelijskoj adheziji i apoptozi, *CLU* utiče i na transvaskularno uklanjanje A $\beta$  tako što pospešuje efluks A $\beta$ 42 kroz KMB. U mozgu, astrociti primarno sekretuju *CLU* koji se ponaša kao šaperon i vezuje solubilni A $\beta$  (Sweeney et al., 2019).

### 1.1.3. Transgeni modeli Alchajmerove bolesti

U potrazi za načinima ispitivanja molekularnih mehanizama u osnovi degeneracije nervnog tkiva koje dovodi do problema u memoriji, razvijeni su mnogi životinjski modeli koji sadrže mutacije u genima za koje je pokazano da u humanoj populaciji dovode do abnormalnog povećanja i akumulacije amiloida i tau proteina.

Tg2576 miševi (naziv soja B6;SJL-Tg(APP<sup>SWE</sup>)2576Kha), poznati i kao APP<sup>Swe</sup> soj je najbolje okarakterisan mišji model Alchajmerove bolesti. Ovaj model pojačano eksprimira mutiranu varijantu APP-a, izoformu 695, koji sadrži tzv. Švedsku mutaciju (KM670/671NL) i pod kontrolom je prionskog proteina hrčka koji dovodi do pojačanog nivoa proizvodnje A $\beta$  i amiloidnih plaka. Tg2576 model, odnosno njegova ekstenzivna amiloidna patologija i kognitivni deficiti, prvi su put okarakterisani 1996. godine (Hsiao et al., 1996). Tg2576 miševima karkaterišu problemi u kogniciji koji su u korelaciji sa starenjem, međutim, dok pojedine studije ukazuju da se prve promene na testovima ponašanja mogu uočiti ranije od 6. meseca starosti, neke studije tvrde da se promene u ponašanju javljaju tek kada su životinje stare oko godinu dana. Kod ovih životinja se naime javlja i degeneracija retine koja može biti uzrok suprotstavljenim rezultatima, posebno u testovima pamćenja gde vid igra ključnu ulogu. Akumulacija plaka se javlja počevši od oko 11. meseca starosti životinja, dok se gubitak dendritskih trnova u hipokampusu javlja kod životinja starih 4,5 meseca (Lanz et al.,

2003). Promene u dugotrajnoj potencijaciji se javljaju nakon 5. Meseca (Jacobsen et al., 2006). Zanimljivo je da kod ovih miševa ili ne dolazi ili se gubitak neurona javlja u vrlo malim količinama, vrlo kasno u životu (Irizarry et al., 1997).

3xTg-AD model (naziv soja B6;129-Psen1tm1MpmTg (APP<sup>Swe</sup>,tauP301L) 1Lfa/Mmjax) je mišji model AB kod koga su prisutne tri mutacije koje karakterišu familijalni oblik AB. Ove mutacije su u genu APP-a (tzv. Švedska mutacija), tau proteina asociranog sa mikrotubulama (*eng. microtubule associated protein tau*, MAPT - P301L) i presenilinu 1 (M146V). Geni koji nose navedene mutacije su pod kontrolom tzv. *Thy1.2* promotora i pojačano su eksprimirani samo u centralnom nervnom sistemu. 3xTg-AD miševе karakteriše patologija izazvana akumulacijom A $\beta$  i tau proteina. Vanćelijski depoziti A $\beta$  nastaju oko šestog meseca života i javljaju se pre svega u frontalnom korteksu, dok do taloženja tau proteina dolazi kasnije, kod životinja starih oko godinu dana (Oddo et al., 2003). Degeneracije sinapsi i problemi u dugotrajnoj potencijaciji, kao i problemi u kogniciji se javljaju pre pojave plaka i neurofibrilarne klubadi (Stover et al., 2015), što je verovatno posledica rane intraneuronalne akumulacije A $\beta$ .

5XFAD model (naziv soja B6SJL – Tg(APP<sup>Swe</sup>FILon,PSEN1\*M146L\*L286V) 6799Vas/Mmjax) je mišji model koji podražavanekoliko aspekata patologije AB. Ovaj soj karakteriše prisustvo pet familijalnih AB mutacija: tri u APP genu (Swedish K670N/M671L, Florida I716V i London V717I) i dve u PSEN1 genu (M146L and L286V), od kojih je svaki pod kontrolom mišjeg *Thy1* promotora koji uslovljava ekspresiju isključivo u centralnom nervnom sistemu (CNS). U isto vreme su zapravo generisana tri podsoja sa istim mutacijama koji su označeni kao: Tg6799, Tg7031 i Tg7092. Soj Tg6799 je najviše ispitan, pošto je utvrđeno da eksprimira najviše nivoe mutantnog APP-a. Ovaj soj veoma rano razvija intraneuronalnu A $\beta$  patologiju (kod životinja starosti od ~1,5 meseci), dok se vanćelijski depoziti A $\beta$  mogu uočiti počevši od oko 2. meseca starosti životinja, u V sloju korteksa i subikulumu hipokampusa (Oakley et al., 2006). Nivo A $\beta$ 40 je takođe povećan kod ovih životinja i raste tokom starenja, ali ne u tolikoj meri kao A $\beta$ 42 (odnos A $\beta$ 40:A $\beta$ 42 je oko 25 kod mladih životinja) (Oakley et al., 2006). 5XFAD miševе takođe karakterišu povišeni nivoi BACE1 enzima tokom starenja (Devi and Ohno, 2010). Astrogliaza i mikrogliaza počinju oko 2. meseca, u vreme pojava vanćelijskih plaka, a promene u sinaptičkim markerima se

javljaju počevši od oko 4. meseca starosti životinja (Oakley et al., 2006). Gubitak neurona se najpre javlja kod životinja starih 6 meseci (Eimer and Vassar, 2013), dok se promene u ponašanju uočavaju ranije (Kimura and Ohno, 2009; Oakley et al., 2006).

#### 1.1.4. Kliničke studije

Efikasna terapija za Alchajmerovu bolest još uvek ne postoji. Koriste se određeni lekovi koji pomažu u smanjanju stepena pojedinih simptoma, ali je pokazano da ovi lekovi ne dovode čak ni do usporavanja progresije bolesti. Trenutno, jedini lekovi izbora su inhibitori holinesteraze (donepezil, rivastigmine, galantamin) i antagonisti NMDA receptora, kao što je memantine (Panza et al., 2019; Zhang et al., 2017). Memantim je odobren još 2003. i od tada nijedan novi lek koji bi usporio gubitak memorije ili neurodegeneraciju nije prošao klinička testiranja. Mnogi su razlozi kojima se može objasniti ovaj neuspeh: neodgovarajući odabir pacijenata, varijabilnost u stepenu progresije bolesti, suboptimalna doza terapeuta, neodgovarajuće vreme intervencije, neodgovarajući parametri ishoda i niska osetljivost kliničke skale. Dodatno, nekompletno razumevanje patofiziologije AB je možda dovelo do selekcije pogrešnih ciljnih molekula (Panza et al., 2019).

Takođe, danas je poznato da akumulacija amiloida počinje još oko 15-20 godina pre prvih kliničkih simptoma, uglavnom zbog ne-efikasne eliminacije  $A\beta$  iz mozga (Panza et al., 2019). Shodno tome, moguće je da je kasno vreme otpočinjanja terapije, tj. već u fazi razvijene simptomatologije, razlog neuspeha dosadašnjih kliničkih studija. U Tabeli 1 prikazane su neke od kliničkih studija koje su bile sprovedene u cilju direktnog dejstva na  $A\beta$  i koje su dale razočaravajuće rezultate (Mullard, 2019). Među navedenim studijama je i ispitivanje efekata anti  $A\beta$  antitela, kao i inhibitora enzima  $\beta$ - i  $\gamma$ -sekretaza koje učesvuju u proizvodnji  $A\beta$ .

Terapeutik	Sponzor	Osobine	Faza Alchajmerove bolesti	Razlog za prekid studije
Aducanumab	Biogen/Eisai	Anti-A $\beta$ mAb	Rana	Nedostatak efikasnosti
Solanezumab	Eli Lilly	Anti-A $\beta$ mAb	Blaga do umerena, blaga i prodromalna	Nedostatak efikasnosti/strateški
Bapineuzumab	Elan/Wyeth/Pfizer	Anti-A $\beta$ mAb	Blaga do umerena	Nedostatak efikasnosti
Imunoglobulin	Baxter	Anti-A $\beta$ mAb	Blaga do umerena	Nedostatak efikasnosti
Lanabecestat	Astra Zeneca/Eli Lilly	BACE inhibitor	Rana i blaga	Nedostatak efikasnosti
Atabecestat	Janssen	BACE inhibitor	Asimptomatska ka riziku	Toksičnost
Verubecestat	Merck & Co.	BACE inhibitor	Blaga do umerena i prodromalna	Nedostatak efikasnosti
Semagacestat	Eli Lilly	$\gamma$ -sekretazni inhibitor	Blaga do umerena	Toksičnost i nedostatak efikasnosti
Tarenfluril	Myriad Genetics/Lundbeck	$\gamma$ -sekretazni inhibitor	Blaga	Nedostatak efikasnosti

**Tabela 1. Neuspešne kliničke studije.** Na tabeli su prikazane neke od kliničkih studija koje su zasnovane na amiloidnoj hipotezi i u kojima nije dobijen pozitivan rezultat, ili u kojima je čak došlo do pogoršanja kliničke slike. Preuzeto i modifikovano iz Mullard, 2019 (Mullard, 2019).

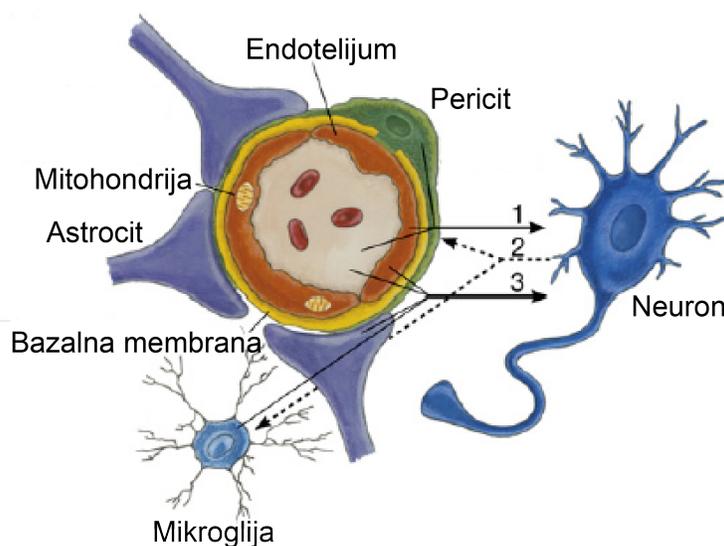
## 1.2. Krvno-moždana barijera

Krvno-moždana barijera (KMB) predstavlja strukturnu i funkcionalnu adaptaciju krvnih sudova mozga čija je osnovna uloga stroga kontrola prolaska molekula i ćelija iz krvi u mozak i obrnuto. KMB pre svega zaustavlja prolaz neurotoksičnih komponenti plazme, ćelija krvi i patogena u mozak (Montagne et al., 2017) i takvom regulacijom transporta molekula ka i izvan CNS, KMB održava strogo kontrolisanu hemijski sastav vanćelijskog miljea koji je neophodan za normalno funkcionisanje nervnog Sistema (Zhao et al., 2015a; Zlokovic, 2011). U patološkim stanjima, poremećaji i nefunkcionalnost KMB dovode do curenja toksičnih komponenti iz krvi u CNS, ćelijske infiltracije, poremećaja u transportu i eliminaciji štetnih molekula iz mozga, a što dalje prate redukcijai nepravilna regulacija protoka krvi u mozgu, dodatno doprinoseći neurološkim deficitima (Iadecola, 2004).

Gustina krvnih sudova u mozgu nije ravnomerna, i veća je u udelovima mozga koji su uključeni u obradu senzornih informacija, memoriju i kretanje (Kisler et al., 2017a). U fiziološkim uslovima, do ljudskom mozga se doprema 20% celokupnog krvotoka i potroši 20% od ukupne zapremine kiseonika i glukoze iz krvi (Iadecola, 2013). Kiseonik i glukoza se izuzetno brzo preuzimaju iz krvi, transportom kroz KMB, jer mozgu nedostaju rezervoari energije (Iadecola, 2004). Poznato je i da se u mozgu sisara brzina protoka krvi kroz moždane

arterije, arteriole i kapilare menja, odnosno da može biti inicirana u odgovoru na nervni stimulus, čime se omogućava povećana isporuka kiseonika i glukoze mehanizmom koji je poznat kao “neurovaskularno kuplovanje” (Iadecola, 2017; Kisler et al., 2017b).

Osnovna gradivna jedinica KMB je tzv. neurovaskularna jedinica (eng. *neurovascular unit*, NVU), u čiji sastav ulaze endotelne ćelije krvnih sudova, muralne ćelije - periciti i glatke mišićne ćelije, zatim perivaskularna stopala astrocita i neuroni (Slika 3). NVU doprinosi regulaciji propustljivosti KMB, neurovaskularnoj sprezi, interakcijama između ćelija i matriksa, obrtu neurotransmitera, angiogenezi i neurogenezi (Zlokovic, 2008).



**Slika 3. Šematski prikaz neurovaskularne jedinice.** Endotelne ćelije i periciti su razdvojeni bazalnom membranom, a nastavci pericita obavijaju većinu spoljašnje strane bazalne membrane endotelne ćelije. U tačkama kontakta, periciti direktno komuniciraju sa endotelnim ćelijama kroz tzv. peg-kontakte oblika čaše koji podsećaju na sinapse, dok astrocitna stopala oblažu zid krvnog suda. Mikroglia je u stanju „mirovanja“. U slučaju poremećaja koji dovode do promena u vaskulaturi, neurotoksini mogu da prođu KMB i dostignu svoje ciljne molekule u nervnom sistemu. Dodatno, pri oštećenju KMB, pro-inflamatorni signali ili smanjen protok krvi u kapilarima mogu da poremete normalnu sinaptičku transmisiju i započnu oštećenje neurona (Slika X, strelica 1), koji dalje oslobađaju signale koje susedna mikroglia može da detektuje (Slika X, strelica 2). Aktivirana mikroglia, astrociti i oštećeni endotel proizvode različite inflamatorne molekule dodatno

povećavaju povredu neurona (Slika X, strelica 3). Preuzeto i modifikovano iz Zlokovic, 2008 (Zlokovic, 2008).

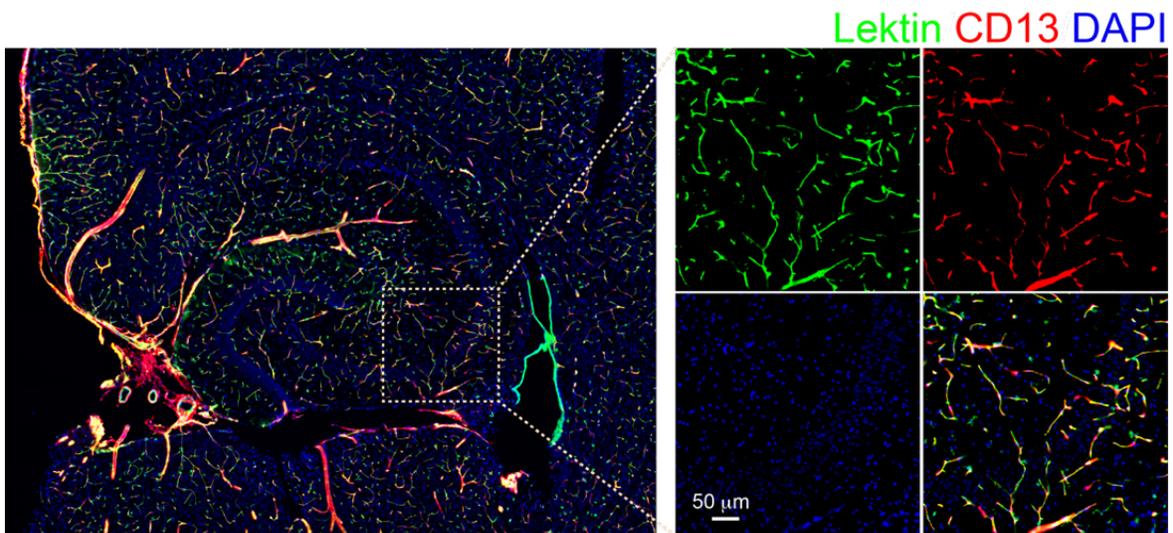
KMB je centralno postavljena u okviru NVU i formirana je od jednog sloja tesno-upakovanih endotelnih ćelija. U ljudskom mozgu, totalna dužina cerebralnih krvnih sudova je oko 650 kilometara. Kapilari doprinose ovoj dužini sa 85%, pružajući oko 12 m<sup>2</sup> endotelne površine dostupne za dostavu glukoza i kiseonika mozgu (Zlokovic, 2011). Na kapilarnom nivou, pored sloja endotelnih ćelija, u sastav KMB ulaze i periciti, perivaskularna stopala astrocita i bazalna membrana. Integritet KMB na kapilarnom nivou se održava aktivnošću pericita, koji zajedno sa glatkim mišićnim ćelijama i endotelnim ćelijama eksprimiraju različite transportere, receptore, proteine koji obavljaju funkciju pumpi, jonskih kanala, i regulatornih molekula, a čija ekspresija može varirati u okviru odgovarajućih zona duž arterio-kapilarno-venozne ose (Sweeney et al., 2019). Strana KMB koja naleže na moždani parenhim se označava kao abluminalna, dok je strana endotelnih ćelija koja je u kontaktu sa krvi označena kao luminalna.

#### 1.2.1. Metodologija izučavanja krvno-moždane barijere

Krvno-moždana barijera, ili bar neki od njenih aspekata se mogu istraživati upotrebom životinjskih modela *in vivo*, injeciranjem dekstrana i drugih molekula koji prolaze otvorenu KMB (Bell et al., 2012). KBM se, međutim, može ispitivati i *ex vivo*, na histološkim presecima (Halliday et al., 2016), kao i *in vitro* modelima “chip-a” KMB (eng. *BBB chip*) (Sances et al., 2018). Najveći broj dokaza patologije mikrokrvotoka u AB potiče iz histoloških analiza i analiza bioloških tečnosti (Montagne et al., 2016a). Na presecima mozga, integritet KMB se može analizirati imunohistohemijski, bojenjem markerima endotelnih ćelija i pericita (**Slika 4**) da bi se izmerila prekrivenost pericitima, kao i bojenjem lektinom i obeležavanjem marker proteina koji su poreklom iz krvi (fibrinogena, imunoglobulina, albumina ili trombina) zarad utvrđivanja stepena propustljivost KMB. Histološke boje, kao što su Prusko plavo koja obeležava molekule gvožđa za detekciju

mikrokrvarenja ili Evans plavo koja obeležava albumin, takođe omogućavaju detekciju propustljivosti KMB (Jacobson et al., 2016). Dalje se mogu imunohistohemijski obeležavati veze između endotelnih ćelija, čime se može ispitati strukturni integritet KMB (Halliday et al., 2016). Dodatno, kao mera KMB propustljivosti, često se koristi odnos koncentracije albumina u cerebrospinalnoj tečnosti naspram koncentracije albumina u serumu (Bowman et al., 2012; Halliday et al., 2013). Albumin je relativno veliki molekul (67 kDa) i veoma je zastupljen u krvi, pošto u fiziološkim uslovima ne prolazi KMB. Zbog toga se prisustvo albumina u cerebrospinalnoj tečnosti koristi kao indikator poremećaja KMB (Montagne et al., 2016a). Propustljivost KMB se može detektovati i putem solublnog receptora faktora rasta poreklom od krvnih pločica (eng. *soluble platelet derived growth factor receptor  $\beta$* , sPDGFR $\beta$ ), koji predstavlja isečenu formu receptora faktora rasta poreklom od krvnih pločica (eng. *platelet derived growth factor receptor  $\beta$* , PDGFR $\beta$ ), membranskog markera pericita i glatkih mišićnih ćelija KMB, u cerebrospinalnoj tečnosti. Rezultati su tako pokazali da su nivoi sPDGFR $\beta$  povišeni u Tg2576 miševima, kao i rano u AB, nezavisno i pre promena u A $\beta$ i tau proteinima (Montagne et al., 2015; Nation et al., 2019; Sagare et al., 2015).

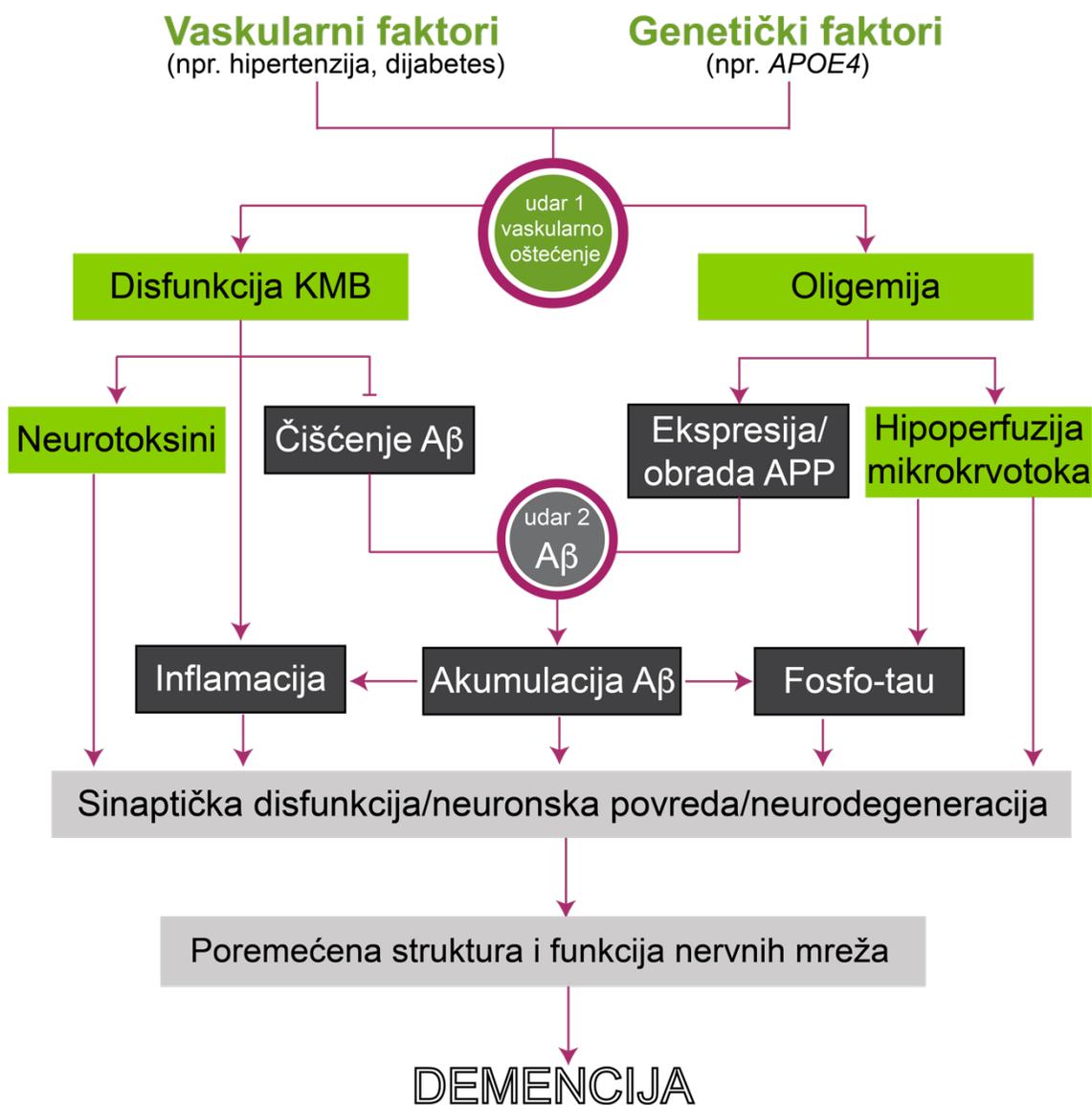
Razvijanje tehnika za snimanje mozga su takođe omogućile kvantitativnu i regionalnu analizu poremećaja krvnog sistema u mozgu tokom života ljudi (Montagne et al., 2016a). Montagne i saradnici su na ovaj način 2015. godine pružili prvi dokaz o poremećaju u propustljivost krvno-moždane barijere u hipokampusu tokom starenja, koje je pogoršano kod pacijenata sa blagim poremećajem kognicije (eng. *mild cognitive impairment*, MCI). Koristili su MRI tehniku, DCE-MRI (eng. *dynamic contrast enhanced-MRI*), koja je visoke rezolucije i istovremeno pratili konstantu transfera gadolinijuma iz krvi u mozak (Ktrans), regionalno i kvantitativno, sa rezolucijom dovoljno velikom da se mogu razaznati delovi hipokampusa (Montagne et al., 2015). Ova metoda je trenutno u kliničkim studijama za ishemički šlog (NCT00715533; NCT02077582), multiplu sklerozu (NCT01836055) i epilepsiju (NCT02531880; NCT00419874) (Sweeney et al., 2019).



**Slika 4. Imunohistohemijsko obeležavanje pericita markerom CD13 i krvnih sudova lektinom. DAPI boji kondenzovanu DNK, tj. jedra svih ćelija. Prikazan je horizontalni presek hipokampusa C57BL6 miša.**

#### 1.2.2. Vaskularna hipoteza Alchajmerove bolesti

Vaskularna hipoteza AB, poznata i kao vaskularna hipoteza u dva koraka (eng. *two-hit hypothesis*) pretpostavlja da cerebrovaskularno oštećenje (udar 1) predstavlja inicijalnu povredu koja je dovoljna da inicira povredu neurona i neurodegeneraciju koji dalje mogu da pospeše akumulaciju A $\beta$  u mozgu (udar 2) (**Slika 5**) (Sweeney et al., 2015; Winkler et al., 2014; Zlokovic, 2005). Poremećeni moždani krvotok, uključujući smanjenje moždanog protoka krvi i povećane propustljivosti KMB, može da dovede do akumulacije neurotoksičnih molekula iz cirkulacije (kao što su trombin, plazminogen i fibrinogen) i hipoperfuzije tkiva, što inicira oštećenja neurona (Montagne et al., 2017; Zlokovic, 2011). Dodatno, disfunkcionalni moždani krvotok može da utiče direktno na amiloidogeni put i poveća produkciju A $\beta$ , kao i da umanja stopu uklanjanja A $\beta$  iz mozga (Ramanathan et al., 2015). Proces koji se odigravaju na nivou KMB su dodatno pod uticajem vaskularnih, genetičkih, sredinskih i drugih faktora rizika vezanih sa životni stil (Nelson et al., 2016).



**Slika 5. Vaskularna hipoteza u dva udara.** Preuzeto i modificovano iz Nelson i saradnici, 2016 (Nelson et al., 2016).

### 1.2.3. Periciti

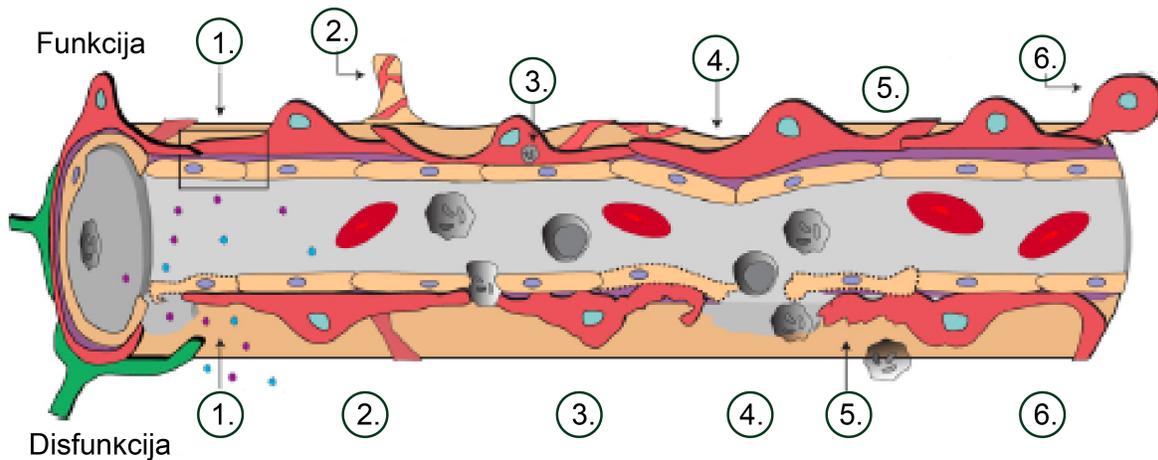
Periciti su muralne ćelije locirane na abluminalnoj strani KMB (Trost et al., 2016). Ukotvljeni su u bazalnu membranu malih krvnih sudova uključujući kapilare, pre-kapilarne arteriole i post-kapilarne venule. Kapilari nervnog tkiva sadrže izuzetno veliku prekrivenost pericitima (**Slika 6**), naročito u poređenju sa ostalim organima, što sugerise njihovu važnu ulogu u održavanju KMB (Obermeier et al., 2013). Ove ćelije je prvo opisao Charles Rouget, ali ih je Zimmermann 1923. godine prvi put nazvao „periciti“ i predložio nekoliko podtipova pericita na osnovu njihove morfologije, lokacije u okviru mreže krvnih sudova, i funkcije (Dore-Duffy, 2008; Krueger and Bechmann, 2010). Periciti eksprimiraju nekoliko kontraktilnih i citoskeletnih proteina kao što su  $\alpha$ -aktin glatkih mišićnih ćelija, vimentin, dezmin, miozin i nestin i antigeni ćelijske površine kao što su transmembranski hondroitin sulfatni proteoglikan NG2, faktor rasta poreklom iz krvnih pločica (eng. *platelet-derived growth factor receptor- $\beta$* , PDGFR $\beta$ ), aminopeptidaze A i N (CD13), regulator 5 signalinga G-proteina (eng. *regulator of G-protein signaling-5*, RGS5) i ćelijski površinski glikoprotein MUC18 (CD146), a nekih od ovih markera su pronađeni i u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama (eng. *vascular smooth muscle cells*, VSMCs) (Sweeney et al., 2016). Studije angioarhitekture korteksa kod miševa koji eksprimiraju fluorescentni protein pod kontrolom *NG2* (*Cspg4*) i *Pdgfrb* promotora su identifikovale nekoliko subpopulacija pericita, uključujući VSMC-pericit hibride na pre-kapilarnim arteriolama, spiralne pericite sa tankim nastavcima na kapilarima i mrežaste pericite sa zvezdanom morfologijom na post-kapilarnim arteriolama i venulama (Sweeney et al., 2016).



**Slika 6. Periciti korteksa miša.** 1 mm<sup>3</sup> korteksa miša je obeležen imunohistochemijski markerom pericita CD13. Tkivo je inkubirano 7 dana u rastvoru primarnog antitela i deterdženta. Primarno antitelo je detektovano sa sekundarnim antitelom poreklom iz kože obeleženim fluoroforom Alexa Fluor 568. Obeleženo tkivo je zatim upakovano u agarozni kalup i snimljeno na serijskom dvo-fotonskom mikroskopu (end. *serial two-photon microscope*, STP), koji istovremeno seče preseke slično vibratomu i snima u tri dimenzije slično konfokalnom mikroskopu. Nakon snimanja tkiva, mikrografije su rekonstruisane u tri dimenzionalne slike uz pomoć *Imaris* softverskog programa.

Periciti nastaju tokom embrionalnog i postnatalnog života (Armulik et al., 2011; Winkler et al., 2011). Tokom razvića, periciti CNS-a potiču iz neuroektodermalne nervne kreste (Etchevers et al., 2001). Ove neuroektodermalne ćelije mogu da se diferenciraju u pericite i VSMC i mogu da daju pericite nađene u retini i timusu (Müller et al., 2008; Trost et al., 2016). Osim nervne kreste, postoje mišljenja da periciti, makar delom, potiču i od mezoderma (Etchevers et al., 2001). Tokom neoangiogeneze u tumoru i prilikom indukcije citokinima, ćelije koštane srži su regrutovane i eksprimiraju NG2 (Lamagna and Bergers, 2006; Rajantie et al., 2004; Trost et al., 2016; Ziegelhoeffer et al., 2004), što sugeriše

mezodermalno poreklo pericita koje služe kao rezervoar pericita tokom patološki-izazvane neoangeogeneze (Trost et al., 2016)



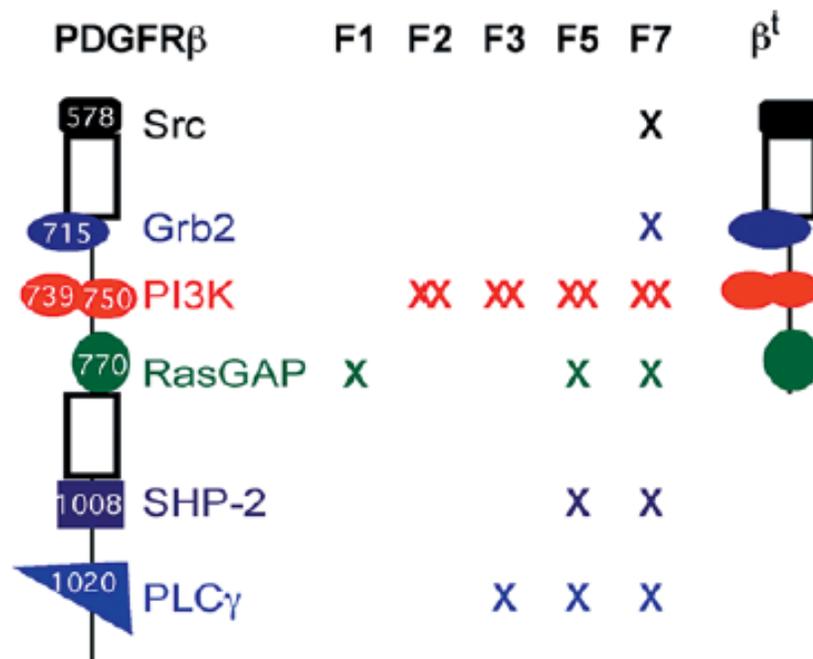
**Slika 7. Uloga pericita u fiziološkim i patološkim uslovima.** Funkcija: 1. Integritet KMB, 2. Angiogeneza, 3. Fagocitoza, 4. Protok krvi i moždana autoregulacija, 5. Neuroinflamatorni odgovor, 6. Sposobnost ponašanja sličnim multipotentnim stem ćelijama. Disfunkcija: 1. Oštećenje KMB i akumulacija neurotoksičnih molekula poreklom iz krvi, 2. Poremećena angiogeneza, 3. Ometena fagocitoza, akumulacija neurotoksina, 4. Disfunkcija i redukcija moždanog protoka krvi, 5. Povećan promet leukocita i gubitak privilegije imunskog odgovora, 6. Kompromitovana aktivnost stem ćelija. Preuzeto i modifikovano iz Sweeney i saradnici, 2016 (Sweeney et al., 2016).

Pod fiziološkim uslovima, kada su periciti funkcionalni, regulišu integritet KMB (Slika 7), kao što je ekspresija proteina koji ulaze u sastav čvrstih ili adherentnih veza i transcitozu kroz KMB (1); angiogenezu, kao što je remodelovanje mikrovaskulature, stabilnost i arhitekturu (2); fagocitozu, kao što je čišćenje toksičnih metabolita iz CNS-a (3); protok krvi u mozgu i dijametar kapilara (4); neuroinflamaciju, kao što je promet leukocita u mozak (5); i multipotentnu aktivnost karakterističnu stem ćelijama (6). Sa druge strane, pod patološkim uslovima disfunkcionalni periciti dovode do oštećenja KMB što dovodi do izlaženja neurotoksina koji su poreklom iz krvi (fibrinogen, trombin, plazminogen, slobodno gvožđe poreklom iz eritrocita, i antitela koja ne pripadaju u mozgu) (1); poremećenu

angiogenezu (2); poremećenu fagocitozu koja izaziva akumulaciju neurotoksina u CNS-u (3); disfunkcionalni moždani protok krvi i ishemijsku opstrukciju kapilara (4); povećan promet leukocita koji promovišu inflamaciju (5); i poremećenu sposobnost da se kao stem ćelije diferenciraju u neuronalne ili hematopoetske ćelije (6). Disfunkcionalnost pericita je prisutna u mnogim neurološkim bolestima i može da doprinese patogenezi bolesti (Sweeney et al., 2016)

#### 1.2.3.1. PDGFR $\beta$ -PDGFBB signalni put

PDGF familija sadrži četiri liganda (A-D) koji se vezuju za dva receptora ( $\alpha$  i  $\beta$ ) (Heldin, 2013). PDGF receptor, koje je receptor funkcionalno spregnut sa kinazom, postoji u vidu tri aktivna konformaciona dimera:  $\alpha\alpha$ ,  $\beta\beta$  i  $\alpha\beta$ . PDGF ligandi sa različitim afinitetom vezuju PDGF receptore: receptor PDGFR $\alpha\alpha$  vezuje PDGF-AA i PDGF-BB sa jakim, dok PDGF-CC vezuje sa slabim afinitetom; PDGFR $\beta\beta$  vezuje PDGF-BB sa jakim, a PDGF-DD sa slabim afinitetom (Heldin, 2013). Precizna prostorna i vremenska regulacija PDGF-BB signalizacije je obezbeđena uz pomoć retencionog motiva, regiona pozivno naelektrisanih amino kiselina na C-terminusu. Ovaj motiv vezuje negativno naelektrisane heparin sulfatne proteoglikane u vanćelijskom matriksu, što rezultuje retencijom PDGF-BB i generisanjem gradijenta koncentracije (Armulik et al., 2011). PDGF-BB se vezuje za PDGFR $\beta$ , izazivajući ne-kovalentnu dimerizaciju i autofosforilaciju receptora na 13 citoplazmatskih tirozinskih nastavaka, što aktivira PDGFR $\beta$  (Tallquist et al., 2003). Jednom aktivirane, određene fosforilisane tirozinske grupe PDGFR $\beta$  se vezuju za proteine koji sadrže specifični Src homologni domen 2 (SH2), kao što su fosfolipaza C $\gamma$ , Src familija kinaza, protein 2 vezan za receptor faktora rasta (eng. *growth factor receptor-bound protein 2*, Grb2), PI3K (eng. *phosphatidylinositol-3-OH kinase*), protein aktiviran GTPazom (GAP), SH2 tirozin fosfataze (SHP2) i Stat5. Ove interakcije dalje indukuju nishodne puteve, koji promovišu preživljavanje pericita, proliferaciju, migraciju i usmeravanje do zidova krvnih sudova (Sweeney et al., 2016; Tallquist et al., 2003; Winkler et al., 2011). Mnoge mutacije tirozinskih nastavaka na PDGFR $\beta$  receptoru su otkrivene i opisane (**Slika 8**).



**Slika 8. Aleli *Pdgfrβ*.** Šematski prikaz mutiranih alela generisanih u mišjem *PDGFRβ* genomskom lokusu. X predstavlja mutaciju na mestu vezivanja tirozina za odgovarajući molekul signalne transdukcije. F7 mutacija sadrži samo jedan mutiran alel na mestu koji vezuje Src familija kinaza, jer bi remećenje oba alela dovelo do potpunog odsustva kinazne aktivnosti. Skraćeni β<sup>t</sup> alel je kreiran delecijom i promenom okvira čitanja što je rezultovalo u stop kodonu 32 amino kiseline posle RasGAP-vezujućeg mesta. Preuzeto i modifikovano iz Tallquist i saradnici, 2003 (Tallquist et al., 2003).

### 1.3. Terapeutici koji ciljaju krvno-moždanu barijeru

Krvno-moždana barijera predstavlja najveći izazov za razvoj terapeutika za oboljenja centralnog nervnog sistema, uključujući AB, iz nekoliko razloga (Sweeney et al., 2019). Jedan od razloga je svojstvo barijere koje KMB poseduje i visoko efikasan efluks, omogućavajući KMB da odbaci većinu malih i većih terapeutskih molekula uključujući faktore rasta i antitela (Zhao et al., 2015a). Zatim, oštećenja KMB u patologiji dovode do akumulacije toksičnih produkata i makromolekula poreklom iz krvi, kao i imunski i inflamatorni odgovor, vaskularnu regresiju i lokalnu redukciju moždanog protoka krvi (Sweeney et al., 2016; Zhao et al., 2015a). Ove patološke promene na KMB ograničavaju

distribuciju neuroterapeutika u CNS-u remeteći difuziju kroz ekstraćelijski matriks ili protok instrasticijalne tečnosti (Furtado et al., 2018; Sweeney et al., 2018). Jedan od primera uspešnog prolaza kroz KMB je L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA) za tretman Parkinsonove bolesti, jer L-DOPA prolazi KMB vezujući se za LAT1 transporter (Pardridge, 2012), a razvijeni su i dodatni pristupi kojima se KMB može zaobići direktnim injekcijama u ventrikule ili spinalni kanal, ili nazalnom administracijom. Strategije za razvijanje terapeutika bazirani na KMB se mogu klasifikovati kao **a) Zaštita oštećene KMB** (*Zatvaranje KMB, Eliminacija posledica oštećenja KMB, Povećavanje funkcije čišćenja i Ćelijska terapija*) i **b) Korišćenjem KMB za dostavu terapeutika** (*Otvaranje KMB, Dostava pomoću koloidnih nosača, Korišćenje transporta preko nosača, Korišćenje transporta preko receptora i Dostava uz pomoć virusnih vektora*) (Sweeney et al., 2019).

#### **a) Zaštita oštećene KMB**

##### *Zatvaranje KMB*

Do danas, već nekoliko farmakoloških agenasa su pokazali da obnavljaju funkciju KMB u životinjskim modelima neuroloških oboljenja i neurodegeneracije. Aktivirani protein C (APC), na primer, pokazuje plejotropna blagotvorna dejstva uključujući zaštitu integriteta KMB, anti-inflamatorne efekte, neuroprotekciju, neuro- i angiogenezu (Zlokovic et al., 2005). U endotelnim ćelijama krvnih sudova u mozgu APC se vezuje za proteazom aktivirani receptor 1, PAR1, i dovodi do aktivacije  $\beta$ -arestina-2 signalne kaskade, što targetuje fosfatidilinozitol 3-kinazu (PI3K) i promoviše citoprotekciju i Rac1 GTPa što rezultira u zatvaranju KMB (Guo et al., 2013). 3K3A-APC, rekombinantna varijanta APC-a sa redukovanim antikoagulantnim aktivnostima, je uspešno kompletirala drugu fazu kliničkih studija za šlog (NCT02222714), i ima potencijal za traumatsku povredu mozga, amiotrofičnu lateralnu sklerozu i druga neurodegenerativna oboljenja (Lazic et al., 2019). Zatim, inhibicija CypA-MMP-9 degradujućeg puta KMB uz pomoć ciklosporina, inhibitora CypA, obnavlja KMB integritet i umanjuje neurodegenerativne promene u transgenim miševima koji nose humani APOE4 (Bell et al., 2012), a pokazano je da je CypA-MMP-9 kaskadni put aktiviran i kod ljudi koji nose *APOE4* alel i da je asociran sa oštećenjima KMB (Halliday et al., 2016).

### *Eliminacija posledica oštećenja KMB*

Kada je KMB otvorena, proteini iz plazme ulaze u moždani parenhim i često imaju toksične efekte na različite ćelijske tipove u CNS-a (Montagne et al., 2016a). Zbog toga, eliminacija toksina iz mozga predstavlja značajan terapijski pristup za neurodegenerativne bolesti. Na primer, fibrin i fibrinogen mogu da aktiviraju integrinske receptore na glijalnim ćelijama i neuronima i da spreče regeneraciju (Schachtrup et al., 2007), ili receptore na mikrogliji i makrofagama poreklom iz kosti i da pogoršaju neuroinflamaciju i aktiviraju antigen-prezentujuće gene (Ryu et al., 2015). Uklanjanje fibrinogena i sprečavanje njegove akumulacije u mozgu anksodrom, supstancom izolovanom iz otrova zmijske koja sprečava smanjuje nivo fibrinogena u krvi, možda umanjuje neuroinflamaciju i vaskularnu patologiju kod mišjih modela AB (Montagne et al., 2018; Sweeney et al., 2019).

### *Povećanje efikasnosti uklanjanja toksičnih materija*

KMB je glavno mesto za uklanjanje mnogih produkata poreklom iz mozga u krvotok, što je naročito važno u održavanju homeostaze nivoa A $\beta$  (Zlokovic, 2011). Protein LRP1 (eng. *lipoprotein receptor-related protein 1*) se eksprimira u endotelnim ćelijama i glavni je receptor za prenos A $\beta$  iz mozga u krv. Pokazano je da dostava LRP1 minigena u KMB pomoću virusnog vektora olakšava čišćenje A $\beta$  i smanjenje patologije (Winkler et al., 2015). Sa druge strane, blokiranje endotelnog RAGE receptora (eng. *receptor for advanced glycation end products*) dovodi do redukcije ponovnog ulaza A $\beta$  u mozak, inhibicije neuroinflamacije i poboljšava protok krvi u mišjem modelu AB (Deane et al., 2012, 2003). Mali molekuli inhibitori RAGE receptora su u fazi 3 kliničkih istraživanja kod pacijenata sa AB (NCT02080364). Takođe, i mašinerija transcitoze koja uključuje PICALM na nivou KMB može biti jedan od targeta za čišćenje A $\beta$  kroz KMB (Zhao et al., 2015a).

## *Ćelijska terapija*

Prekliničke studije na životinjama su pokazale da ćelijska terapija ima veliki potencijal za tretman CNS oboljenja i povrede (Sweeney et al., 2019). Transplantacija mezenhimskih i nervnih stem ćelija može da stabilise KMB, promoviše njen integritet i neuroprotekciju (Horie et al., 2011). Zatim, pokazano je da transplantacija pericita poreklom iz adipoznog tkiva u kičmenu moždinu omogućava produženje života miševa koji nose SOD1G93A mutaciju (Coatti et al., 2017). Genetičko inženjerstvo i editovanje pružaju nove mogućnosti da se poveća bezbednost ćelijske terapije, jer je pokazano da uklanjanje imunske barijere reprogramišući polimorfne MHC lokuse, povećava prihvatanje transplantata (Kelton et al., 2017).

### **b) Dostava lekova kroz KMB**

#### *Otvaranje KMB*

Privremeno otvaranje KMB može biti postignuto porastom osmotskog pritiskaili fokusiranim ultrazvukom (eng. *focused ultrasound*, FUS) (Kovacs et al., 2017; Rapoport, 2000). Međutim, posledice otvaranja KMB, naročito dugoročne, još uvek nisu pažljivo ispitane (Sweeney et al., 2019). Mikromehurići, koji se koriste u FUS metodologiji, mogu da indukuju inflamaciju u mozgu, koja je sličnih razmera kao u ishemiji ili traumatskoj povredi (Kovacs et al., 2017).

#### *Dostava pomoću koloidnih nosača*

Koloidni nosači (nanopartikule, polimeri, lipozomi i micidele) su postali jedno od najraznovrsnijih pristupa za dostavu komponenti i makromolekula u slabo dostupne regione kao što je mozak. Da bi prošle KMB, nanopartikule su ili negativno nalektrisane na površini, ili su sposobne da se vežu za receptore na površini, ili su upakovane oko metalnog jezgra i nose određene aktivne supstance kao što je npr. acetilholin, zatim lekove ili antitela (Leszek et al., 2017). Neke nanopartikule su već testirane u mišjim modelima AB (Martín-Rapun et al., 2017; Mudshinge et al., 2011).

### *Korišćenje transporta preko nosača*

L-DOPA je primer strukturnog analoga koji prolazi KMB korišćenjem LAT1 transportera (Pardridge, 2012). Nakon prolaska kroz KMB, L-DOPA je konvertovana u dopamin pomoću aromatične dekarboksilaze L-amino kiselina (Sweeney et al., 2019).

### *Transport preko specifičnih receptora na KMB*

Ovaj sistem je izuzetno selektivan zbog specifične interakcije između liganda i njihovih receptora i zbog prostorne distribucije receptora (na luminalnoj ili abluminalnoj strani KMB), što osigurava ekskluzivan ulaz esencijalnih peptida i proteina u mozak i efikasno čišćenje toksičnih materijala iz mozga u krv, pružajući ogromne mogućnosti za dostavu terapeutika (Sweeney et al., 2019). Neka od antitela, anti-TfR-BACE1 i anti-TfR-A $\beta$ , koja se vezuju za receptor transferin na KMB i na taj način prenose u mozak, su pokazala da dovode do smanjenja nivoa A $\beta$ u prekliničkim studijama a u razvoju su i kliničke aplikacije (Kanodia et al., 2016).

### *Dostava uz pomoć virusnih vektora*

Adeno-asocirani virus serotip 9 (AAV9), iako je jedan od najboljih vektora za dostavu kroz KMB i ima visoku stopu infektivnosti ćelija, njegov tropički repertoar je limitiran i favorizuje periferne organe (Sweeney et al., 2019). Inženjerskim dizajnom virusnog kapsida, nove varijante, kao što su AAVPHP.B (146) i AAV-PHP.eB, pružaju oko 40-puta veću dostavu u CNS nego *wild-type* verzije (Chan et al., 2017).

## **1.4. Vaskularni faktori rizika, faktori sredine i životni stil**

Pored genetičkih faktora rizika za AB, vaskularni faktori rizika kao što su hipertenzija, dijabetes, ateroskleroza, kao i traumatska povreda mozga i hiperhomocisteinemija mogu takođe da doprinesu demenciji i utiču na rizik razvijanja AB. Pokazano je da hipertenzija uzrokuje redukciju u moždanom protoku krvi i pogoršava reaktivnost cerebrovaskularnog sistema (Iadecola and Davisson, 2008). Dalje je pokazano da

je dijabetes tipa 2 glavni vaskularni faktor rizika koji doprinosi razvoju AB i da kod ovih pacijenata postoje promene u krvnoj mreži i povećanje propustljivosti KMB. Razlog patoloških promena u mozgu kod dijabetičara može biti povećan nivo RAGE receptora, oksidativni stres, smanjen transport insulina kroz KMB ili poremećen insulinska signalizacija (Nelson et al., 2016). Traumatska povreda mozga povećava produkciju A $\beta$  i povećava rizik od AB (Franzblau et al., 2013). Takođe, kod povrede, kao i kod AB, dolazi do curenja KMB i oštećenja neurovaskularne jedinice (Nelson et al., 2016).

Dodatno, uticaj životnog stila (obrazovanje, san, ishrana i fizička aktivnost) i sredine (zagađenje, obogaćenje sredine) mogu značajno da modifikuju rizik za demenciju. Pretpostavlja se da skoro polovina svih AB slučajeva potiče od faktora koji se donekle mogu kontrolisati, kao i da efikasna kontrola vaskularnih faktora, već postojećih bolesti ili psiholoških stanja, zajedno sa intervencijama u životnom stilu mogu pružiti efikasnu preventivnu strategiju u odlaganju početka ili progresiji AB (Nelson et al., 2016). Takođe, ne samo da je san poremećen kod AB, nego i poremećaji u spavanju, kao što je opstruktivna apnea (eng. *obstructive sleep apnea*, OSA) mogu da dovedu do AB. OSA dovodi do intermitentne hipoksije, oksidativnog stresa i povećane produkcije A $\beta$  (Pan and Kastin, 2014). Zagađenje vazduha takođe povećava rizik od AB i patologije slične AB (Nelson et al., 2016). Istraživanja su pokazala da srebro, bakar i aluminijum i aluminijum oksid mogu da oštete KMB, redukuju ekspresiju čvrstih veza između endotelnih ćelija, smanje moždani protok krvi i dovedu do sinaptičke disfunkcije i neurodegeneracije (Nelson et al., 2016).

#### 1.4.1. Ne-farmakološke intervencije i dijetalni suplementi

U AB postoji prodromalna faza koja traje decenijama pre pojave kliničkih simptoma i ne može klinički biti detektovana, a karakteriše se biohemijskim i kompleksnim ćelijskim promenama koje uključuju ranu neurovaskularnu disfunkciju (Kisler et al., 2017a; Sweeney et al., 2019, 2018) i dalju distrofiju neurona, astrogliozu i aktivaciju mikroglije (Dubois et al., 2014; Sperling et al., 2011). Pokazano je da terapije koje su fokusirane na prevenciju mogu biti efektivne jedino na početku biohemijskog stresa, kada nepovratne ćelijske promene još uvek nisu započete (De Strooper and Karran, 2016). Sinapse su jedne od prvih i najranjivijih

mesta za razvoj AB i gubitak sinapsi visoko koreliše sa kognitivnim problemima kod AB pacijenata (DeKosky and Scheff, 1990; Terry et al., 1991).

Dokozaheksaenoinska kiselina (DHA, eng. *docosahexaenoic acid*) je esencijalna omega-3 masna kiselina koja je kritična za formiranje nervnih sinapsi i za fluidnost membrane (Yassine et al., 2017) i glavni je sastojak ribljeg i maslinovog ulja. Istraživanja na transgenim 5XFAD miševima su pokazala da tretman ribljim uljemima važnu ulogu u modulaciji odgovora mikroglije/makrofagai smanjenju distrofije neurita, olakšavajući patologiju AB u presimptomatskoj fazi (Jović et al., 2019). Neke studije su pokazale da kod pacijenata postoji korelacija između količine unosa omega-3 masnih kiselina, uključujući i DHA, sa smanjenim rizikom od AB, dok su brojne kliničke studije su dale pomešane i nekonzistentne rezultate. Jedan od razloga može biti i odabir pacijenata, zato što je pokazano da nosioci *APOE4* alela imaju smanjenu dostavu DHA u mozak (Yassine et al., 2017). Dodatno, pokazano je da rezveratrol, biološki aktivni biljni fitoaleksin, može da prođe KMB i reguliše ekspresiju matriks metaloproteinaza, redukuje gubitak pericita, održi integritet KMB i promoviše čišćenje A $\beta$  (Nelson et al., 2016). Takođe, istraživanja su pokazala da kakao i mediteranska ishrana povoljno utiču na kogniciju (Nelson et al., 2016).

#### 1.4.2. Restrikcija hrane

Restrikcija hrane (eng. *food restriction*, FR) je najbolje opisan i dokumentovan ne-genetički i ne-farmakološki pristup u pokušaju poboljšanja zdravstvenog stanja i produženja života, pre svega odlaganjem bolesti koje se javljaju sa starenjem (Fontana and Partridge, 2015; Van Cauwenberghe et al., 2016). Poznati su tako brojni povoljni efekti, kako kalorijske restrikcije (eng. *caloric restriction*, CR), tako i intermitentne ishrane (eng. *intermittent feeding*, IF) poput ishrane svakog drugog dana (eng. *every-other-day feeding*, EOD), na različite organe, uključujući i mozak. Mehanizam dejstva nije u potpunosti izučen, ali se pretpostavlja da je u osnovi dejstvo restrikcije hrane kao stresa umerenog intenziteta koji pokreće adaptivne mehanizme odgovora na stress koji se odražavaju u npr. smanjenju nivoa proinflamatornih citokina, reaktivnih vrsta kiseonika, kao i povećanju osetljivosti na insulin (Martin et al., 2006). Neuroprotektivni efekti FR su potvrđeni i u nekoliko životinjskih

modela oštećenja CNS-a - modelima epilepsije, šloga, traumatske povrede mozga i neurodegenerativnih oboljenja (Arumugam et al., 2010; Bruce-Keller et al., 1999; Halagappa et al., 2007; Loncarevic-Vasiljkovic et al., 2012; Lončarević-Vasiljković et al., 2009). Dodatno, pokazano je i da je EOD u stanju da neutrališe starosno-zavisne promene u ekspresiji presinaptičkih proteina, kao i specifičnom metabolizmu holesterola u mozgu (Mladenovic Djordjevic et al., 2010; Smiljanic et al., 2014). Pokazano je, međutim, i da podaci o efektima FR na kogniciju u odsustvu patologije nisu konzistentni, odnosno da na konačan efekat FR utiču genotip, pol, starost životinje, ali i vrsta i dužina trajanja primenog režima restrikcije hrane (Ingram and de Cabo, 2017; Smiljanic et al., 2018; Sohal and Forster, 2014). U pojedinim studijama je naime pokazano odsustvo neuroprotektivnih efekata FR, kao i nedostatak poboljšanja u učenju i memoriji u različitim animalnim modelima (Bond et al., 1989; Brownlow et al., 2014; Carter et al., 2009; Kuhla et al., 2013). Štaviše, pokazano je da FR može da dovede do neuhranjenosti i time dodatno doprinese patologiji ili produženom oporavku (Gardner, 2005; Goldberg et al., 2015; Hunt et al., 2012; Kivimäki et al., 2018; Kristan, 2018; Seki et al., 2000; Sun et al., 2001; M. N. Thomas et al., 2016; Waitzberg et al., 2001). Skorašnji podaci koji su dobijeni analizom tzv. parametra krhkosti (eng. *frailty*), takođe su doveli u pitanje opšti povoljan efekat FR na zdravlje (Kane et al., 2016; Todorovic et al., 2018).

Prethodne studije su pokazale da FR uspešno smanjuje neuropatologiju asociranu sa AB i kognitivnu disfunkciju u različitim životinjskim modelima. Naime, CR je ublažila deponovanje A $\beta$  kod majmuna (Qin et al., 2006) i u mnogim transgenim mišjim modelima AB (Mouton et al., 2009; Patel et al., 2005; Schafer et al., 2015; Wang et al., 2005). Dodatno, pokazano je da i dugotrajni CR i IF režimi ishrane umanjuju deficite u ponašanju u trostrukom transgenom mišjem modelu AB, 3xTgAD (Halagappa et al., 2007). U slučaju EOD režima, međutim, poboljšanje u funkcionalnim testovima nije bilo praćeno smanjenjem nivoa A $\beta$  i fosfo-tau proteina u hipokampusu miševa, što je ukazalo da ovaj tip dijetalne restrikcije ostvaruje svoje povoljne efekte mehanizmima koji su nezavisni od klasične AB patogeneze (Halagappa et al., 2007). Slično podacima dobijenim u životinjskim modelima, studije u ljudskoj populaciji su pokazale da nisko-kalorična ishrana dovodi do smanjenog rizika od AB (Luchsinger et al., 2002).

## 2. CILJ RADA

Sve se više značaja pridaje doprinosu krvno-moždane barijere (KMB) neurodegenerativnim oboljenjima. Dodatno, literaturni podaci ukazuju da se promene u moždanoj cirkulaciji, protoku krvi i propustljivosti kapilara, mogu primetiti mnogo pre pojave klinične slike oboljenja. Stoga bi upoznavanje ranih promena i uzroka koji dovode do poremećaja moždane cirkulacije moglo imati veliki dijagnostički značaj u ranom kliničkom otkrivanju Alchajmerove bolesti. Upoznavanje poremećaja u funkcionisanju pericita i endotelnih ćelija i njihovoj međusobnoj interakciji prilikom održavanja stabilnosti KMB, može doprineti razvoju potencijalnih pristupa u kojima bi meta delovanja bile upravo ćelije koje ulaze u njen sastav. Za tu svrhu, koristilo se nekoliko životinjskih modela koji imaju strukturne deficite na nivou KMB, kao i modeli koji imaju patologiju AB. Dodatno, ispitan je i jedan farmakološki pristup i jedan koji je vezan za promene životnog stila u cilju potencijalne terapije i/ili prevencije. U skladu sa navedenim, definisani su specifični ciljevi:

**1. Ispitati ulogu pericita u strukturnom i funkcionalnom integritetu KMB.**

Pratiće se obim prekrivenosti KMB pericitima kod *Pdgfr* $\beta^{+/-}$  i *Pdgfr* $\beta^{F7/F7}$  transgenih miševa koji imaju delimičan gubitak PDGFR $\beta$  receptora. Koristiće se prethodno ustanovljen imunohistohemijski metod uz upotrebu CD13 antitela, markera pericita i fluorescentno obeleženog lektina, koji se vezuje za endotelne ćelije krvnih sudova.

**2. Ispitati ulogu pericita u ponašanju kod *Pdgfr* $\beta^{F7/F7}$  transgenih miševa.**

Koristiće se baterija testova ponašanja, senzomotornih (test otvorenog polja, hodanje po gredi i uklanjanje adheziva, rotarod, trčanje na kompleksnom točku) i kognitivnih (radijalni lavirint i kontekstualno uslovljavanje straha) testova.

**3. Ispitati integritet bele mase kod *Pdgfr* $\beta^{F7/F7}$  životinja.**

Upotrebiće se imunohistohemijski metod korišćenjem MBP i SMI312 antitela, koji obeležavaju mijelinski omotač i nastavke nervnih ćelija i dendritsku mrežu.

4. **Kreirati i okarakterisati mišji model koji ima akutni, brz i specifičan gubitak pericita, uz očuvanost ostalih komponenti KMB.** Za izvršenje ovog cilja, koristiće se strategija duplog promotora (*Cspg4* i *Pdgfrβ*), kako bi se obezbedila specifična ekspresija receptora difterije toksina na pericitima. Nakon tretmana difterijom, indukovaće se smrt samo na pericitima.
  - 4a. **Potvrditi gubitak pericita kroz nekoliko vremenskih tačaka.** Analiziraće se markeri CD13 i fluorescentno obeleženi lektin.
  - 4b. **Ispitati neuronsku homeostazu.** Analiziraće se markeri NeuN i SMI312 koji obeležavaju neurone i neurite.
  - 4c. **Ispitati kognitivni status.** Koristiće se testovi prepoznavanje novog objekta i kontekstualno uslovljavanje straha.
5. **Ispitati integritet KMB i funkcionalne karakteristike mišjih modela AB koji imaju povećanu ekspresiju i akumulaciju Aβ.**
  - 5a. **Ispitati integritet KMB kod Tg2576, 3xTg-AD i 5XFAD modela.** Uradiće se analiza zastupljenosti PDGFRβ, kao i imunoglobulina G (IgG) u moždanom parenhimu; analiza ekstravaskularnog IgG i fibrinogena i prekrivenost pericitima, i analiza mikro krvarenja.
  - 5b. **Ispitati funkcionalne karakteristike 5XFAD miševa.** Meriće se moždani protok krvi, i analizirati ponašanje životinja u testovima: iskopavanje peleta, pravljenje gnezda, zakopavanje klikera, prepoznavanje nove lokacije objekta i uslovljavanje straha.
6. **Ispitati ulogu PICALM proteina u endotelnim ćelijama i neuronima.**

**6a. Ispitati da li farmakološko povećanje ekspresije PICALM proteina ima sposobnost smanjenja A $\beta$  i da li utiče na integritet KMB.** Moždani preseki će se analizirati korišćenjem sledećih markera: tioflavin S, A $\beta$ , lektin, fibrinogen i  $\alpha$ SMA.

**6b. Ispitati ulogu PICALM-a u neuronima.** Najpre će se kreirati mišji model koji ima specifični gubitak PICALM-a u neuronima, a zatim će se ispitati neuronska homeostaza korišćenjem NeuN i SMI312 antitela, kao i kognitivni status korišćenjem testova prepoznavanja novog objekta, prepoznavanja nove lokacije objekta i uslovljavanja straha.

**7. Ispitati efekte dijetalne restrikcije na patologiju AB kod ženki 5XFAD miševa.**

**7a. Ispitati efekte dijetalne restrikcije na nivo A $\beta$  i integritet KMB.** Uradiće se analiza broja amiloidnih plaka, ukupnog A $\beta$ 42, zastupljenosti PDGFR $\beta$  i imunoglobulina G (IgG) u moždanom parenhimu, kao i analiza prekrivenost pericitima.

**7b. Ispitati efekte dijetalne restrikcije na inflamaciju, sinaptičku plastičnost i neuronsku homeostazu.** Analiziraće se sledeći markeri: Iba-1, GFAP, TNF- $\alpha$ , p38, EAAT2, GAP43, PSD95, sinaptofizin, aducin, NeuN i SMI312.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Eksperimentalne životinje

Životinjski modeli Alchajmerove bolesti - *Tg2576*, *3xTg-AD* i *5XFAD*, modeli gubitka pericita - *Pdgfr $\beta$ <sup>F7/F7</sup>*, *Pdgfr $\beta$ <sup>+/-</sup>* i Pericit-Cre, kao i PICALM-deficijentni sojevi - *Picalm<sup>+/-</sup>*; *5XFAD*, *Picalm<sup>lox/lox</sup>*; *Cadh-Cre*; *5XFAD* i *Picalm<sup>lox/lox</sup>*; *Camk2a-Cre-ER* i *Camk2a-Cre-ER-Ai14<sup>+0</sup>* su nabavljeni komercijalno (Jackson Laboratories ili Taconic, SAD) ili su dobijeni od saradnika. U svim eksperimentima, kao kontrolne životinje su korišćene odgovarajuće ne-transgene životinje iz istih okota i identičnog osnovnog genotipa: za *Tg2576* transgeni soj je korišćen C57BL6 soj; za *3xTg-AD* transgeni soj je korišćen B6129SF2/J hibridni soj; za *5XFAD* transgeni soj je korišćen B6SJL hibridni soj; za *Pdgfr $\beta$ -Flp*; *Cspg4-FSF-CreER* soj je korišćen C57BL6 kontrolni soj, a za *Pdgfr $\beta$ <sup>+/-</sup>* i *Pdgfr $\beta$ <sup>F7/F7</sup>* transgeni soj je korišćen 129s/SvImJ kontrolni soj. Sojevi *Picalm<sup>+/-</sup>*; *5XFAD*, *Picalm<sup>lox/lox</sup>*; *Cadh-Cre*; *5XFAD* i *Picalm<sup>lox/lox</sup>*; *Camk2a-Cre-ER* su generisani na C57BL6 soju.

U eksperimentima su istovremeno korišćeni mužjaci i ženke, u približno istom broju. Životinje su gajene u matičnim okotima do 21. postnatalnog dana, kada su odvajane od majki, razdvajane po polovima i stavljanje u zasebne kaveze ( $n = 5$  miševa po kavezu). Životinje su gajene pod standardnim uslovima (temperatura:  $23 \pm 2^\circ \text{C}$ ; relativna vlažnost vazduha: 60-70 %; svetlosni režim 12 sati svetlost/12 sati mrak; slobodan pristup hrani i vodi). Za ishranu životinja korišćena je standardna briketirana hrana (45% ugljeni hidrati; 5% masti; 20% proteini). Svi eksperimenti na životinjama odobreni su od strane Etičkog komiteta Univerziteta Južne Kalifornije (IACUC protokol broj 20041) i Etičkog komiteta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ (rešenje broj 1-06/13). Korišćen je minimalan broj životinja neophodan za realizaciju eksperimenata, uz maksimalnu brigu o životinjama i svođenje patnje životinja na minimum, uključujući totalnu anesteziju prilikom hirurških procedura.

### 3.2. Određivanje genotipa

Genotipizacija za svaku životinju novog okota je rađena izolovanjem i analizom DNK iz ušiju repa životinja, upotrebom odgovarajućih i specifičnih prajmera (eng. *primers*) za umnožavanje gena od interesa u lančanoj reakciji polimeraze (eng. *polymerase chain reaction, PCR*) (Tabela 2).

**Tabela 2. Prajmeri korišćeni prilikom genotipizacije eksperimentalnih životinja.**

Soj	Uzvodni prajmer (5'→3')	Nizvodni prajmer (5'→3')
Tg2576	GTGGATAACCCCTCCCCAGCCTA GACCA	CTGACCACTCGACCAGGTTCTG GGT
3xTg-AD	AGGACTGACCACTCGACCAG	CGGGGGTCTAGTTCTGCAT
5XFAD	AGGACTGACCACTCGACCAG	CGGGGGTCTAGTTCTGCAT
<i>Pdgfr<math>\beta</math><sup>F7/F7</sup></i>	GAGATTTAGCAGTCACTAG TGGCTACCCGTGATATTGCT	GCGATAGGTCCTTTCAG
<i>Pdgfr<math>\beta</math><sup>+/-</sup></i>	ACAATTCCGTGCCGAGTGACAG AAAAGTACCAGTGAAACCTCGCT G	ATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTA G
<i>Picalm<sup>lox/lox</sup></i>	GTGTGGGATGAATGGTTGGGC	CCACCATGTAGGGTCTAAAG
<i>Picalm<sup>+/-</sup></i>	CATAAGCTAAGATTTCCCCTGTCA CA GTGTGGGATGAATGGTTGGGC	CCACCATGTAGGGTCTAAAG
<i>Cre</i>	TCCATGAGTGAACGAACCTG	ACCTGAAGATGTTTCGCGATT
<i>iDTR</i>	CAT CAA GGA AAC CCT GGA CTA CTG	AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT
<i>Ail4<sup>+/0</sup></i>	CTGTTCCCTGTACGGCATGG	GGCATTAAAGCAGCGTATCC

Za izolaciju DNK su prikupljana tkiva ušiju koja su dobijena prilikom obeležavanja životinja. Tkivo je prebačeno u tubu za PCR reakciju i svakom uzorku je dodato po 50  $\mu$ l rastvora A. Tkivo sa rastvorom A (alkalni pufer za liziranje tkiva: 25 mM NaOH, 0,2 mM EDTA) je inkubirano 30-45 min na 95°C, nakon čega je uzorak vorteksovan, dodato je po 50

$\mu\text{l}$  rastvora B (pufer za neutralizaciju, 40 mM Tris-HCl) u svaku tubu i uzorak je ponovo kratko vorteksovan i centrifugiran.

Smeše za PCR reakcije su pripremljene na ledu, upotrebom Gotaq zeleni „Master mix“, po uputstvu proizvođača (QuantaBio, SAD). Uzorak DNK je dodat u zapremini od 2  $\mu\text{l}$  bez prethodnog određivanja koncentracije, dok je smeša prajmera (početne koncentracije 10  $\mu\text{M}$ ) dodata u odnosima koji su prikazani u Tabeli 3. Nakon pripreme, specifični DNK proizvodi su umnoženi upotrebom odgovarajućeg temperaturnog profila i broja ciklusa u aparatu za PCR (BioRad, SAD). PCR produkti su zatim naneti na gel napravljen od 1,5% agarose (Sigma, SAD) i korišćenjem TEA pufera izvršena je elektroforeza PCR produkata.

**Tabela 3. Priprema uzoraka za PCR reakciju**

	Za 1 uzorak	Za 25 uzoraka
DNK	2 $\mu\text{l}$	2 $\mu\text{l}$ po uzorku
Smeša prajmera (2 prajmera)	3 $\mu\text{l}$	75 $\mu\text{l}$
Zeleni Master mix (2x)	12.5 $\mu\text{l}$	312.5 $\mu\text{l}$
ddH <sub>2</sub> O	7.5 $\mu\text{l}$	187.5 $\mu\text{l}$

### 3.3. Restrikcija hrane

Ženke jedne kohorte 5XFAD miševa starih 2 meseca su nasumično podeljenje u dve eksperimentalne grupe: grupu označenu *ad libitum* (AL, lat.) koja je imala neograničen pristup hrani i grupu označenu kao EOD (eng. *every-other-day feeding*) koja je hranu dobijala svakog drugog dana *ad libitum*. Restrikcija hrane je trajala 4 meseca i životinje su žrtvovane kada su dostigle starost od 6 meseci.

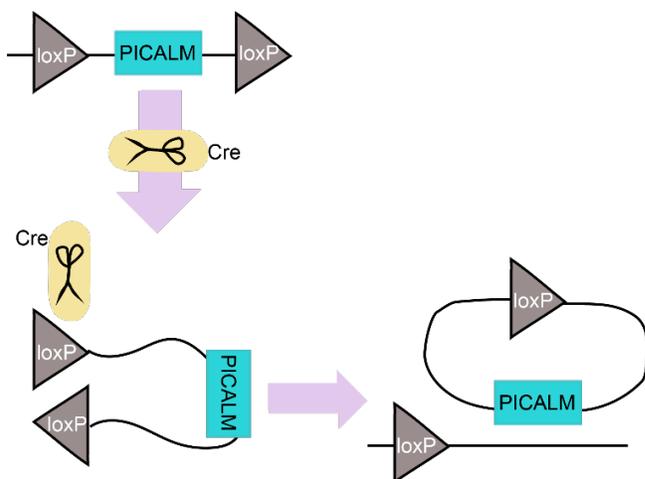
### 3.4. Tretman supstancom T-65

*Picalm*<sup>+/-</sup>;5XFAD i *Picalm*<sup>lox/lox</sup>;Cadh-Cre; 5XFAD miševi su podvrgnuti svakodnevnom intraperitonealnom injeciranju supstance T-65 (u koncentraciji od 32 mg/kg/danu) ili kontrolnim rastvorom (fiziološki rastvor sa 5% NaHCO<sub>3</sub>) u trajanju od 2 meseca, počevši od 3 meseci starosti. Supstanca T-65 je odobreni lek od strane FDA (eng. *food and drug administration*). Nakon tretmana, mozak ovih životinja je izolovan i tkivo je analizirano imunohistohemijski.

### 3.5. Tretman tamoksifenom i difterija toksinom

Delecija PICALM proteina iz endotelnih ćelija ili neurona se zasnivala na *Cre-Lox* rekombinantnom sistemu (Song and Palmiter, 2018) (**Slika 9**). Cre rekombinaza je enzim koji nakon prelaska u jedro ima osobinu da se veže za Lox mesta, kreira petlju i omogućí isecanje dela gena koji je okružen Lox mestima. Cre-ER je inducibilna varijanta Cre enzima i da bi prešao u jedro, neophodno je da bude indukovano tamoksifenom. Tamoksifen je injeciran intraperitonealno tokom 7 uzasopnih dana, u koncentraciji od 40 mg/kg/danu, a korišćen je 4-hidroksitamoksifen, 4-OHT (Sigma, H6278), zbog veće efikasnosti u indukovanju rekombinacije.

Delecija PICALM proteina iz endotelnih ćelija u modelu *Picalm*<sup>lox/lox</sup>; Cadh-Cre je indukovana još u toku embrionalnog razvića, dok je u modelu *Picalm*<sup>lox/lox</sup>; Camk2a-Cre-ER delecija indukovana u adultnom periodu primenom 4-OHT.



**Slika 9. Šematski prikaz Cre-Lox rekombinantnog sistema.** Cre-Lox rekombinantni sistem predstavlja široko korišćen pristup genomske modifikacije. U prisustvu Cre rekombinaze, LoxP mesta formiraju petlju i isecaju gen od interesa (PICALM) koji okružuju ([Cre-Lox rekombinantni sistem](#), *Addgene*, *SAD*, modifikovano).

Pored indukcije delecije gena, Cre rekombinaza u modelu Pericit-Cre miševa indukuje i ekspresiju receptora difterije toksina i time, nakon tretmana difterija toksinom (Sigma, SAD) 10 uzastopnih dana intraperitonealnih injekcija (0,1 µg), izaziva smrt ćelija koje nose Cre rekombinazu.

### 3.6. Praćenje ponašanja životinja

Svi testovi ponašanja, osim testova pravljenja gnezda i iskopavanja peleta, su rađeni u specijalnoj, zvučno i svetlosno izolovanoj sobi za ispitivanje ponašanja. Ponašanje životinja je snimano kamerom, a za analizu je korišćen *EthoVision XT* (Noldus, SAD) kompjuterski program za praćenje ponašanja. Testovi su rađeni u prepodnevnom časovima od 09 do 12h, osim testa iskopavanje peleta koji je rađen u periodu od 18-20h i testa pravljenja gnezda koji je rađen od 20h do 09 h narednog dana. Nekoliko dana pre početka svakog testiranja, osim za testove pravljenja gnezda, iskopavanja peleta i zakopavanja klikera, životinje su ostavljene u sobi za testiranje po 30 min 3 uzastopna dana i po 5 min su bile držane od strane eksperimentatora kako bi se navikle na sredinu i eksperimentatora.

#### 3.6.1. Test iskopavanja peleta

Iskopavanje peleta (eng. *burrowing*) je primer ponašanja koje je tipično za miševе i nije izazvano problemima u motorici (Deacon, 2012, 2006a; Deacon et al., 2002). Deficiti u

ovom testu mogu ukazati na probleme u funkciji hipokampusa koji nisu vezani za učenje i pamćenje (Deacon et al., 2002). Na početku testiranja, svaka od životinja je zasebno prebačena u specifično dizajnirani kavez u kome se nalazila cev sa uzdignutim otvorom u koji su sipani briketi hrane (pelet; 200 g) (**Slika 10**). Testiranje je započeto u večernjim časovima (18:00 h) i trajalo je ukupno 2 h. Po isteku 2 časa, cev sa hranom je pažljivo izvađena i izmerena je težina hrane koja je preostala u cevi. Peleti hrane (u gramima) koji su „iskopani“ su uzeti kao parametar za dalju statističku analizu.



**Slika 10. Test iskopavanja peleta.**  
Na slici je prikazana PVC cev sa 200 g peleta hrane.

### 3.6.2. Test pravljenje gnezda

Pravljenje gnezda (eng. *nesting*), kao i test iskopavanja peleta, je ponašanje specifično za vrstu koje nije izazvano motoričkim problemima jedinke i podjednako je razvijeno kod mužjaka i ženki. Ovim testom ponašanja se takođe može zaključivati o funkcionalnosti hipokampusa (Deacon et al., 2002). U eksperimentalnim modelima hirurškog uklanjanja hipokampusa ili šloga je pokazano da oštećenje hipokampusa dovodi do nemogućnosti ovih životinja da sagrađe gnezdo (Deacon et al., 2002; Yuan et al., 2018).

Testiranje je započeto u večernjim časovima (20:00 h), odmah nakon završenog testa iskopavanja peleta, a završeno je sledećeg jutra (09:00 h). Svaka životinja je prebačena u individualne kaveze sa uobičajenim pristupom hrani i vodi i jednim komadićem vate oblika kvadrata i dimenzija 16 x 25 x 13 cm (**Slika 11**). Sledećeg jutra, kvalitet gnezda je ocenjivan

upotrebom skale 1-5 prema prethodno opisanim kriterijumima (Deacon, 2012, 2006b; Deacon et al., 2002; Winkler et al., 2015):

- 1- Komadić vate nije dotaknut
- 2- Komadić vate je do 50% iscepan
- 3- Komadić vate je u potpunosti iscepan, ali gradnja gnezda nije započeta
- 4- Komadić vate je u potpunosti upotrebljen: pravljenje gnezda je započeto ali nije završeno (gnezdo nema zidove)
- 5- Komadić vate je u potpunosti upotrebljen: pravljenje gnezda je završeno (gnezdo ima sva 4 zida)



**Slika 11. Ocenjivanje gnezda.** (A) Strelica označava netaknuti komadić vate (ocena 1), (B) strelica označava da je vata iscepana (ocena 3), dok u (C) strelica označava gnezdo sa zidovima (ocena 5).

### 3.6.3. Test zakopavanja klikera

Zakopavanje klikera (eng. *marble test*) je vrsta ponašanja koje je specifično za vrstu i, kao i iskopavanje peleta i pravljenje gnezda, spada u dobrovoljne testove ponašanja. Promene u ponašanju u ovom testu mogu ukazati na opsesivno-kompulzivni poremećaj, pa i anksioznost (Kim et al., 2012; Torres-Lista et al., 2015).

Test zakopavanja klikera je rađen nakon testa pravljenja gnezda. Kavez je do polovine napunjen piljevinom na čiju je površinu postavljeno 20 klikera, u 4 kolone i 5 redova (**Slika 12**). Pojedinačne životinje su ostavljene u kavezu sa klikerima 30 minuta, nakon čega je broj zakopanih klikera zabeležen. Kliker je smatran zakopanim ako je zakopano minimalno 2/3 površine klikera.



**Slika 12. Test zakopavanja klikera.** Klikeri su u kavezu raspoređivani u 4 kolone i 5 redova.

#### 3.6.4. Test otvorenog polja

Testom otvorenog polja se meri opšta pokretljivost životinje, ali test može ukazati i na anksioznost (Chapman et al., 1999; Dodart et al., 1999). Ovaj test podrazumeva slobodno kretanje ispitivane životinje u kutiji kvadratnog oblika (dimenzija 30 cm x 30 cm) tokom 30 minuta. Kretanje se snima upotrebom kamere i analizira upotrebom kompjuterskog programa *EthoVision XT* (Noldus, SAD). Analizirani su parametri ukupno pređenog rastojanja, prosečne brzine kretanja, učestalosti ulaska u centar polja i vremena provedenog u centru polja. Test otvorenog polja je urađen neposredno pre testa prepoznavanja novog objekta.

#### 3.6.5. Test prepoznavanja novog objekta ili lokacije

Test prepoznavanja novog objekta ili lokacije je urađen praćenjem procedure koja je prethodno objavljena (Bell et al., 2010; Lazic et al., 2019; Montagne et al., 2018; Sagare et al., 2013a). Životinje su najpre habituirane u kutiji od pleksiglasa dimenzija 30 cm x 30 cm x 30 cm, tokom 10 minuta, tri uzastopna dana. Trećeg dana, nakon 10 minuta habituacije, životinja je vraćena u kutiju nakon postavljanja dva identična objekta veličine 5 x 5 cm, jednog u gornji levi i drugog u gornji desni ugao arene. Životinji je dozvoljeno da istraži

objekte 5 minuta nakon što je vraćena u svoj kavez (ova faza je označena kao “faza treninga”). Nakon 1,5 h, jedan od objekata je premešten dijagonalno i životinja je ponovo stavljena u kutiju gde je ostavljena 3 minuta da slobodno istraži objekte (“faza testa”, test prepoznavanja nove lokacije objekta). Nakon završene faze testa, životinja je vraćena u svoj kavez, a objekat kome je prethodno promenjena lokacija je zamenjen novim objektom koji je različit po obliku i boji ali sličnog materijala (test prepoznavanja novog objekta). Nakon 1,5 h životinja je još jednom stavljena u kutiju za ispitivanje gde je ostavljena 3 minuta da slobodno istraži objekte. Nakon svakog treninga i testa, kutija je detaljno čišćena sa 70% etanolom. Svi testovi, uključujući i habituaciju i trening, su snimani kamerom koja je bila postavljena iznad arene za testiranje. Vremenski period koji je životinja provela istražujući novi objekat ili novu lokaciju je izmeren i predstavljen u vidu % vremena provedenog oko novog objekta u odnosu na ukupno vreme provedeno istražujući novi i stari objekat zajedno. Životinje koje su pokazale preferenciju za jedan od objekata u fazi treninga ili većinu vremena provele sakrivajući se u nekom od uglova tokom faze testa, su isključene iz eksperimenta.

### 3.6.6. Test uslovljavanja straha (testiranje dugotrajne i sposobnosti prisećanja)

Kontekstualno uslovljavanje straha je urađeno u skladu sa prethodno objavljenim postupkom (Kimura et al., 2010; Lazic et al., 2019; Montagne et al., 2018). U eksperimentu su korišćeni standardni kavezi za uslovljavanje na čijem se dnu nalazi mreža od nerđajućeg čelika koja je priključena za izvor struje i kroz koju se upotrebom kompjuterskog programa *FreezeFrame* (Coulbourn Instruments) struja kontrolisano pušta da bi se izazvao električni šok. Ponašanje životinje je praćeno preko digitalne kamere koja je bila prikačena za plafon kaveza. Test se sastojao iz dve faze: faza trening i faza testa. Tokom treninga, miševi su pojedinačno stavljeni u kavez za uslovljavanje na 5 minuta tokom čega su primili četiri šoka u razmaku od 1 minuta, a nakon 2 minuta od početka boravka u kavezu. Jačina svakog šoka je iznosila 0.4 mA i bila je trajanja od 1 sekunde. Kontekstualna dugotrajna memorija je utvrđivana sledećeg jutra i 2 nedelje nakon faze treninga (faza testa). Miševi su ponovo individualno stavljeni u kavez za uslovljavanje, ovaj put bez primene električnog šoka, i

ostavljani su da slobodno istraže kavez tokom 5 minuta. Automatizovan kompjuterski program *FreezeFrame* je korišćen za kvantifikaciju % vremena provedenog u tzv. “zamrznutom” stanju, tj. u stanju odsustva bilo kakvih pokreta osim mišića grudnog koša uključenih u disanje. Prag “zamrznutog stanja” je podešen na 10% i računato je vreme tokom koga je životinja provela minimum 0,25 sekundi u zamrznutom stanju.

### 3.6.7. Radijalni lavirint

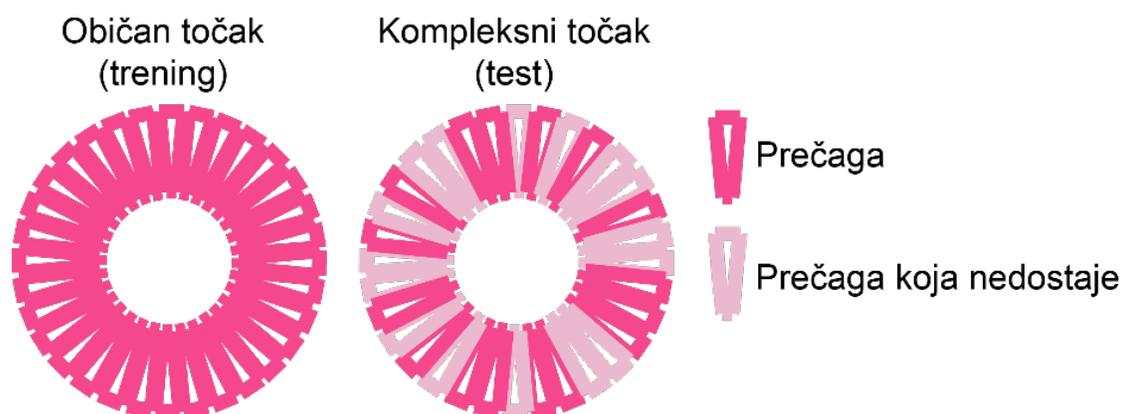
Specifični problemi u prostornoj memoriji su ispitivani u testu sa radijalnim lavirintom koji sadrži 8 kraka, a koji ukazuje na deficite u funkciji kortikalne projekcije kroz *corpus callosum* (oštećenja bele mase), dok hipokampus nije oštećen (Montagne et al., 2018; Shibata et al., 2007). Pre testiranja, miševi su bili podvrgnuti kalorijskoj restrikciji kako bi se njihova telesna masa umanjila za 10-15%, pošto je pokazano da se uspešnost testa poboljšava u slučaju nagrađivanja hranom. Do kraja testiranja, miševi su bili držani na istom režimu smanjenog unosa hrane. Miševi su najpre trenirani dva uzastopna dana po 5 minuta kako bi se upoznali sa eksperimentalnom okolinom, lavirintom i hranom (pahuljice *Fruity Pebbles*), kao i zadatkom koji je od njih zahtevan. Dva dana pre treninga, pahuljice su bile posute po lavirintu u svih 8 otvorenih kraka, a svaka životinja je ostavljena da prostor slobodno istraži tokom 5 minuta. Jedan dan pre treninga, po jedan komad pahuljica je postavljen na kraj svakog kraka. Životinja je postavljena na centralnu platformu i ostavljena da slobodno konzumira hranu iz svakog kraka. Narednog dana je započeto sedmodnevno testiranje. Procedura je ponavljana svakog dana testiranja, uz ponovno stavljanje po jednog komada pahuljice na kraj svakog kraka. Životinja je uvek postavljena na centralnu platformu sa svim otvorenim vratima i dozvoljeno joj je da odabere krak. Kada je životinja ušla u jedan krak, sva ostala vrata koja su bila pod automatskom kontrolom, su zatvorena. Nakon što je pojela hranu, životinji je dozvoljeno da se vrati na centralnu platformu i da ponovi odabir kraka. Test se smatrao završenim kada je životinja pojela svih 8 pahuljica ili ako je prošlo 25 minuta od početka testa. Ponašanje je snimano kamerom pričvršćenom za plafon prostorije. Rezultati su izraženi kao broj grešaka koje životinja napravi pre nego što poseti svih 8 kraka.

### 3.6.8. Rotarod

Standardni rotarod test je urađen prema prethodno objavljenom protokolu (Shibata et al., 2007; Zlokovic et al., 2005). Miševi su trenirani 3 dana i testirani četvrtog dana. Inicijalna brzina tokom prvih 60 sekundi je bila 5 obrtaja po minutu (rpm) i postepeno je povećana od 5 to 10 rpm tokom narednih 100 sekundi, a potom i od 10 to 25 rpm tokom narednih 120 sekundi. Ukupno trajanje pojedinačnog treninga i testa je trajalo 6 minuta. Rezultati su izraženi kao vreme koje životinja provede na rotarod aparatu dok ne padne. Kod svake životinje su rađena po četiri pokušaja, a najbolji rezultat je uzet za dalje analize.

### 3.6.9. Kompleksni točak za trčanje

Kompleksni točak za trčanje je specifičan test za utvrđivanje stepena povrede *corpus callosum*-a (Schalomon and Wahlsten, 2002), regiona mozga koji povezuje levu i desnu hemisferu i naročito je bogat mijelinskim vlaknima. Životinje su razdvojene u individualne kaveze dimenzija 40 cm sa 20 cm koji sadrže točak za trčanje prečnika 12,5 cm (Amazon #B0002DGSEC, SAD). Životinje su trenirane na običnom točku za trčanje sa podjednako razmaknutim prečagama (34 prečage razmaka 1,1 cm, **Slika 13**) ukupno 2 nedelje i 3 dana. Nakon treninga, životinjama je ponuđen kompleksni točak za trčanje kome je nedostajalo ukupno 20 nasumičnih prečaga (14 prečaga razmaka 2, 2 i 3,3 cm, **Slika 13**) i test je ponavljan ukupno 3 dana. Broj punih obrtaja točka je meren kroz 30-minutne intervale tokom dana upotrebom Micrologix 1000 kontrolera (Allen-BradleyCat# 1761-L10BWB F, Royal Wholesale Electric) i režima rada tipa prisustva/odsustva lasera (Keyence #LR-ZB240CB). Rezultati svakog 24-časovnog perioda su analizirani izračunavanjem ukupnog pređenog puta i maksimalne brzine za svakog miša. Samo rezultati dobijeni 15-, 16- i 17-og dana za standardni točak i 18-, 19- i 20-og dana za kompleksni točak su uključeni u dalje statističke analize. Maksimalan broj obrtaja točka u toku jednog dana je uzet kao vrednost maksimalne brzine (m/min) za navedeni dan za svaku životinju. Sve životinje su pokazale spontanu aktivnost (svaka životinja je svakodnevno u proseku prešla između 5-7 km) i nijedna nije bila isključena iz eksperimenta.



**Slika 13. Šematski prikaz običnog i kompleksnog točka za trčanje.** Kompleksnom točku nasumično fale prečage.

#### 3.6.10. Test hodanja po gredi

Test hodanja po gredi je motorički test kojim se mogu detektovati fine promene umotornoj koordinaciji i balansu i najčešće se koristi kod modela moždane povrede i za ispitivanje dejstva različitih genetičkih manipulacija i farmakoloških tretmana koji dovode do poremećaja u motorici (Luong et al., 2011).

Životinja je postavljena na jedan kraj grede dužine 70 cm i beležen je broj omaški šape prilikom prelaska na drugi kraj. Svaka životinja je testirana 3 puta i srednja vrednost je uzeta za dalje statističke analize.

#### 3.6.11. Uklanjanje adheziva

Uklanjanje adheziva je motorički test koji, kao i test hodanja po gredi, ispitujemotornu koordinaciju i simetriju (Fréchou et al., 2018). Na zadnje šape životinje je zalepljen komadić lepljive trake i merena su dva parametra: vreme provedeno do prvog kontakta sa adhezivom i do njegovog potpunog uklanjanja od strane životinje.

### 3.7. Merenje protoka krvi u mozgu

Protok krvi u mozgu je analiziran na anesteziranim životinjama upotrebom Doplerove laserske metode kako je prethodno opisano (Kisler et al., 2017b; Lazic et al., 2019). Životinja je najpre anestezirana mešavinom ketamina (100 mg/kg) i ksilazina (10 mg/kg). Delovanje anestezije je proveravano mehaničkim stimulisanjem zadnje šape. Kada je životinja bila u potpunosti anestezirana (odsustvo reakcije prilikom štipanja šape), postavljena je u stereotaksički ram. Koordinate su bile u skladu sa podacima iz atlasa mišjeg mozga (*Franklin and Paxinos: The mouse brain atlas in stereotaxic coordinates*). Koža i slojevi mišića i veziva u regionu glave iznad dela somatosenzorne kore odgovorne za primanje stimulusa od mišjih brkova, Barelov korteks (eng. *Barrel cortex*), su detaljno očišćeni korišćenjem sterilnog hirurškog pribora (makaza i pinceta) i štapića za uši natopljenih u sterilni PBS (fosfatni natrijumov puffer, eng. *phosphate buffered saline*, Sigma, SAD). Nakon čišćenja, laser je prislonjen uz lobanju i praćen je bazalni nivo protoka krvi. Kada je bazalni nivo protoka krvi postao stabilan (uz dozvoljenih 5% oscilacija), vrednost bazalnog nivoa je zabeležena na svakih 10 sekundi u toku 1 minuta. Nakon 1 min, suv štapić za uho je prislonjen uz mišje brkove suprotne strane od pozicije lasera i relativno brzim pokretima (60 Hz) gore-dole je izazvana stimulacija brkova. Ova mehanička stimulacija mišjih brkova je trajala 1 min i za to vreme je praćen protok krvi. Zabeležena je maksimalno dostignuta vrednost protoka krvi. Nakon 5 minuta pauze, ista procedura je ponovljena još dva puta na istom mišu i izračunata je srednja vrednost za svaku jedinku. Procenat promene protoka krvi u mozgu je izračunat pomoću formule:

$$\% \text{ povećanja protoka krvi u mozgu} = \frac{\text{Bazalna vrednost (srednja vrednost)} \div \text{Max protok krvi (srednja vrednost)}}{1} * 100\%$$

Ova procedura je smatrana terminalnom i odmah po završetku, životinja je transkardijalno perfundovana i izolovano je moždano tkivo za dalje analize.

### **3.8. Prikupljanje uzoraka**

#### 3.8.1. Transkardijalna perfuzija

Da bi se moždano tkivo u velikoj većini očistilo od proteina krvi prisutnih u cirkulaciji, životinje su podvrgavane transkardijalnoj perfuziji sa PBS-om, upotrebom prirodne moći pumpanja srca i osobina velikog krvotoka. Ukratko, nakon primene visoke doze anestezije (100 mg/kg ketamine i 10 mg/kg ksilazin) životinja je fiksirana na stiropornoj podlozi, otvoren je grudni koš i u levu komoru srca je uvedena igla kroz koju je propušteno oko 50 ml hladnog PBS-a (sa 1% 0,05 M EDTA) upotrebom peristaltičke pumpe za perfuziju životinja, dok je desna pretkomora zasečena.

#### 3.8.2. Izolacija moždanog tkiva

Mozak je izolovan iz perfundovanih životinja uklanjanjem pljosnatih kostiju lobanje, nakon čega je podeljen na dve hemisfere. Moždane strukture korteks i hipokampus su izdvojene iz jedne hemisfere mozga i zatim su trenutno zamrznute na suvom ledu i sačuvane za dalju izolaciju proteina ili RNK na  $-80^{\circ}\text{C}$ , dok je druga hemisfera ili odložena u rastvor paraformaldehida (PFA; 4%) (Electron Microscopy Sciences, SAD) ili je trenutno zamrznuta u OCT sredstvu (eng. *optimal cutting temperature*, Sakura, SAD) za sečenje na kriokatu. Komadić repa je takođe sačuvan za potvrdu genotipa, kao što je opisano u odeljku 3.2.

### **3.9. Određivanje nivoa proteina Western blot analizom**

#### 3.9.1. Izolovanje ukupnih proteina iz mozga

Ukupni proteini su izolovani iz korteksa. Za liziranje tkiva i izolovanje proteina je korišćen RIPA pufer (50 mM Tris pH7.5; 150 mM NaCl; 1% NP-40; 0.5% Na-deoksiholat; 0.1% SDS, Roche, SAD) u koji je, na 10 ml, dodata pojedna tableta koktela proteaznih inhibitora (Mini Protease Inhibitors Cocktail, Boehringer M). Tkivo je, zatim sonifikovano 20 sekundi u 20 zapremina pufera (w/v). Homogenat je dalje centrifugiran na 20800 x g, 20

minuta, na 4°C, a dobijeni supernatanti, koji su predstavljali ukupne ćelijske proteine moždanih struktura, su prebačeni u sterilne tube i čuvani do upotrebe na -80°C.

### 3.9.2. Određivanje koncentracije proteina u totalnim ćelijskim ekstraktima

Koncentracija proteina u totalnim ekstraktima moždanog tkiva je određena metodom po *Pierce*-u upotrebom komercijalnog kompleta prema uputstvu proizvođača (Micro BCA Protein Assay Kit; Pierce Inc., Rockford, SAD). Uzorci su najpre razblaženi 500 puta i zatim inkubirani 45 min na 60°C. Apsorbanca je očitana na 562 nm korišćenjem spektrofotometra (Bio-Rad Laboratories). Za standardnu krivu su korišćene poznate koncentracije goveđeg albumina seruma (BSA, eng. *Bovine serum albumin*, Thermo Fisher, SAD).

### 3.9.3. Elektroforeza proteina

Elektroforetsko razdvajanje proteina prema molekularnoj težini je urađeno na SDS denaturišućim poliakrilamidnim gelovima (SDS-PAGE) u tzv. diskontinualnom sistemu. Za elektroforezu je korišćena aparatura Xcell4 Surelock Midi-Cell (Life Technologies, SAD) i komercijalni NuPAGE 4-12% Bis-Tris gelovi sa 10, 20 ili 26 bunarića, gradijenta 4-12% (Life Technologies, SAD). Količina proteina koja je nanošena na gel je eksperimentalno optimizovana za svakiprotein, upotrebom krivih sa sukcesivnim razblaženjima proteina i koncentracijama primarnogantitela preporučenim od strane proizvođača. Kao optimalna količina proteina je uzeta ona koja se nalazi u linearnom opsegu krive zavisnosti intenziteta signala i količine nanetih proteina. Za ispitivane proteine nanošeno je po 5-20µg ukupnih proteina. Proteini su razblaženi do koncentracije 1 µg/µl ili 2 µg/µl uz pomoć RIPA pufera, NuPAGE redukujućeg agensa (Life Technologies, SAD) i NuPAGE LDS pufera za nalivanje uzoraka (Life Technologies, SAD). Uzorci su pre nalivanja dodatno denaturisani kuvanjem tokom 10 minuta na 70°C. Kao standard za molekularnu težinu je korišćen obojeni marker širokog opsega (3,5-260 kDa; Life Technologies). Elektroforeza se odvijala u NuPAGE MES SDS puferu (Life Technologies) pod konstantnim naponom od 150 V, oko 100 min ili dok žuta boja ne stigne do kraja gela.

### 3.9.4. Elektrotransfer proteina

Za prenos proteina sa poliakrilamidnog gela na nitroceluloznu membranu korišćen je iBlot 2 sistem za transfer (Life Technologies) u trajanju od 7 minuta, pod naponom od 20 V. Po završenom transferu membrane su bojene bojom Ponceau-S (Sigma) u cilju dobijanja vizuelne potvrde uspešnosti transfera. Membrane obojene Ponceau-S su skenirane i zatim odbojene ispiranjem u destilovanoj vodi i TBST puferu (fosfatni pufer sa dodatkom deterdženta - eng. *tris-buffered saline with 0.1% Tween 20, TBST*, Sigma, SAD).

### 3.9.5. Imunološka detekcija proteina specifičnim antitelima – Western blot metoda

U cilju blokiranja nespecifičnog vezivanja antitela, membrane su prvo inkubirane u blokirajućem rastvoru Superblock T20 (Life Technologies, SAD). Membrane su zatim inkubirane u rastvorima antitela uz lagano mućkanje na sobnoj temperaturi preko noći. Primarna antitela su razblažena u blokirajućem agensu u odgovarajućem odnosu (razblaženje v/v, **Tabela 4**). Nakon inkubacije sa primarnim antitelima, membrane su ispirane 3 puta po 10 minuta u TBST-u i dalje inkubirane 1h na sobnoj temperaturi, sa odgovarajućim sekundarnim antitelom obeleženim enzimom peroksidazom rena (eng. *horse radish peroxidase*, HRP) u 5% rastvoru nemasnog mleka u prahu (BioRad, SAD) (**Tabela 4**). Nakon inkubacije sa sekundarnim antitelom, membrane su ispirane 5 puta po 10 minuta u TBST-u. Za detekciju hemiluminiscentnog signala, membrana je inkubirana 5 minuta u supstratu koji sadrži luminol (komercijalni komplet - Western blotting detection reagents, chemiluminescent, Thermo Fisher) i izložena autoradiografskom filmu osetljivom na plavu svetlost (Kodak) u trajanju od 1 sekunde do 3 minuta. Filmovi su razvijeni u mašini za ravijanje filmova X-OMAT 3000 RA (Kodak) i skenirani radi dalje analize.

**Tabela 4. Primarna i sekundarna antitela korišćena za imunoblot analizu.**

Primarno antitelo (Proizvođač, kataloški broj, razblaženje)	Sekundarno antitelo ili IgG (Proizvođač, kataloški broj, razblaženje)
IgG	

N/A	HRP-konjugovano anti-mišje (Santa Cruz Biotechnology, 2096, 1:3000)
<i>Astroцити</i>	
Mišje anti-GFAP (eng. <i>glial fibrillary acidic protein</i> ) (Millipore, MAB360, 1:1000)	HRP-konjugovano anti-mišje (Dako, P0260, 1:3000)
<i>Faktor nekroze tumora <math>\alpha</math></i>	
Mišje anti-TNF- $\alpha$ (eng. <i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> ) (Abcam, ab1793, 1:1000)	HRP-konjugovano anti-mišje (Dako, P0260, 1:3000)
<i>p38 MAPK (eng. mitogen-activated protein kinase)</i>	
Zečje anti-fosfo-p38 MAPK (Thr 180/Tyr 182, Santa Cruz Biotechnology, sc-17852-R, 1:200)	HRP-konjugovano anti-zečje (Santa Cruz Biotechnology, sc-2370, 1:3000)
Mišje anti-p38 MAPK (p38 $\alpha/\beta$ , Santa Cruz Biotechnology, sc-7972, 1:25)	HRP-konjugovano anti-mišje (Dako, P0260, 1:3000)
<i>Astroцитni glutamatni transporter</i>	
Zečje anti-EAAT2 (eng. <i>excitatory amino acid transporter 2</i> ) (Abcam, ab41621, 1:1000)	HRP-konjugovano anti-zečje (Santa Cruz Biotechnology, sc-2370, 1:3000)
<i>Protein 43 asociran sa rastom</i>	
Zečje anti-GAP-43 (eng. <i>growth associated protein 43</i> ) (Santa Cruz Biotechnology, sc-10786, 1:1000)	HRP-konjugovano anti-zečje (Santa Cruz Biotechnology, sc-2370, 1:3000)
<i>Sinaptofizin</i>	
Zečje anti-sinaptofizin (Santa Cruz Biotechnology, sc-9116, 1:1000)	HRP-konjugovano anti-zečje (Santa Cruz Biotechnology, sc-2370, 1:3000)
<i>Protein post-sinaptičke gustine 95</i>	
Zečje anti-PSD-95 (eng. <i>post-synaptic density protein 95</i> ) (Millipore, 04-1066, 1:1000)	HRP-konjugovano anti-zečje (Santa Cruz Biotechnology, sc-2370, 1:3000)
<i>Aducin</i>	
Zečje p-aducin (Santa Cruz Biotechnology, sc-12614, 1:1000)	HRP-konjugovano anti-zečje (Santa Cruz Biotechnology, sc-2370, 1:3000)
Mišje anti-aducin $\beta$ (Santa Cruz Biotechnology, sc-376063, 1:1000)	HRP-konjugovano anti-mišje (Dako, P0260, 1:3000)
<i>Periciti</i>	
Kozje anti-PDGFR $\beta$ (eng. <i>platelet-derived growth factor receptor <math>\beta</math></i> ) (R&D Systems, AF1042, 1:1000)	HRP-konjugovano anti-kozje (Santa Cruz Biotechnology, sc2350, 1:3000)
<i>Endogene kontrole</i>	
Mišje anti- $\beta$ -aktin (Sigma-Aldrich, A5316, 1:1000)	HRP-konjugovano anti-mišje (Dako, P0260, 1:3000)
Kozje anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, sc-20357, 1:1000)	HRP-konjugovano anti-kozje (Santa Cruz Biotechnology, sc2350, 1:3000)

### 3.9.6. Semikvantitativna analiza imunoblotova

Intenzitet imuno signala na skeniranim membranama i filmovima je određen denzitometrijskom, kvantitativnom analizom, korišćenjem programskog paketa ImageJ (NIH). Dobijene vrednosti svakog uzorka su najpre normalizovane u odnosu na odgovarajuću endogenu kontrolu čime su dobijene relativne vrednosti nivoa proteina. Potom su izračunate srednje vrednosti i standardna greška relativnih vrednosti za sve eksperimentalne grupe. Zbog razmatranja efekata genotipa, vrednosti kontrola su izražene kao vrednost 1, a vrednost genotipa je izražena kao stepen promene u odnosu na vrednosti dobijene za odgovarajuće kontrole.

## 3.10. Histološke analize

Za histološke analize korišćena su antitela ili komercijalne boje, a mikrografije su snimane na fluorescentnom, konfokalnom ili svetlosnom mikroskopu.

### 3.10.1. Priprema uzoraka za imunohistohemijsku analizu

Moždano tkivo je sečeno u koronalnoj ili sagitalnoj ravni upotrebom kriokata (debljina preseka 20  $\mu\text{m}$ ) ili vibratoma (debljina preseka 30  $\mu\text{m}$ ). Preseci koji sadrže moždane regione od interesa, somatosenzorni korteks i hipokampus, bili su odmah upotrebljavani ili su čuvani na temperaturi od  $-20^{\circ}\text{C}$  za kasnije analize.

### 3.10.2. Imunohistohemijsko obeležavanje

Specifično imunohistohemijsko obeležavanje za konfokalnu mikroskopiju urađeno je na nemontiranim (eng. *free-floating*) presecima ili na presecima zalepljenim za mikroskopske pločice. Čitav postupak, osim inkubacije u primarnom antitelu, urađen je na sobnoj temperaturi uz lagano mućkanje, a rastvori su pripremani u 0,1 M fosfatnom puferu, pH 7,4. Preseci su najpre dobro isprani 3 puta po 5 minuta u fosfatnom puferu i zatim prebačeni u rastvor za blokiranje nespecifičnog vezivanja - 5% normalni serum magarca (Jackson Laboratories, SAD) rastvoren u PBS-u sa dodatkom 0,3% Triton X deterdženta (Sigma, SAD), u kome su inkubirani 1 h na sobnoj temperaturi. Ovako pripremljeni preseci su prebačeni u rastvor primarnog antitela ili lektina (**Tabela 5**) i inkubirani preko noći na  $4^{\circ}\text{C}$ .

Nevezana primarna antitela su uklonjena ispiranjem u fosfatnom puferu 3 puta po 5 minuta, pa su preseći inkubirani 1 h sa odgovarajućim sekundarnim antitelom (**Tabela 5**). IgG je nakon koraka blokiranja obeležen direktno sekundarnim antitelom. Preseći su nakon inkubacije sa sekundarnim antitelima isprani 5 puta po 5 minuta u fosfatnom puferu, nakon čega su *free-float* preseći postavljeni na SuperFrost® pločice (Dako, SAD) i osušeni na vazduhu 30 minuta. Pločice sa svim presecima su potom montirane nakapavanjem medijuma za fluorescentno (Dako) ili svetlosno mikroskopiranje (Thermo Fisher, SAD) i preklapljeni pokrovnim stakalcima. Medijum za fluorescentno mikroskopiranje je sadržavao DAPI (eng. *4',6-diamidino-2-phenylindole*) boju (Southern Biotech, SAD) koja obeležava jedra ćelija i specifično se vezuje za A-T dvolančane DNK regione. Imunohistohemijsko bojenje je analizirano na konfokalnom mikroskopu Nikon, dok je bojenje Prusko plavim snimljeno na svetlosnom mikroskopu BZ9000 (Keyence, SAD). Odgovarajuća negativna kontrola (bez primarnog antitela) je potvrdila odsustvo nespecifičnog vezivanja.

Krvni sudovi su obeleženi lektinom. Lektin je histološka boja izolovana iz paradajza (lat. *Lycopersicon esculentum lectin*), koja je hemijskim putem obeležena fluoroforom (Alexa Fluor 488 ili 594) i koja se specifično vezuje za ugljene hidrate na plazma membrani endotelnih ćelija (Robertson et al., 2015). Lektin može biti injeciran u butnu venu miša ili u retro-orbitalni prostor, ali se preseći mozga mogu inkubirati u lektinu i zajedno sa primarnim antitelima.

Za obeležavanje plaka, preseći su inkubirani 8 minuta u 1% rastvoru histohemijske boje Tioflavin S (Sigma), dok je za obeležavanje depozita gvožđa, korišćen rastvor Prusko plavog (Thermo Fisher) u kome su preseći inkubirani 10 minuta.

**Tabela 5. Primarna i sekundarna antitela korišćena za imunohistohemiju.**

<b>Primarno antitelo ili lektin (Proizvođač, kataloški broj, razblaženje)</b>	<b>Sekundarno antitelo ili IgG (Proizvođač, kataloški broj, razblaženje)</b>
<i>Mikroglija</i>	
Zečje anti-mišje Iba1 (eng. <i>ionized calcium binding adaptor molecule 1</i> ) (Wako, 019-19741; 1:500)	Alexa fluor 568-konjugovano magareće anti-zečje (Invitrogen, A-10042,1:500)
<i>Astroцитi</i>	

Zečje anti-goveđi GFAP (eng. <i>glial fibrillary acidic protein</i> ) (Dako, Z0334,1:500)	Alexa fluor 568-konjugovano magareće anti-zečje (Invitrogen, A-10042,1:500)
<i>Neuroni</i>	
Mišje anti-mišje NeuN (eng. <i>neuronal nuclear antigen</i> ) (Millipore, ABN78, 1:500)	Alexa fluor 568-konjugovano magareće anti-zečje (Invitrogen, A-10042, 1:500)
Mišje anti-neurofilament H, klon SMI312 (Biolegend, 837904, 1:200)	Alexa fluor 488-konjugovano magareće anti-mišje (Invitrogen, A-21202, 1:500)
Mišje anti-MAP2 (eng. <i>microtubule-associated protein 2</i> ) (BD Pharmingen, 556320, 1:500)	Alexa fluor 488-konjugovano magareće anti-mišje (Invitrogen, A-21202, 1:500)
Kozje anti-MBP (eng. <i>myelin basic protein</i> ) (Santa Cruz, sc-13914-R, 1:500)	Alexa fluor 568-konjugovano magareće anti-kozje (Invitrogen, A-11057, 1:500)
<i>Krvni sudovi</i>	
Dylight 488-konjugovani <i>L. esculentum</i> lektin (Vector Labs, DL-1174, 1:200)	N/A
<i>Periciti</i>	
Kozje anti-CD13 (R&D Systems, AF2335, 1:200)	Alexa fluor 568-konjugovano magareće anti-kozje (Invitrogen, A-11057, 1:500)
<i>Čvrste veze endotela</i>	
Zečje anti-ZO1 (eng. <i>zonula occludens 1</i> ) (R&D Systems, AF2335, 1:200)	Alexa fluor 568-konjugovano magareće anti-zečje (Invitrogen, A-10042, 1:500)
<i>Fibrinogen</i>	
Zečje anti-humani fibrinogen (Dako, A0080,1:400)	Alexa fluor 568-konjugovano magareće anti-zečje (Invitrogen, A-10042,1:500)
<i>IgG</i>	
N/A	Alexa fluor 647-konjugovano magareće anti-mišje (Invitrogen, A-31571,1:200)
<i>PICALM</i>	
Kozje anti-PICALM klon C-18 (Santa Cruz Biotechnology, sc-6433 1:200)	Alexa fluor 568-konjugovano magareće anti-kozje (Invitrogen, A-11057, 1:500)
<i>Glatke mišične ćelije</i>	
Mišje FITC-konjugovano $\alpha$ SMA (eng. <i><math>\alpha</math>-smooth muscle actin</i> ) (Sigma, klon 1A4, F3777, 1:500)	N/A
<i>Amiloid-<math>\beta</math></i>	
Zečje anti-A $\beta$ (Cell Signaling, 8243S, 1:500)	Alexa fluor 647- konjugovano magareće anti-zečje (Invitrogen, A-31573,1:500)

### 3.10.3. Kvantifikacija broja Iba-pozitivnih mikroglijskih i GFAP-pozitivnih astrocitnih ćelija

Kvantifikacija je urađena sa mikrografija koje su snimljene na BZ9000 fluorescentnom mikroskopu (uveličanje 20x). Intenzitet signala je analiziran upotrebom *ImageJ* programa (US National Institutes of Health) programa i specifične obrade signala (Otsu), nakon čega je izmeren % regiona koji je pokriven sa Iba-1- i GFAP-pozitivnim signalom. Za svaku životinju je analizirano po 5 nasumično odabranih polja na 2-4 nesusedna preseka. Reprezentativne mikrografije su snimane na Nikon konfokalnom mikroskopu uz konstantne uslove snimanja (ista standardna jačina, digitalni ofset i intenzitet lasera prilikom snimanja svih grupa životinja koje su poređene).

### 3.10.4. Kvantifikacija zastupljenosti amiloid- $\beta$ depozita i plaka obeleženih sa Tioflavin S bojom

Amiloid- $\beta$ - i tioflavin-S-pozitivni signali su analizirani korišćenjem *ImageJ* programa (US National Institutes of Health). Mikrografije dobijene upotrebom BZ9000 fluorescentnog mikroskopa i uveličanja 20x (veličina slika 640 x 480  $\mu\text{m}$ ) su podvrgnute obradi korišćenjem kompjuterskog programa sa prethodno definisanim parametrom za analizu Otsu (*ImageJ*) nakon čega je izmeren % regiona koji je pokriven signalom (Lazic et al., 2019; Sagare et al., 2013a). Za svaku životinju je analizirano po 5 nasumično odabranih polja na 4 nesusedna preseka (razmaka  $\sim 100 \mu\text{m}$ ). Analizirano je šest do osam životinjau svakoj grupi.

### 3.10.5. Kvantifikacija nivoa fibrinogena i IgG

Kvantifikacija je urađena sa maksimalnih Z-projeksija debljine 10  $\mu\text{m}$  koje su dobijene upotrebom BZ9000 fluorescentnog mikroskopa. Analiza je bila ista kao što je prethodno opisano (Lazic et al., 2019; Montagne et al., 2018). Ukratko, količina depozita fibrinogena i IgG izvan kapilara je određena kao intergisana gustina signala (eng. *integrated density*) na spoljašnjoj strani kapilara koji su bili obojeni lektinom. Reprezentativne

mikrografije su snimljene na Nikon konfokalnom mikroskopu uz konstantne uslove snimanja (ista standardna jačina, digitalni ofset i intenzitet lasera prilikom snimanja svih grupa životinja koje su poređene). Za svaku životinju je analizirano po 5 nasumično odabranih polja iz korteksa i hipokampusa na 4 nesusedna preseka (razmaka  $\sim 100 \mu\text{m}$ ). Analizirano je šest do osam životinja u svakoj grupi.

### 3.10.6. Kvantifikacija cerebralne amiloidne angiopatije

Za vizualizaciju cerebralne amiloidne angiopatije (CAA), preseki mozga su dvojno obeleženi sa  $\alpha$ -aktinom glatkih mišića ( $\alpha\text{SMA}$ ) i  $\text{A}\beta$  antitelom, pa slikani na BZ9000 fluorescentnom mikroskopu upotrebom uveličanja od 10x. U svakoj životinji, 3 preseka i 5 slika po preseku koji sadrže pialne arterije i penetrirajuće arteriole ( $\geq 20 \mu\text{m}$ ) su analizirani kao što je prethodno opisano (Cortes-Canteli et al., 2010; Lin et al., 2016) uz modifikacije. Ukratko, na mikrografijama koje sadrže oba kanala ( $\alpha\text{SMA}$  i  $\text{A}\beta$ ), krvni sudovi su opertani ručno, pa je region izvan krvnog suda izbrisan. Nakon podešavanja praga za oba kanala (Otsu), % površine koja je bila prekrivena signalom je izračunat za oba kanala u okviru prethodno određene zone. Procenat zastupljenosti  $\text{A}\beta$  signala je podeljen sa % površine koja je bila obeležena sa  $\alpha\text{SMA}$  kako bi se dobio % količine  $\text{A}\beta$  u krvnim sudovima. Analizirano je ukupno 10-15 krvnih sudova po životinji, u 5-7 životinja po grupi.

### 3.10.7. Kvantifikacija pokrivenosti krvnih sudova pericitima

Kvantifikacija je urađena sa mikrografija koje su snimljene na BZ9000 fluorescentnom mikroskopu (uveličanje 20x). Region prekriven CD13- i lektin-pozitivnim signalom je izmeren korišćenjem Otsu obrade signala (*ImageJ*), nakon čega je pokrivenost pericitima izračunata kao odnos % površine CD13 signala u okviru lektin-pozitivne teritorije. Analizirani su samo kapilari, definisani kao krvni sudovi dijametra  $\leq 6 \mu\text{m}$ . Za svaku životinju je analizirano po 5 nasumično odabranih polja na 2-4 nesusedna preseka. Reprezentativne mikrografije su snimljene na Nikon konfokalnom mikroskopu uz konstantne

uslove snimanja (ista standardna jačina, digitalni ofset i intenzitet lasera prilikom snimanja svih grupa životinja koje su poređene).

#### 3.10.8. Određivanje i kvantifikacija depozita hemosiderina

Depoziti hemosiderina u moždanom tkivu su detektovani uz pomoć komercijalnog eseja (eng. *Prussian blue kit*) kao što je prethodno opisano (Zhong et al., 2008). Procenat regiona okupiran Prusko plavim je kvantifikovan u softverskom paketu *ImageJ*. Fotomikrografije iz 5 nasumično selektovanih polja iz korteksa i hipokampusa iz 4 preseka (razmaka 100  $\mu\text{m}$ ) su analizirane za svaku životinju.

#### 3.10.9. Određivanje PICALM signala u MAP2-pozitivnim neuronima

Količina PICALM-pozitivnog signala je određena u MAP2-pozitivnim neuronima hipokampusa, uz pomoć *ImageJ* programa. Mikrografije za analizu i reprezentativne mikrografije su snimljene na Nikon konfokalnom mikroskopu uz konstantne uslove snimanja (ista standardna jačina, digitalni ofset i intenzitet lasera prilikom snimanja svih grupa životinja koje su poređene).

#### 3.10.10. Određivanje broja NeuN-pozitivnih i NeuN/tdTomato-duplo pozitivnih ćelija, kao i SMI312 i MBP-pozitivnog signala

Broj NeuN-pozitivnih, kao i duplo pozitivnih (NeuN/tdTomato) ćelija je određen ručno, sa mikrografija jednakih dimenzija, snimljenih na BZ9000 mikroskopu. Količina SMI312 ili MBP-pozitivnog signala je određena uz pomoć *ImageJ* softvera nakon Otsu obrade signala. Mikrografije za analizu i reprezentativne mikrografije su snimljene na Nikon konfokalnom mikroskopu uz konstantne uslove snimanja (ista standardna jačina, digitalni ofset i intenzitet lasera prilikom snimanja svih grupa životinja koje su poređene).

### 3.11. Određivanje koncentracije humanog A $\beta$ 42 ELISA metodom

Koncentracija humanog A $\beta$ 42 u uzorku korteksa i hipokampusa je određena ELISA (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*) metodom upotrebom kompleta i po uputstvu proizvođača (Invitrogen, SAD). Ukratko, tkivo korteksa i hipokampusa je homogenizovano u puferu koji sadrži 5 M guanidin HCl/50 mM Tris HCl (pH 8.0) u zapremini 8 puta većoj od težine tkiva i inkubirano 3 sata na sobnoj temperaturi na šejkeru. Uzorci su zatim razblaženi sa hladnim PBS-om koji sadrži koktel proteaznih inhibitora (Roche, SAD) i centrifugirani na brzini 16 000 x g, 20 minuta na 4 °C. Standardne krive su oformljene za računanje koncentracije A $\beta$ 42 iz supernatanta i rezultati su prezentovani kao pg/ml.

### 3.12. Statistička i grafička obrada rezultata

Statistička obrada rezultata je urađena u programu GraphPadPrism 7.0. Prilikom poređenja dve eksperimentalne grupe, najpre je urađen F test da bi se odredila razlika u varijansi između grupa koje se porede, dok je statistička značajnost određena upotrebom Studentovog t-testa ili dodatkom *Welch*-ove korekcije ukoliko su standardne varijanse bile značajno različite. Poređenje tri ili više grupa je urađeno jednofaktorskim, dvofaktorskim ANOVA testom (eng. *analysis of variance*) ili dvofaktorskim ANOVA testom sa ponavljajućim merenjima i *post-hoc* testom za određivanje značajnosti (*Kruskal-Wallis* ili *Tukey*). Za sve analize, korišćen je *Shapiro-Wilk*-ov test za testiranje normalnosti i odgovarajući test je korišćen za određivanje statističke značajnosti u softverskom programu GraphPad Prism 7.0. Statistički značajnim razlikama su smatrane one kod kojih je  $p < 0.05$ . Na graficima, statistički značajne promene u odnosu na kontrolnu grupu su obeležene simbolom \* za vrednosti  $p < 0.05$ , \*\* za vrednosti  $p < 0.01$  ili \*\*\* za vrednosti  $p < 0.001$ .

Za grafičku obradu rezultata korišćen je GraphPad Prism 7.0 i Adobe Creative Cloud 2017 kompjuterski program.

## 4. REZULTATI

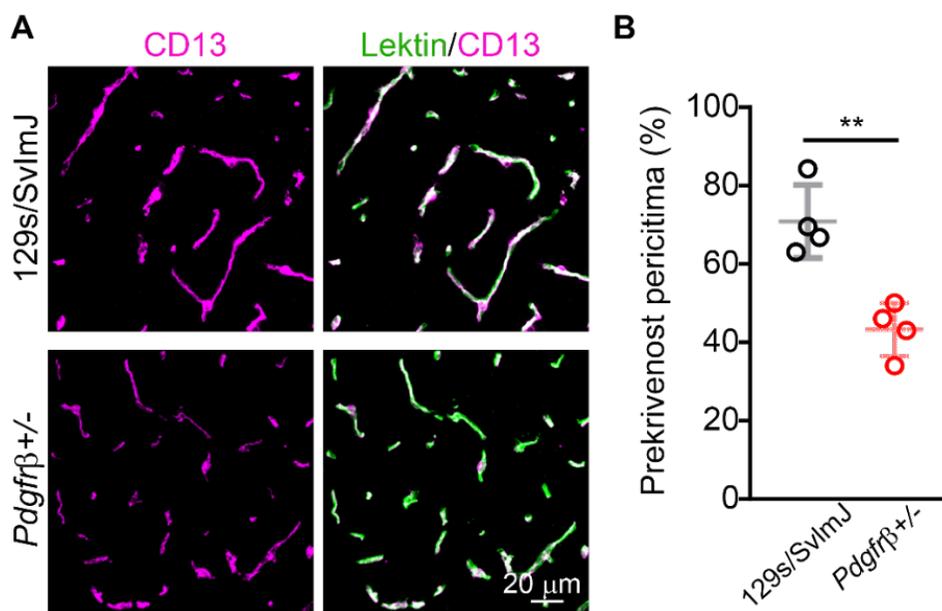
### 4.1. Nedostatak pericita dovodi do deficita u ponašanju u odsustvu patologije izazvane $\beta$ -amiloidom

#### 4.1.1. Karakterizacija životinjskog modela hroničnog gubitka pericita

##### 4.1.1.1. Karakterizacija KMB

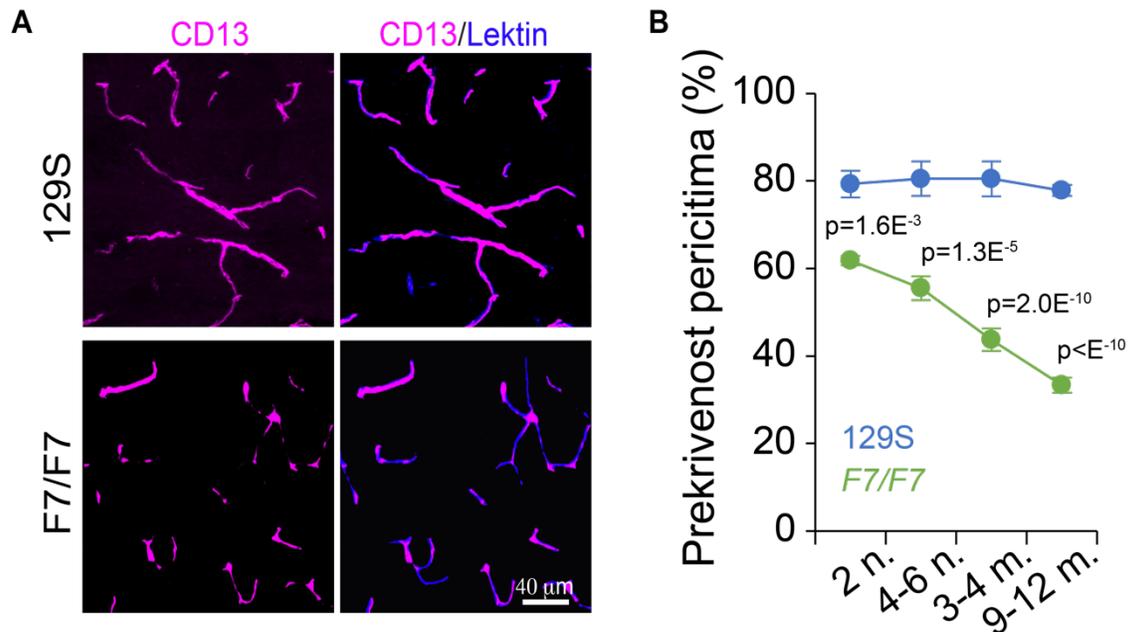
Da bi se ispitala uloga pericita i receptora PDGFR $\beta$  u održanju stabilnosti krvno-moždane barijere, upotrebljene su transgene životinje sa mutacijom u receptoru PDGFR $\beta$ . Nekoliko transgenih modela sa mutacijama u receptoru PDGFR $\beta$  je prethodno kreirano i opisano, od kojih neki imaju samo delimičan gubitak receptora, kao što su heterozigotne životinje *Pdgfr* $\beta^{+/-}$ , dok su kod drugih prisutne mutacije koje remete transdukciju signala koja zavisi od aktivnosti PDGFR $\beta$  receptora, kao što su npr. *Pdgfr* $\beta^{F7/F7}$  miševi. Životinje koje karakteriše potpuni gubitak PDGFR $\beta$  receptora, *Pdgfr* $\beta^{-/-}$  životinje, nisu vijabilne i umiru rano u perinatalnom razvoju, što dodatno govori o važnosti funkcionalnog PDGFR $\beta$  receptora (Tallquist et al., 2003).

Na početku analiza *Pdgfr* $\beta^{+/-}$  životinja, najpre je imunohistohemijski ispitana prekrivenost kapilara pericitima upotrebom markera pericita, CD13, i markera krvnih sudova, lektina (izolovanog iz paradajza, *Lycopersicon esculentum lectin*) koji se specifično vezuje za ugljene hidrate endotelnih ćelija (Robertson et al., 2015). Ovaj imunohistohemijski metod je prihvaćen kao pouzdan i relativno brz metod za određivanje količine pericita koji naležu na krvne sudove, naročito kapilare, i time indirektno ukazuju na stabilnost krvno-moždane barijere. Imunohistohemijska analiza *Pdgfr* $\beta^{+/-}$  miševa starosti 6-8 meseci je pokazala smanjenje pokrivenost pericitima za oko 40% u poređenju sa odgovarajućim kontrolama (129s/SvImJ) (**Slika 14**).



**Slika 14. Prekrivenost krvno-moždane barijere pericitima kod *Pdgfrβ*<sup>+/-</sup> miševa.** (A) Reprezentativne mikrografije i (B) kvantifikacija prekrivenosti kapilara (obeleženi lektinom, zeleno) pericitima (obeleženi markerom CD13, ljubičasto) u korteksu *Pdgfrβ*<sup>+/-</sup> transgenih i 129s/SvImJ kontrolnih životinja starosti 6-8 meseci. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija za svaku grupu ( $n=4$  životinje po grupi). \*\* $p < 0,01$ . Skala = 20  $\mu$ m.

Ista analiza primenjena je i za ispitivanje pokrivenost kapilara pericitima u drugom transgenom modelu, *Pdgfrβ*<sup>F7/F7</sup>. Kod ovog modela, dolazi do bržeg razvijanja procesa gubitka pericita u odnosu na *Pdgfrβ*<sup>+/-</sup> model, usled prisustva 7 mutacija na PDGFR $\beta$  receptoru na mestima koje sadrže tirozin, čime se onemogućava fosforilacija tirozinskih ostataka i vezivanje proteina koji sadrže domen SH2 i time dalje iniciranje mnogih signalnih puteva (Tallquist et al., 2003). Ispitivane su stoga životinje starosti 2 nedelje, 4-6 nedjelja, 3-4 meseca i 9-12 meseci i rezultati su upoređeni sa odgovarajućim 129s/SvImJ kontrolnim životinjama. Analizom pokrivenosti kapilara pericitima kod *Pdgfrβ*<sup>F7/F7</sup> životinja starih 4-6 nedjeljaje utvrđeno da je gubitak prekrivenosti pericitima već prisutan i da iznosi oko 24%, dok je kod 4 meseca starih životinja gubitak iznosio i do 50% pericita u region *corpus callosumu* odnosu na kontrolne životinje odgovarajuće starosti. Kod životinja starih 9-12 meseci, gubitak pericita je iznosio skoro 60% (Slika 15).



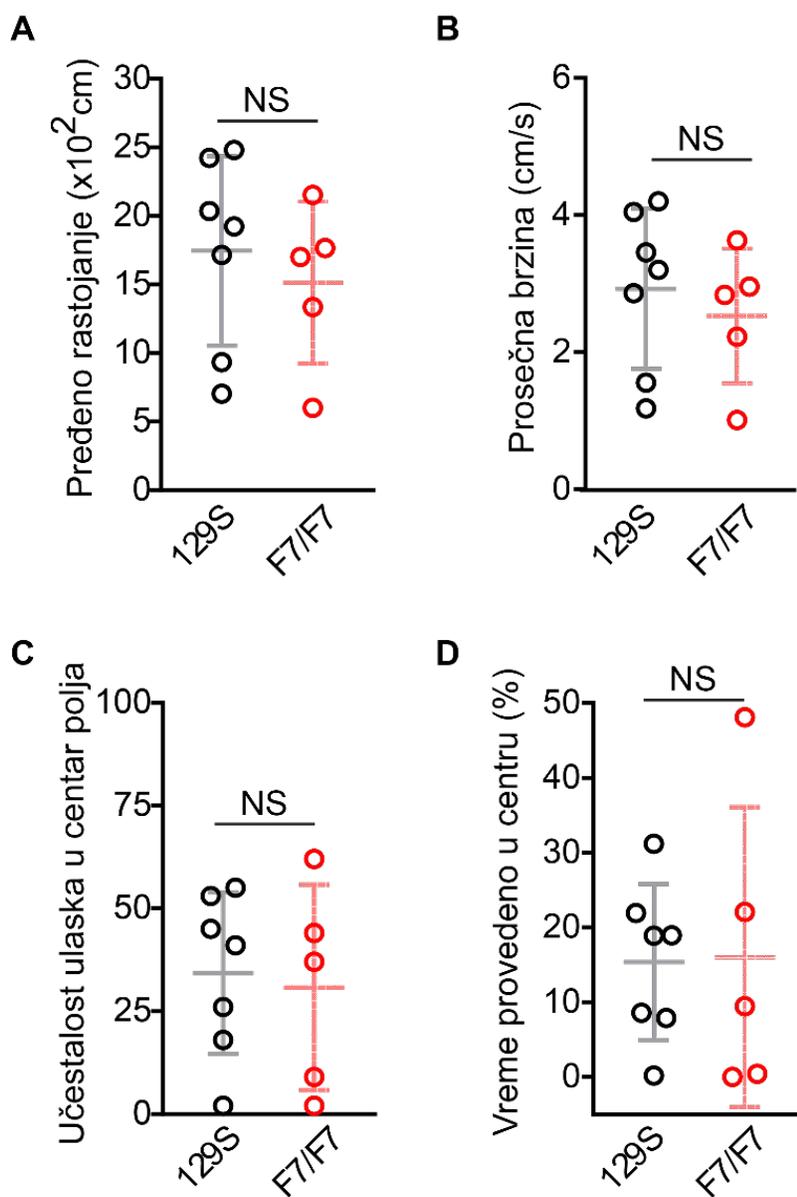
**Slika 15. Prekrivenost krvno-moždane barijere pericitima kod *Pdgfrβ<sup>F7/F7</sup>* miševa. (A)** Reprezentativne mikrofografije miševa 4-6 meseca starosti i **(B)** kvantifikacija prekrivenosti kapilara (obeleženi lektinom, plavo) pericitima (obeleženi markerom CD13, ljubičasto) u *corpus callosum*-u *Pdgfrβ<sup>F7/F7</sup>* transgenih i 129s/SvImJ kontrolnih životinja starosti 2 nedelje, 4-6 nedjelja, 3-4 meseca i 9-12 meseci. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija za svaku grupu.  $n=4$  životinje po grupi. Statistička značajnost je prikazana u vidu tačnih p vrednosti. Skala = 40  $\mu\text{m}$ .

#### 4.1.1.2. Gubitak pericita ne dovodi do promena u ponašanju u testu generalne aktivnosti

Prema podacima u literaturi, heterozigotni gubitak PDGFR $\beta$  receptora kod mišjeg modela Alchajmerove bolesti *Pdgfr $\beta^{+/-}$ ; AppSw $^{+0}$* , dovodi do većeg gubitka pericita u odnosu na *Pdgfr $\beta^{+/-}$*  životinje (Sagare et al., 2013b). Utvrđeno je takođe da nedostatak pericita u *AppSw $^{+0}$*  modelu dodatno pogoršava kognitivne funkcije (Sagare et al., 2013b). Međutim, rezultati do sada nisu pokazali da li sam gubitak pericita, bez prisustva A $\beta$  može da dovede do promena u ponašanju. Stoga se u daljim analizama pristupilo karakterizaciji ponašanja životinja i to korišćenjem mišijeg modela *Pdgfr $\beta^{F7/F7}$*  kod koga je dektovan veći gubitak pericita nego u modelu *Pdgfr $\beta^{+/-}$*  miševa.

Životinje starosti 5-7 meseci su okarakterisane ispitivanjima u testovima ponašanja, uključujući senzomotorne i kognitivne testove. Od testova za ispitivanje motorike, ispitani su test otvorenog polja, hodanje po gredi, uklanjanje adheziva, rotarod i kompleksni točak za trčanje (**Slike 16 - 19**).

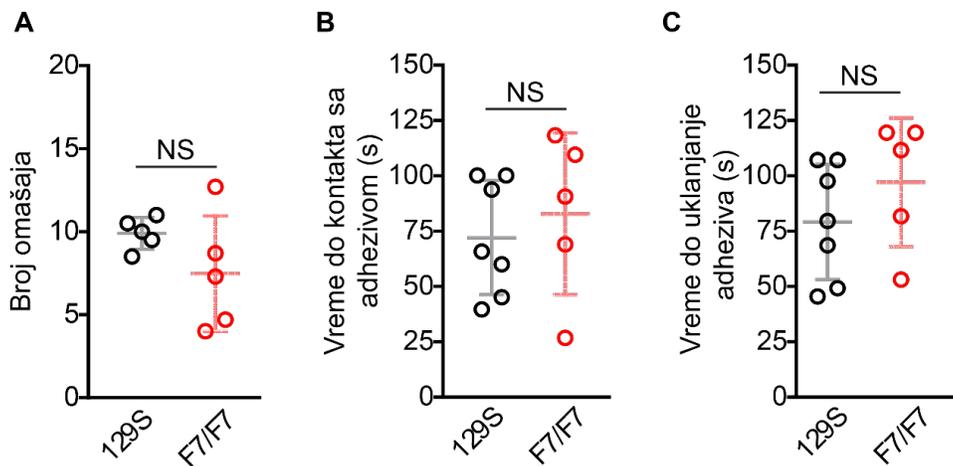
Test otvorenog polja je jedan od osnovnih testova za ispitivanje generalne aktivnosti miševa, ali se može koristiti i za detektovanje anksioznosti (Seibenhener and Wooten, 2015). U eksperimentima su mereni parametri kao što su pređeno rastojanje, prosečna brzina kretanja, učestalost ulaska u centar polja i vreme provedeno u centru. Kod 5-7 meseci starih *Pdgfr $\beta^{F7/F7}$*  miševa nisu zapažene promene ni u jednom od ispitivanih parametara (**Slika 16**).



**Slika 16.** Ponašanje u testu otvorenog polja nije izmenjeno kod  $Pdgfr\beta^{F7/F7}$  miševa u poređenju sa 129s/SvlmJ kontrolnim životinjama. (A) Pređeno rastojanje, (B) prosečna brzina kretanja, (C) učestalost ulaska u centar polja i (D) vreme provedeno u centru polja kod  $Pdgfr\beta^{F7/F7}$  (F7/F7) transgenih i 129s/SvlmJ (129S) kontrolnih životinja starosti 5-7 meseci. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija za svaku grupu.  $n=5-7$  životinja po grupi. NS - nema značajnosti (eng. *non significant*).

#### 4.1.1.3. Gubitak pericita ne dovodi do promena u ponašanju u sensorimotornim testovima

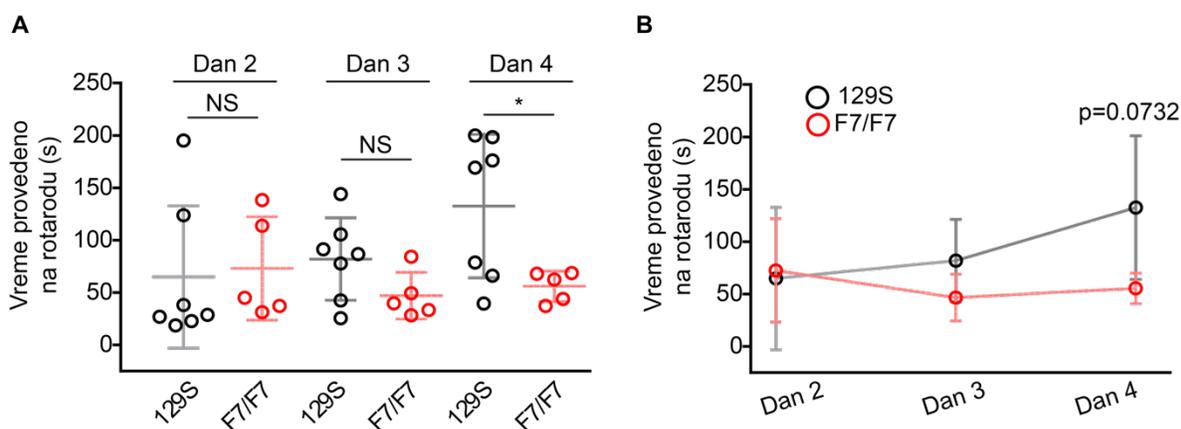
Senzorimotorni testovi, test hodanja po gredi i uklanjanje adheziva, se uglavnom koriste da bi se detektovale promene u motorici kao odgovor na senzorni stimulus, kao i asimetrije u funkcionisanju leve odnosno desne strane tela, na primer tokom asimetrične lezije ili ishemije (Frost et al., 2006; Schallert et al., 1982). Tokom testa hodanje po gredi, zabeležen je broj omašaja životinje da postavi šapu na gredu, i uprkos velikoj varijabilnosti kod *Pdgfr $\beta$ <sup>F7/F7</sup>* miševa, nisu detektovani deficiti (**Slika 17A**). Tokom testa uklanjanja adheziva mereno je vreme potrebno do inicijalnog kontakta sa adhezivom i vreme potrebno da životinja ukloni adheziv. Kod 5-7 meseci starih *Pdgfr $\beta$ <sup>F7/F7</sup>* miševa nisu detektovani deficiti u poređenju sa njihovim kontrolama (**Slika 17B, C**).



**Slika 17. *Pdgfr $\beta$ <sup>F7/F7</sup>* miševi ne pokazuju deficite u sensorimotornim testovima ponašanja: hodanje po gredi i uklanjanje adheziva.** (A) Broj omašaja u testu hodanje po gredi, (B) vreme provedeno do kontakta sa adhezivom i (C) vreme potrebno za uklanjanje adheziva kod *Pdgfr $\beta$ <sup>F7/F7</sup>* (F7/F7) transgenih i 129s/SvImJ (129S) kontrolnih životinja starosti 5-7 meseci. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija za svaku grupu.  $n=5-7$  životinja po grupi. Statistička značajnost je označena sa NS - nema značajnosti (eng. *non significant*).

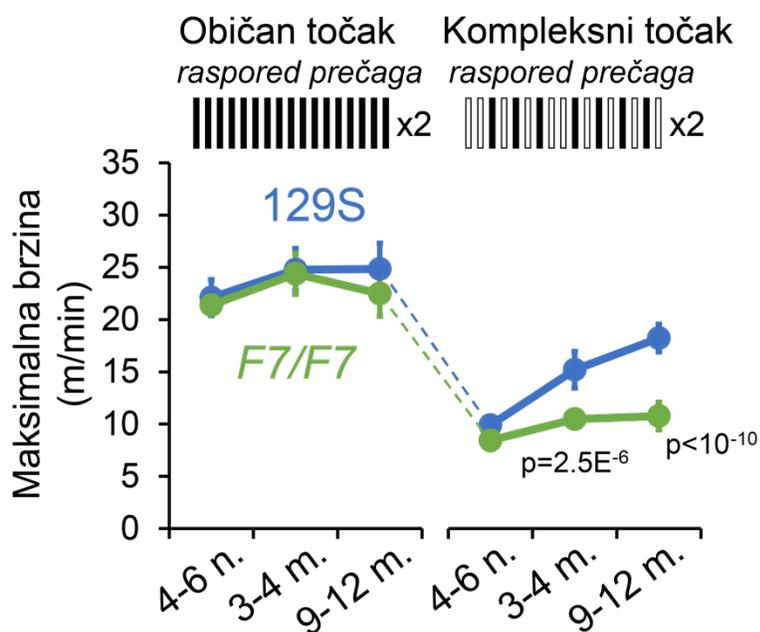
#### 4.1.1.4. Gubitak pericita dovodi do promena u ponašanju u rotarod testu i testu trčanja na kompleksnom točku

*Pdgfr*<sup>F7/F7</sup> miševi su takođe testirani u rotarod testu, gde su pokazali deficite četvrtog dana testa (**Slika 18**). Ovaj test je, za razliku od prethodnih testova, složeniji pošto uključuje i period treninga (tri uzastopna dana, rezultat treninga prvog dana nije prikazan) i ukazuje na promene ne samo umotornom korteksu, već i u regionima korteksa odgovornim za emocionalno i visceralno procesiranje informacija (Scholz et al., 2015), kao i u kortikostrijatalnom putu (Costa et al., 2004) i mijelinizaciji (Franco-Pons et al., 2007; McKenzie et al., 2014). Rezultati su pokazali da četvrtog dana treninga, *Pdgfr*<sup>F7/F7</sup> miševi provode značajno manje vremena na rotarodu u poređenju sa njihovim kontrolama (**Slika 18A**). Uprkos identičnom treningu, dok kontrolni miševi pokazuju uzlaznu krivu u učenju i sposobnosti izvođenja testa, *Pdgfr*<sup>F7/F7</sup> miševi ne pokazuju isti odgovor prilikom testiranja (p vrednost je 0,0732 kada su rezultati analizirani dvofaktorskom ANOVA testom sa ponavljajućim merenjima) (**Slika 18B**).



**Slika 18.** *Pdgfr*<sup>F7/F7</sup> miševi pokazuju deficite u rotarod testu. (A) Vreme provedeno na rotarodu izraženo u sekundama tokom 3 uzastopna dana i (B) grafikon koji pokazuje sposobnost izvođenja testa kod *Pdgfr*<sup>F7/F7</sup> (F7/F7) transgenih i 129s/SvlmJ (129S) kontrolnih životinja starosti 5-7 meseci. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija za svaku grupu.  $n=5-7$  životinja po grupi. \*  $p < 0,05$ ; NS - nema značajnosti (eng. *non significant*).

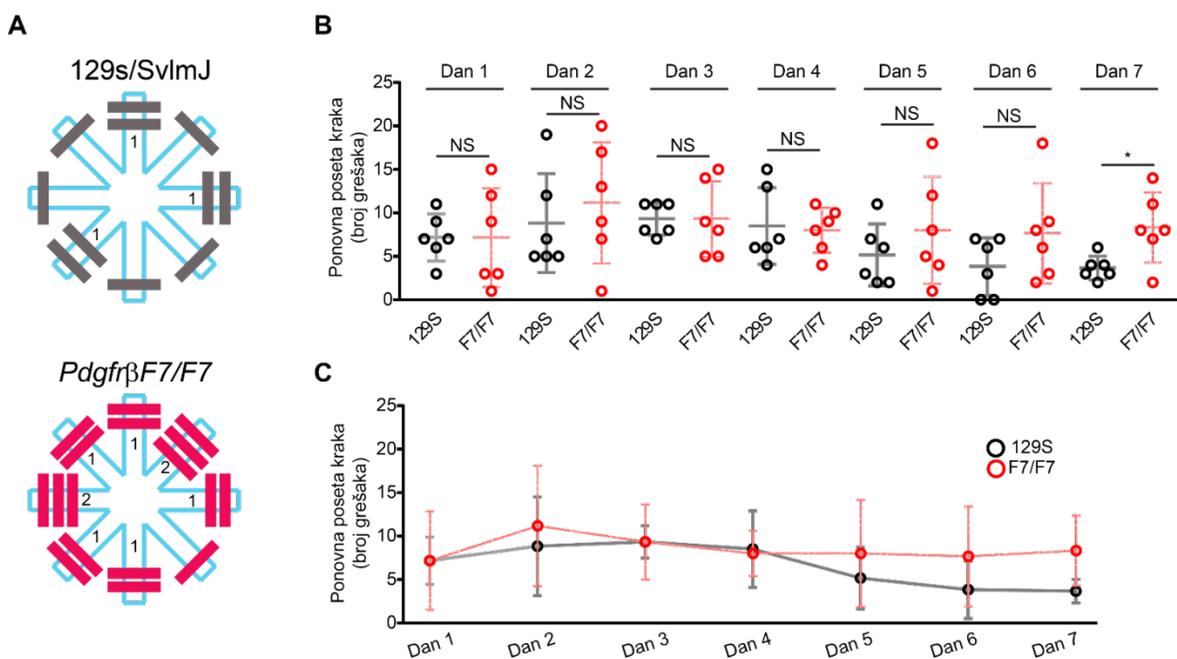
Kako su ovi rezultati ukazali da *Pdgfr $\beta$ <sup>F7/F7</sup>* miševi imaju deficite u beloј masi, kao što su demijelinizacija i gubitak neurona (Montagne et al., 2018), u nastavku istraživanja su korišćeni testovi ponašanja koji su zavisni od bele mase, naročito od regiona *corpus callosum-a* (McKenzie et al., 2014; Schalomon and Wahlsten, 2002), regiona mozga koji povezuje levu i desnu hemisferu i naročito je bogat mijelinskim vlaknima. Jedan od takvih testova je kompleksni točak za trčanje, koji pored motoričke aktivnosti uključuje i pažnju, čime se aktiviraju projekcije iz *corpus callosum-a* do kontralateralnog sensorimotornog i premotornog korteksa i strijatuma (Fame et al., 2011). Nakon treninga u običnom točku za trčanje, gde nisu pokazali značajne deficite u poređenju sa kontrolnim miševima, kada je u kavez postavljen kompleksni točak za trčanje, *Pdgfr $\beta$ <sup>F7/F7</sup>* miševi su pokazali deficite u parametru postizanja maksimalne brzine trčanja (Slika 19).



**Slika 19.** *Pdgfr $\beta$ <sup>F7/F7</sup>* miševi pokazuju deficite u testu trčanja na kompleksnom točku. Maksimalna brzina (m/min) u testu trčanja na kompleksnom točku kod *Pdgfr $\beta$ <sup>F7/F7</sup>* (F7/F7) transgenih i 129s/SvlmJ (129S) kontrolnih životinja starosti 4-6 nedelja, 3-4 i 9-12 meseci. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija za svaku grupu.  $n=6$  životinja po grupi. Statistička značajnost je označena tačnom p vrednosti.

#### 4.1.1.5. Gubitak pericita dovodi do deficita u prostornoj memoriji u testu radijalni lavirint

Prethodno objavljene studije su pokazale da povreda bele mase, npr. u stanju kao što je šlog, ne ostavlja posledice na sposobnosti životinja u izvršavanju motoričkih testova, ali ima značajne negativne efekteu testu radijalnog lavirinta koji detektuje promene u prostornom učenju i pamćenju (Coltman et al., 2011; Ni et al., 1994; Shibata et al., 2007). Ovaj test takođe sadrži i komponentu motivacije (hranom) i uključuje intenzivan trening (Shibata et al., 2007). Rezultati testa sa radijalnim lavirintom su ukazali da *Pdgfrβ*<sup>F7/F7</sup> miševi prave znatno veći broj grešaka pri odabiru novog kraka (predstavljeno dijagramom na **Slici 20A**) koji se mogu uočiti već sedmog dana testiranja (**Slika 20B**). Slično rotarodu, ne-transgene životinje istog okota su pokazale tendenciju ka učenju i pravljenju značajno manje grešaka u odabiru kraka radijalnog lavirinta u odnosu na *Pdgfrβ*<sup>F7/F7</sup> miševе starosti 3-4 meseca (**Slika 20C**). Međutim, kada se rezultati analiziraju ANOVA testom sa ponavljajućim merenjima, razlika između dve grupe nije statistički značajna sedmog dana testiranja.

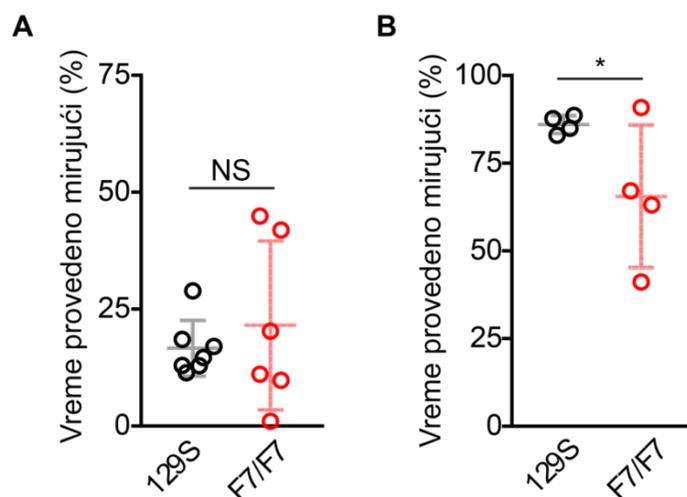


**Slika 20.** *Pdgfrβ*<sup>F7/F7</sup> miševi pokazuju deficite u radijalnom lavirintu, testu prostorne memorije. (A) Šematski prikaz radijalnog lavirinta i primer broja grešaka transgenih i ne-transgenih miševa istog okota. (B) Broj grešaka u radijalnom lavirintu i (C) razlike u trendu učenja kod *Pdgfrβ*<sup>F7/F7</sup> (F7/F7) transgenih i 129s/SvlmJ (129S) kontrolnih životinja starih 3-

4 meseci. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija za svaku grupu.  $n=6$  životinja po grupi. \*  $p < 0,05$ ; NS - nema značajnosti (eng. *non significant*).

#### 4.1.1.5. Gubitak pericita dovodi do deficita u povlačenja memorije u uslovljavanju straha

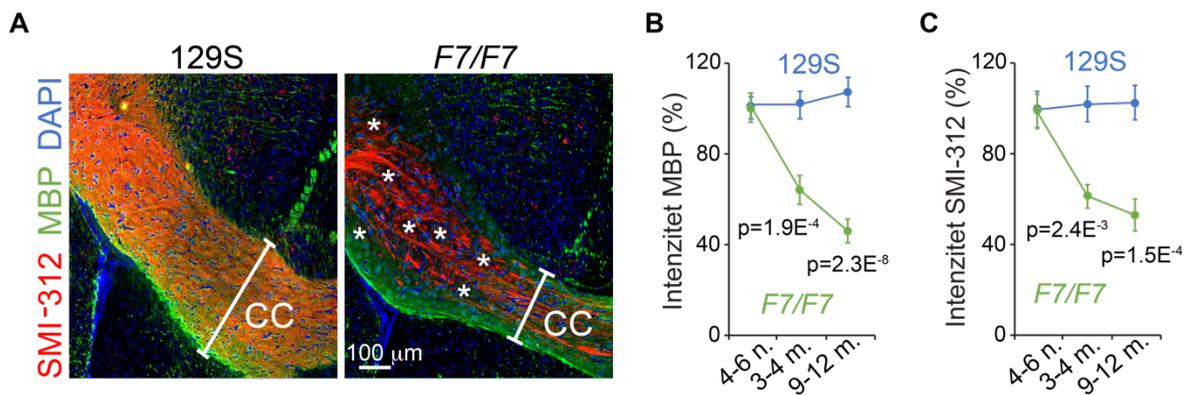
*Pdgfr $\beta^{F7/F7}$*  miševi starosti 5-7 meseci su zatim ispitani kognitivnim testovima ponašanja. Klasično uslovljavanje straha je široko korišćen test ponašanja za detekciju određenih tipova memorije koji mogu ukazati na deficite u funkciji hipokampusa (Phillips and LeDoux, 1992), ali i prednja pojasna kora (Frankland et al., 2004). Rezultati na klasičnom kontekstualnom testu uslovljavanja straha su pokazali da su kod *Pdgfr $\beta^{F7/F7}$*  miševa prisutni deficiti u sposobnosti prisećanja koje se testira 2 nedelje nakon izlaganja šoku, ali ne i u dugotrajnoj memoriji koje je testirana 1 dan nakon izlaganja šoku (Slika 21).



**Slika 21.** *Pdgfr $\beta^{F7/F7}$*  miševi pokazuju deficite u sposobnosti prisećanja, ali ne i u dugotrajnoj memoriji u testu kontekstualnog uslovljavanja straha. Vreme provedeno mirujući u testu kontekstualno uslovljavanje straha 1 dan (A) i dve nedelje (B) nakon izlaganja šoku kod transgenih *Pdgfr $\beta^{F7/F7}$*  (F7/F7) i 129s/SvlmJ kontrolnih životinja (129S) starosti 5-7 meseci. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija za svaku grupu.  $n=4-7$  životinja po grupi. \* $p < 0,05$  ili NS - nema značajnosti (eng. *non significant*).

#### 4.1.1.6. Gubitak pericita dovodi do oštećenja bele mase

S obzirom na dobijene rezultate u testovima ponašanja koji su ukazali na promene u beloj masi, dalje je se pristupilo imunohistohemijskoj analizi *corpus callosum-a* (CC). Izvršeno je duplo imunohistohemijsko bojenje korišćenjem mijelin baznog proteina, MBP i neurofilamenta H (SMI-312). Dobijeni rezultati su ukazali na značajnu razliku u debljini CC kod F7/F7 miševa u poređenju sa ne-transgenim kontrolama, sojem 129S (Slika 22A). Takođe je pokazano da CC kod F7/F7 životinja starosti 3-4 i 9-12 meseci ima znatno smanjenu količinu MBP-a (Slika 22B) i SMI-312 (Slika 22C) neuronskih markera, što ukazuje na gubitak mijelina i aksonsku degeneraciju.

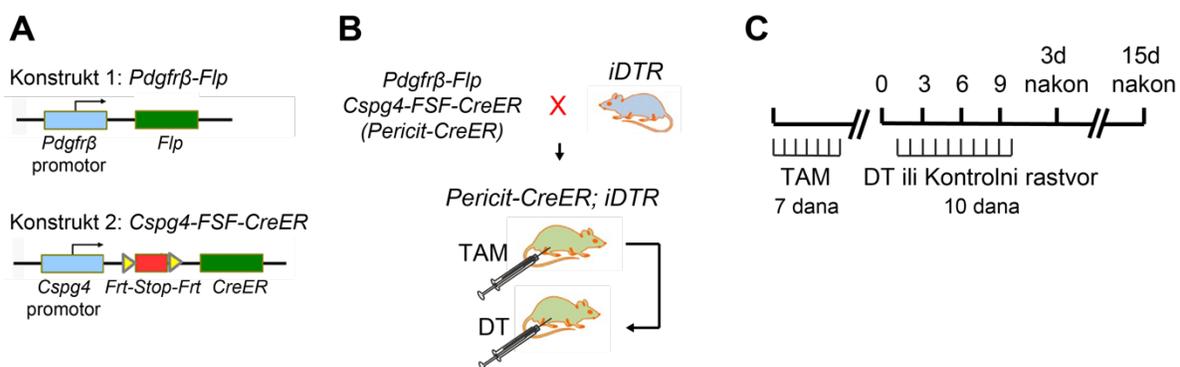


**Slika 22.** *Corpus callosum* (CC) kod *Pdgfr $\beta$ <sup>F7/F7</sup>* (F7/F7) i kontrolnih miševa (129S) obeležen SMI-312 i MBP antitelima. (A) Reprezentativne mikrografije CC kod 129S i F7/F7 miševa starih 9 meseci i (B-C) kvantifikacija MBP-pozitivnih (B) i SMI-312-pozitivnih signala (C) kod 129S i F7/F7 životinja starih 4-6 nedelja, 3-4 meseca i 9-12 meseci. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija za svaku grupu.  $n=4-7$  životinja po grupi. Statistička značajnost je označena tačnom p vrednosti. Skala = 100  $\mu$ m.

#### 4.1.2. Karakterizacija životinjskog modela akutnog gubitka pericita

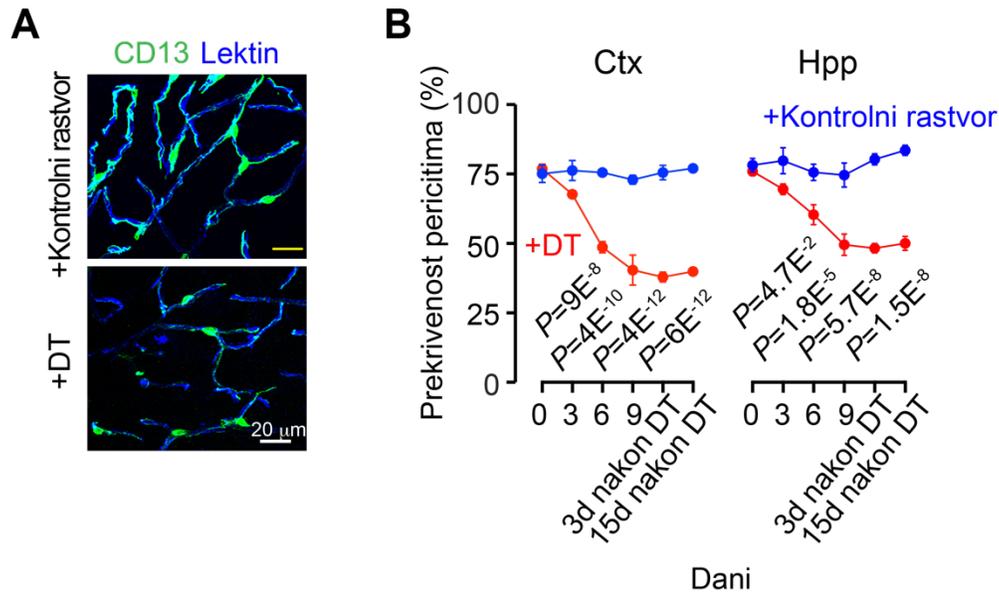
Prethodno navedeni rezultati su pokazali da je u slučajevima genetičke manipulacije receptora PDGFR $\beta$ , i u odsustvu patologije izazvane A $\beta$ , moguće detektovati izvesne promene u ponašanju životinja, uključujući pojedine oblike senzorimotornih deficita, kao i deficite u memoriji. Međutim, kod prethodno opisana dva modela u genetičkom materijalu životinja, mutacije se ispoljavaju još od ranog embrionalnog razvića, tako da se ne može isključiti mogućnost da su ovi miševi razvili određene adaptacije na nasleđene mutacije (Nikolakopoulou et al., 2019). Dodatno, PDGFR $\beta$  receptor, iako najviše eksprimiran na pericitima, nalazi se i na vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama (Vanlandewijck et al., 2018), što otežava zaključak o specifičnoj ulozi pericita u detektovanim promenama u ponašanju.

Da bi se isključio uticaj adaptivnih osobina na mutaciju tokom razvića, kao i specifičnost receptora PDGFR $\beta$  kao markera za pericite, dalje je ispitivan model sa akutnim i specifičnim gubitkom pericita. Ovaj mišji model je razvijen korišćenjem strategije duplog promotora (**Slika 23A**). Naime, receptor PDGFR $\beta$  se eksprimira, kako je prethodno pomenuto, na pericitima i glatkim mišićnim ćelijama krvnih sudova. Sa druge strane, hondroitin-sulfatni proteoglikan 4 (CSPG4) se eksprimira na pericitima i ćelijama oligodendrocitne loze (Zhang et al., 2014). Kako bi se obogatila frakcija pericita, injecirana su dva konstrukta u isti blastocist: jedan sa promotorom *Pdgfr $\beta$*  receptora koji kontroliše ekspresiju flipaze (*Flp*), i drugi sa promotorom za *Cspg4* koji kontroliše ekspresiju *Frt-Stop-Frt-CreER* elementa. Istovremena ekspresija ova dva konstrukta u ćeliji dovodi do kontrolisane ekspresije Cre rekombinaze predominantno u pericitima u odnosu na druge ćelije mozga. Kada se *Pdgfr $\beta$ -Flp-Cspg-Frt-Stop-Frt-CreER* miš (tzv. Pericit-Cre) ukrsti sa mišem koji nosi gen za *iDTR* (eng. *inducible diphtheria toxin receptor*) koji je zavistan od ekspresije *Cre*, nakon tretmana tamoksifenom, ekspimirajuće se *Cre-ER*, zajedno sa DT receptorom (**Slika 23B**). Nakon primene difterija toksina, do smrti ćelija će doći samo u ćelijama koje ekspimiraju DT receptor.



**Slika 23. Strategija duplog promotora i dizajn *Pdgfrβ-Flp*; *Cspg4-FSF-CreER* (tzv. Pericit-Cre) miševa.** (A) Konstrukti 1 sadrži receptor *Pdgfrβ* čiji promotor kontrolira ekspresiju *Flp* (eng. *flippase*) rekombinaze. Konstrukti 2 sadrži *Cspg4* promotor koji kontrolira ekspresiju *Frt-Stop-Frt* (eng. *flippase recognition target*) i *Cre-ER* gena. (B) Šematski prikaz ukršanja Pericit-Cre miša sa mišem koji nosi gen za *iDTR* (eng. *inducible diphtheria toxin receptor*). (C) Eksperimentalni dizajn: Pericit-Cre; iDTR miševi su injicirani tamoksifenom sedam dana, nakon čega je napravljena pauza od sedam dana. Nakon toga, isti miševi su tretirani difterija toksinom (DT) 10 dana. Trećeg i petnaestog dana nakon završetka tretmana DT, životinje su ispitane testovima ponašanja.

Eksperiment je dizajniran na sledeći način: najpre su Pericit-Cre;iDTR miševi svakodnevno intraperitonealno injicirani tamoksifenom, tokom sedam dana, kako bi se omogućila ekspresija inducibilnog Cre-ER elementa i time ekspresija inducibilnog receptora humanog difterija toksina koji se inače ne nalazi u mišjem genomu (Slika 24C). Nakon završenog tretmana tamoksifenom, napravljena je pauza od sedam dana, kako bi se osigurala ekspresija svih elemenata neophodnih za sledeći korak. Nakon toga, miševi su podeljeni u dve grupe. Jedna grupa je deset dana primala intraperitonealne injekcije toksina difterija, što je omogućilo da se toksin veže sa svoj receptor na pericitima i izazove njihovu smrt, dok je druga grupa primala intraperitonealne injekcije kontrolnog rastvora. Rezultati imunohistohemijske analize su pokazali da Pericit-Cre miševi imaju značajno smanjenu prekrivenost krvnih sudova pericitima u korteksu i hipokampusu, što je potvrda uspešnosti i specifičnosti modela (Slika 24).

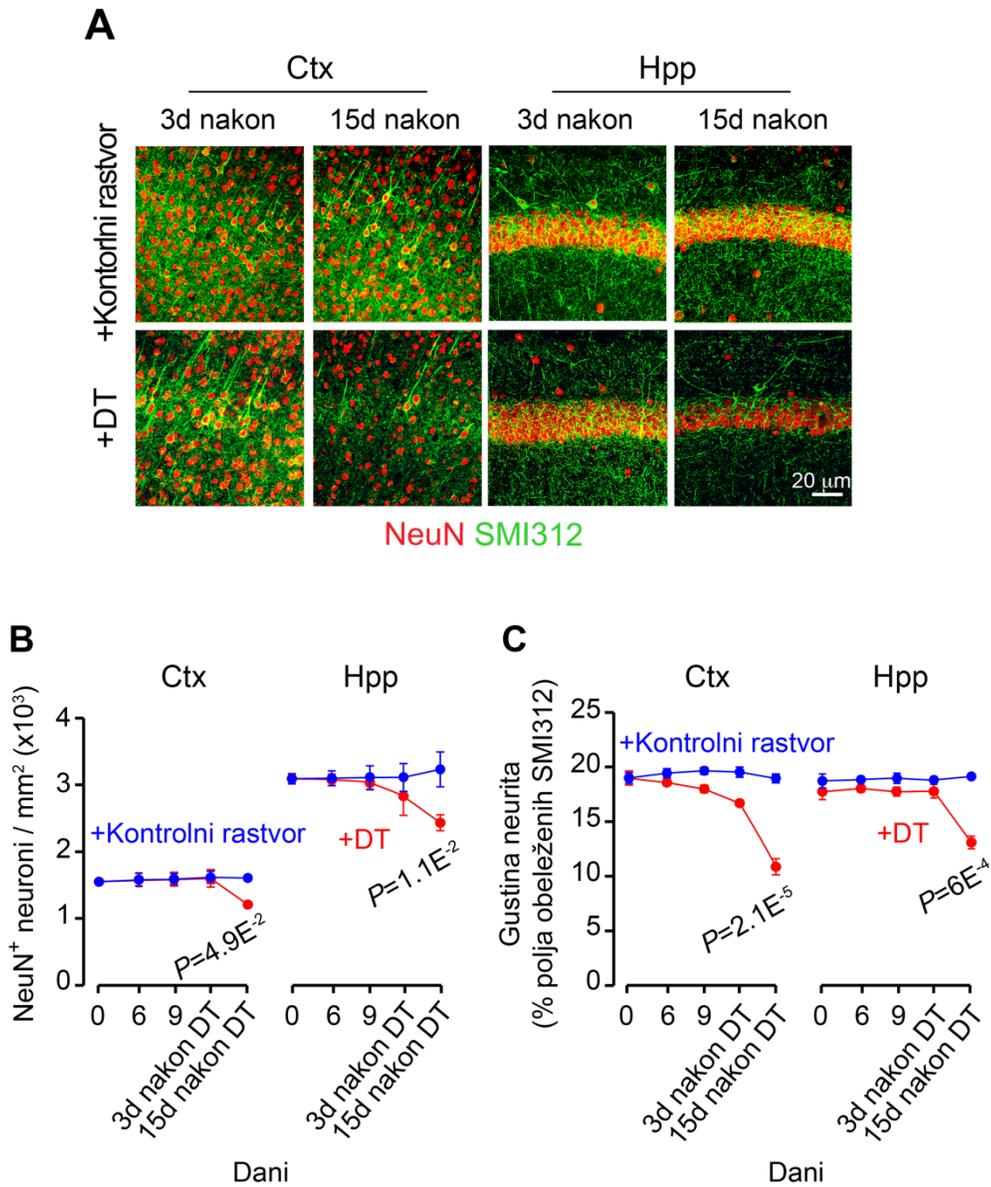


**Slika 24. Prekrivenost pericitima krvno-moždane barijere kod Pericit-Cre miševa.** (A) Reprezentativne mikrografije i (B) kvantifikacija prekrivenosti kapilara (obeleženih lektinom, plavo) pericitima (obeleženih markerom CD13, zeleno) u korteksu (Ctx) i hipokampusu (Hpp) Pericit-Cre miševa tretiranih toksinom difterije (eng. *diphtheria toxin*, DT) ili kontrolnim rastvorom. Prekrivenost pericitima je određena u tačkama pre tretmana (0), kao i 3, 6, 9 dana nakon tamoksifena, i 3 i 15 dana nakon DT ili tretmana kontrolnim rastvorom. Rezultati suprikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija za svaku grupu.  $n=4$  životinje po grupi. Statistička značajnost je prikazana kao tačna p vrednost. Skala = 20  $\mu$ m.

#### 4.1.2.1. Akutni gubitak pericita dovodi do gubitka neurita i smrti neurona

Imajući u vidu da su periciti metabolički aktivne ćelije i da sekretuju mnoge trofičke faktore, nedostatak pericita može direktno uticati na zdravlje mnogih drugih ćelija moždanog tkiva. Stoga je dalje urađena imunohistohemijska analiza sa markerima neurona, NeuN i SMI-312, da bi se proverio morfološki integritet i ukupan broj neurona i njihovih nastavaka (Slika 25A). Kvantifikacija imunohistohemijskih signala je pokazala da Pericit-Cre miševi, 15 dana nakon završetka primene DT, imaju značajno smanjen broj neurona za oko 30%, dok je signal SMI-pozitivno obeleženih neurita bio smanjen za oko 40% u korteksu i

hipokampusu u odnosu na kontrolne životinje. Međutim, 3 dana nakon DT doziranja, integritet i broj neurona su bili još uvek nepromenjeni (Slika 25B, C).

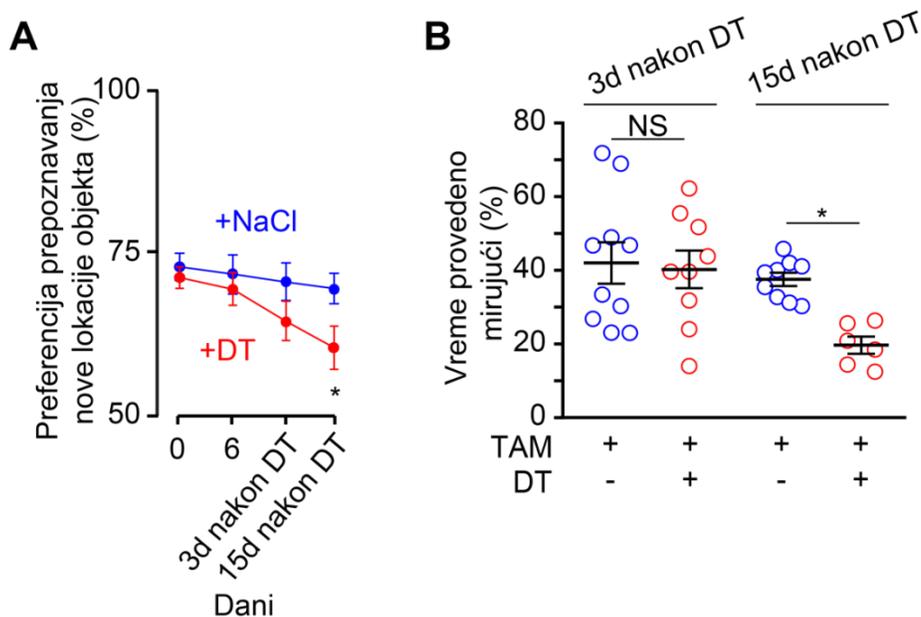


**Slika 25. *Pdgfr $\beta$ -Flp*;*Cspg4-FSF-CreER* (tzv. Periciti-Cre) miševi pokazuju deficite u broju neurona i neurita.** (A) Reprerzentativne mikrografije korteksa i hipokamusa nakon imunohistohemijskog obeležavanja sa NeuN (crveno) i SMI312 (zeleno), (B) kvantifikacija NeuN-pozitivnih ćelija i (C) kvantifikacija SMI312-pozitivnih neurita u korteksu (Ctx) i hipokampusu (Hpp) kod *Pdgfr $\beta$ -Flp*;*Cspg4-FSF-CreER* miševa tretiranih toksinom difterije (eng. *diphtheria toxin*, DT) ili kontrolnim rastvorom. Broj neurona i neurita je kvantifikovan u tačkama pre tretmana (0), kao i 3, 6, 9, dana nakon tamoksifena, i 3 i 15 dana nakon DT ili

tretmana kontrolnim rastvorom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija za svaku grupu.  $n=4-6$  životinja po grupi. Statistička značajnost je označena kao tačna p vrednosti. Skala = 20  $\mu$ m.

#### 4.1.2.2. Akutni gubitak pericita dovodi do deficita u pamćenju

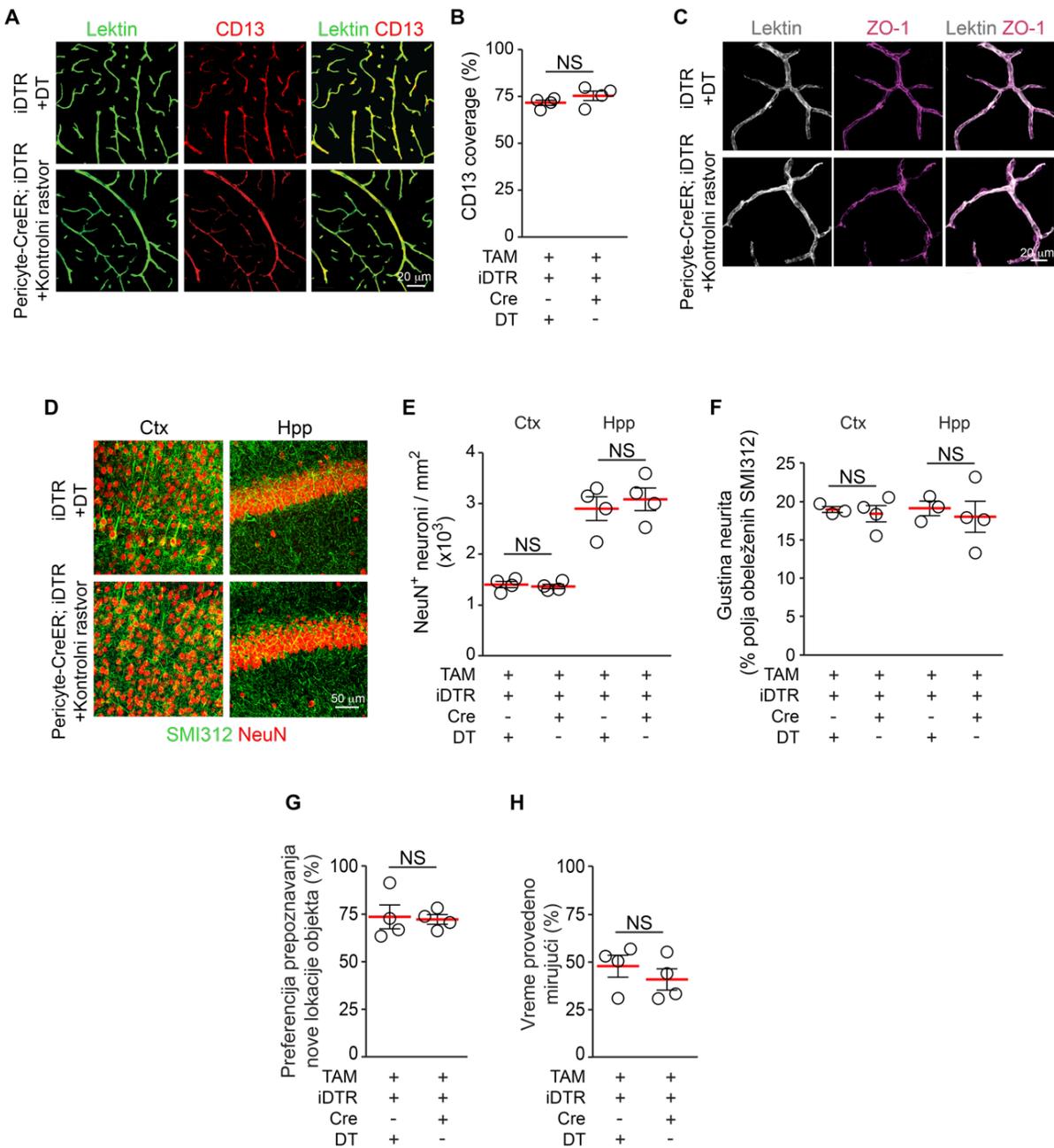
Nakon tretmana sa DT ili kontrolnim rastvorom, Pericit-Cre životinje su ispitivane u testovima ponašanja: prepoznavanje nove lokacije objekta (**Slika 26A**) i kontekstualno uslovljavanje straha (**Slika 26B**). Praćene su dve vremenske tačke: 3 i 15 dana nakon tretmana sa DT ili kontrolnim rastvorom. Rezultati su pokazali da životinje tretirane sa DT pokazuju deficite u pamćenju u oba testa 15 dana nakon tretmana (pad od 20% u testu prepoznavanja nove lokacije objekta i 50% u uslovljavanju straha), dok 3 dana nakon tretmana sa DT životinje ne pokazuju statistički značajne deficite u odnosu na kontrolne životinje bez DT tretmana. Svi ovi rezultati zajedno ukazuju da prisustvo pericita može u značajnoj meri uticati na integritet nervnih ćelija i da nedostatak pericita može dovesti do pada sposobnosti pamćenja.



**Slika 26. *Pdgfr $\beta$ -Flp;Cspg4-FSF-CreER* (tzv. Periciti-Cre) miševi pokazuju deficite u testovima ponašanja: prepoznavanje novog objekta i uslovljavanje straha. (A) Vreme provedeno ispitujući novi objekat i (B) vreme provedeno mirujući u testu**

kontekstualnoguslovljavanja straha kod *Pdgfr $\beta$ -Flp;Cspg4-FSF-CreER* miševa tretiranih toksinom difterije (eng. *diphtheria toxin*, DT) ili kontrolnim rastvorom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija za svaku grupu.  $n=6-10$  životinja po grupi. \*  $p < 0,05$  ili NS - nema značajnosti (eng. *non significant*).

Da bi se dodatno potvrdili specifični efekti DT, uključena je još jedna kontrolna grupa životinja: iDTR miševi tretirani sa TAM i DT. Rezultati su pokazali da životinje u nedostatku Cre rekombinaze ne eksprimiraju DT receptor i time nemaju gubitak pericita (**Slika 27A, B**), ne pokazuju promene u čvrstim vezama endotela (**Slika 27C**), neuronima (**Slika 27D-F**) i ponašanju (**Slika 27G, H**).



**Slika 27.** *Pdgfrβ-Flp;Cspg4-FSF-CreER* (tzv. Periciti-Cre) miševi tretirani kontrolnim rastvorom i *iDTR* miševi tretirani sa DT ne pokazuju razlike u prekrivenosti pericitima, neuronalnom broju i ponašanju. (A) Reprerentativne mikrografije i (B) kvantifikacija prekrivenosti endotelnih ćelija (obeleženih lektinom, zeleno) pericitima (obeleženih markerom CD13, crveno) kod Periciti-Cre i *iDTR* miševa. (C) Dvojno bojenje lektinom (sivo) i markerom veza između endotelnih ćelija (eng. *tight junction*) ZO1, ljubičasto. (D) Reprerentativne mikrografije preseka nakon imunohistohemijskog obeležavanja sa NeuN (crveno) i SMI312 (zeleno), (E) kvantifikacija NeuN-pozitivnih ćelija i (F) kvantifikacija

SMI312-pozitivnih neurita u korteksu (Ctx) i hipokampusu (Hpp) kod Pericit-Cre i iDTR miševa. (G) Vreme provedeno u ispitivanju novog objekta i (H) vreme provedeno u mirovanju, u testu kontekstualnog uslovljavanja strahom kod Pericit-Cre i iDTR miševa. Rezultati suprikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija za svaku grupu.  $n=4$  životinja po grupi. Statistička značajnost je označena sa NS - nema značajnosti (eng. *non significant*). Skala = 20  $\mu\text{m}$  (A i C) i 50  $\mu\text{m}$  (D). Preuzeto i modifikovano iz Nikolakopoulou i saradnici, 2019 (Nicolakopoulou et al., 2019).

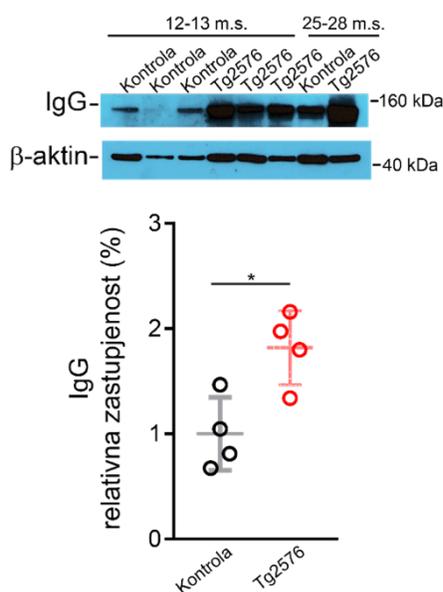
## **4.2. Narušenost strukturnog integriteta krvno-moždane barijere u različitim modelima Alchajmerove bolesti**

U prethodnom odeljku su opisani rezultati dobijeni ispitivanjem uloge pericita u ponašanju životinja, kako u senzomotorim testovima tako i u testovima pamćenja, ali u odsustvu patologije Alchajmerove bolesti. U daljim eksperimentima je analizirana KMB i ponašanje kod životinja sa AB patologijom korišćenjem nekoliko transgenih mišijih modela AB.

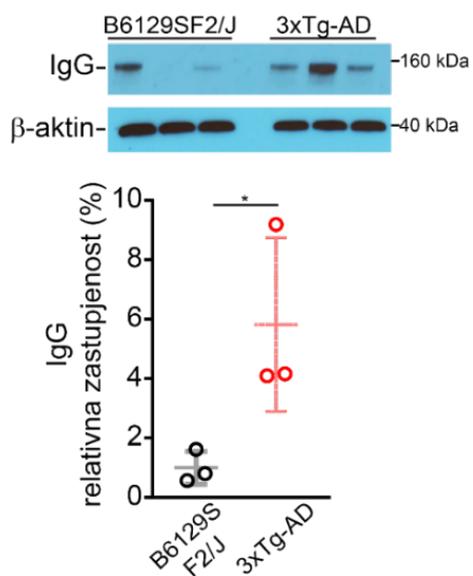
Pored analize stepena prekrivenosti krvnih kapilara pericitima upotrebom imunohistohemijskog obeležavanja markerima pericita i krvnih sudova, prisustvo molekula imunoglobulina tipa G (IgG) iz krvi u parenhimu mozga takođe može biti upotrebljeno kao jedan od indikatora strukturne poremećenosti krvno-moždane barijere. Kada se životinje perfunduju hladnim rastvorom PBS-a, iz krvnih sudova se ispraju molekuli koji se nalaze u krvi. U slučaju neoštećene krvno-moždane barijere, molekuli IgG-a se takođe ispiraju, međutim, u slučajevima otvorenosti krvno-moždane barijere, molekuli koji su poreklom iz krvi, poput IgG-a, se mogu naći u moždanom parenhimu. U ovoj studiji je stoga dalje ispitivan integritet KMB u različitim modelima AB analizom prisustva IgG molekula u parenhimu mozga.

#### 4.2.1. Tg2576 i 3xTg-AD modeli

Od modela AB koji sadrže i amiloidne plake i neurofibrilarnu klubad korišćeni su Tg2576 i 3xTg-AD miševi. Za prvi od modela, Tg2576 miševi, Western blot analiza je pokazala da je nivo IgG u perfundovanom tkivu korteksa ovih životinja značajno viši (za oko 2 puta) u poređenju sa ne-transgenim kontrolnim životinjama iz istog okota (Slika 28). Slično Tg2576 miševima, analiza 3xTg-AD miševa je takođe pokazala više nivoe IgG u moždanom tkivu. Kod ovih transgenih životinja nivo IgG je povećan za skoro 6 puta u odnosu na odgovarajuće kontrolne životinje (Slika 29). Ovi rezultati su ukazali na narušen integritet krvno-moždane barijere u oba ispitivana modela sa amiloidnom patologijom.



**Slika 28. Integritet krvno-moždane barijere je narušen kod Tg2576 miševa.** Gornji panel: reprezentativni blotovi Westren blot analize relativne zastupljenosti IgG u moždanom tkivu korteksa Tg2576 transgenih i C57B6 kontrolnih životinja 12-13 i 25-28 meseci starosti (m.s.). Donji panel: kvantifikacija količine IgG u odnosu na endogenu kontrolu ( $\beta$ -aktin). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija za svaku grupu. Poređene su transgene životinje sa ne-transgenim kontrolama iz istog okota,  $n=4$  životinja po grupi. \*  $p < 0,05$ .



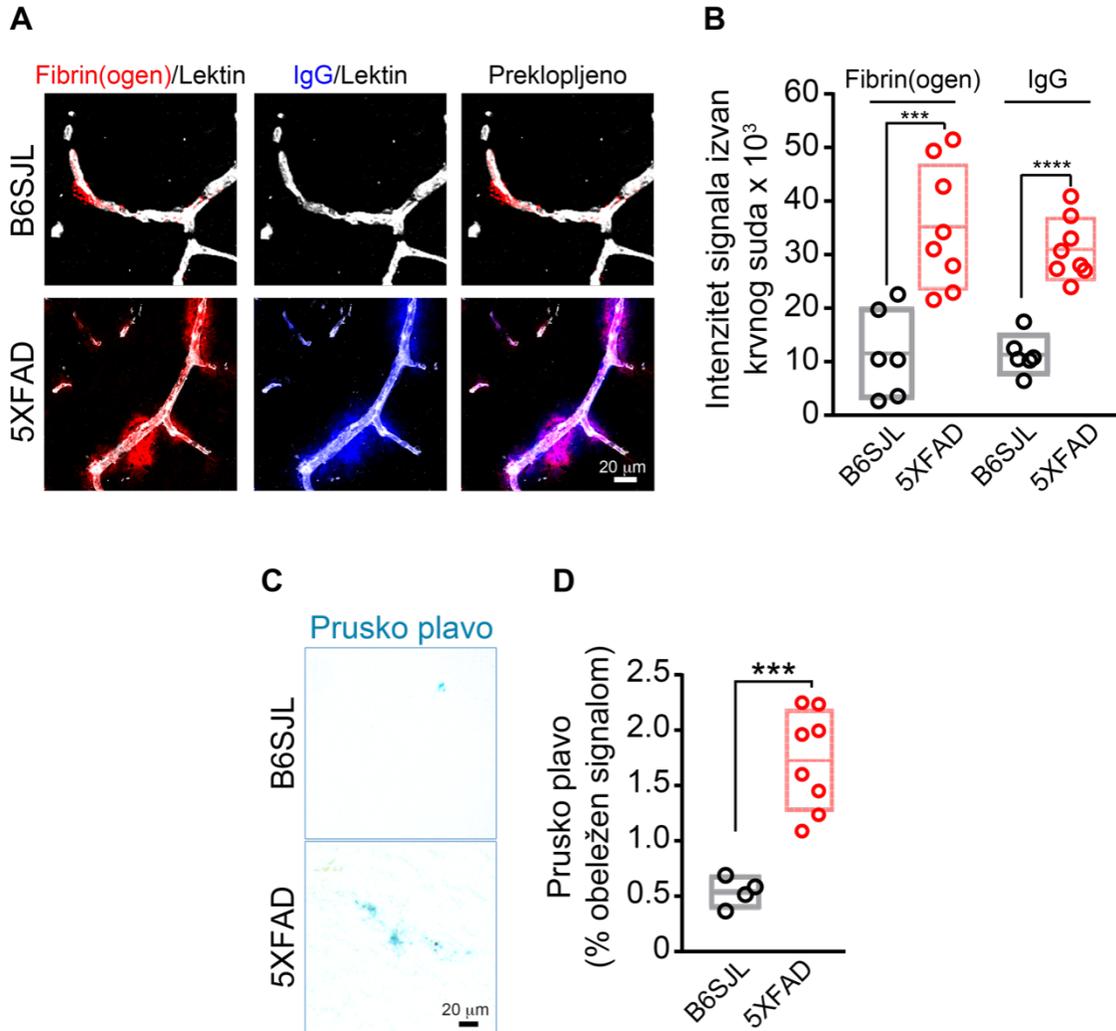
**Slika 29. Integritet krvno-moždane barijere je narušen kod 3xTg-AD miševa.** Gornji panel: reprezentativni blotovi Westren blot analize relativne zastupljenosti IgG u moždanom tkivu korteksa 3xTg-AD transgenih i B6129SF2/J kontrolnih životinja, 18-20 m. s. Donji panel: kvantifikacija količine IgG u odnosu na endogenu kontrolu ( $\beta$ -aktin). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija za svaku grupu.  $n=3$  životinja po grupi. \*  $p < 0,05$ .

#### 4.2.2. 5XFAD model

Dalje je ispitivan integritet krvno-moždane barijere u 5XFAD modelu Alchajmerove bolesti, koga za razliku od prethodnih modela karakteriše veoma rana akumulacija  $A\beta$  ali bez formiranja neurofibrilanih klubadi. Taloženje  $A\beta$  u ovom modelu započinje unutar neurona već kod životinja starih 1,5 mesec, dok se pojava vanćelijskih plaka može detektovati kod životinja počevši od starosti od dva meseca. Preseci transgenih 5XFAD miševa i njihovih ne-transgenih kontrola su najpre imunohistohemijski analizirani obeležavanjem na fibrinogen i IgG, proteine poreklom iz krvi, kao i bojenjem sa lektinom (**Slika 30A**). Količina ekstravaskularnog fibrinogena i IgG-a, ukazuje na narušenost krvno-moždane barijere. Kvantifikacija trojnog imunohistohemijskog bojenja je pokazala da je količina ekstravaskularnog fibrinogena i IgG molekula značajno veća kod 5XFAD miševa starih 7 meseci (oko 3 puta), u poređenju sa njihovim ne-transgenim kontrolnim životinjama iz istog okota i iste starosti (**Slika 30B**).

Mikro krvarenja i depoziti gvožđa su takođe jedan od pokazatelja narušene krvno-moždane barijere koji nastaju taloženjem gvožđa iz krvi u moždani parenhim. Rezultati kvantifikacije histološkog bojenja Prusko plavim su pokazali da korteks 5XFAD miševa

sadrži drastično veću, skoro 4 puta, količinu depozita gvožđa u odnosu na odgovarajuće kontrolne životinje stare 7 meseci (**Slika 30C, D**).



**Slika 30. Integritet krvno-moždane barijere je narušen kod 5XFAD miševa.** (A) Reprezentativne mikrografije korteksa i (B) kvantifikacija ekstravaskularnog fibrinogena i IgG kod 5XFAD i kontrolnih B6SJL životinja starosti 7 meseci. (C) Reprezentativne mikrografije i (D) kvantifikacija depozita gvožđa izvan krvnih sudova kod 5XFAD i B6SJL životinja starosti 7 meseci. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija za svaku grupu.  $n=4-12$  životinja po grupi. NS - nema značajnosti (eng. *non significant*); \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ . Skala = 20  $\mu\text{m}$ .



**Slika 31. 5XFAD miševе karakterišu deficiti u moždanom protoku krvi i testovima ponašanja.** (A) Moždani protok krvi, (B) iskopavanje peleta, (C) pravljenje gnezda, (D) zakopavanje klikera, (E) prepoznavanje novog objekta i (F) uslovljavanje straha kod 5XFAD miševa 7 meseci starosti. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija za svaku grupu.  $n=4-12$  životinja po grupi. NS - nema značajnosti (eng. *non significant*), \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

### 4.3.Uloga PICALM proteina u endotelnim ćelijama krvno-moždane barijere i neuronima

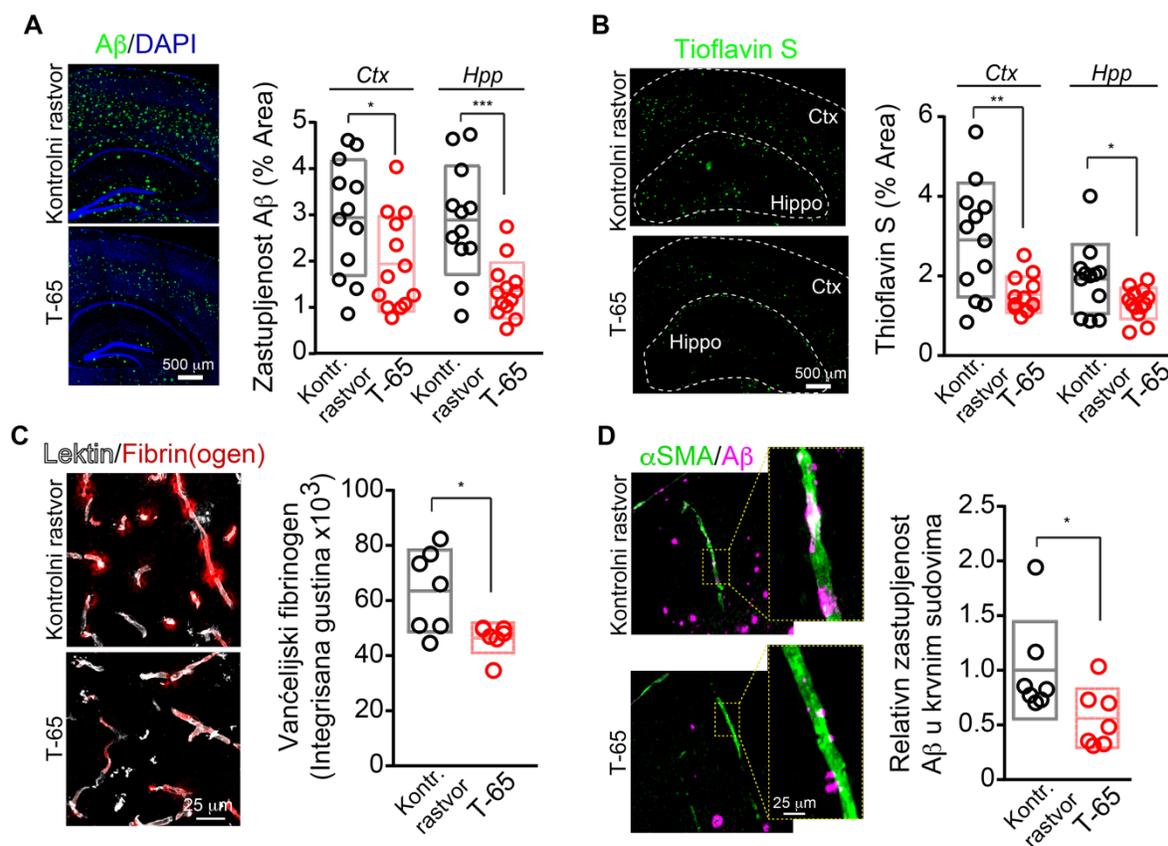
Pored strukturnog integriteta krvno-moždane barijere, važna je i njena funkcionalna uloga u održavanju homeostaze mozga, kako sprečavanjem ulaska molekula iz krvi u mozak, tako i eliminacijom nepoželjnih molekula iz mozga u krv i dalje izvan tela. Poznato je da je ova funkcija KMB posredovana različitim proteinima i receptorima. Među njima, protein PICALM, koji je u mozgu najviše eksprimiran u endotelnim ćelijama, a zatim u mikroglijii i neuronima, ima posebno važnu ulogu u uklanjanju A $\beta$  iz mozga u krv preko krvno-moždane barijere (Zhao et al., 2015b).

#### 4.3.1. Povećana ekspresija PICALM proteina nakon tretiranja supstancom T-65

Da bi se dodatno ispitala uloga PICALM proteina i testirala hipoteza da povećana ekspresija PICALM proteina može drastično povećati eliminaciju A $\beta$  u modelu Alchajmerove bolesti, upotrebljeni su *Picalm*<sup>+/-</sup>;5XFAD miševi koji sadrže jednu kopiju *Picalm*-a u svim ćelijama. Jedna grupa *Picalm*<sup>+/-</sup>;5XFAD životinja je tretirana supstancom T-65 za koju je, pri *screening*-u od oko 2000 različitih supstanci odobrenih od FDA (eng. *food and drug administration*), pokazano da povećava ekspresiju PICALM-a u endotelnim ćelijama, kao i da prolazi KMB. Druga grupa *Picalm*<sup>+/-</sup>;5XFAD životinja je tretirana fiziološkim rastvorom.

Tretman supstancom T-65 ili kontrolnim rastvorom je započet kad su *Picalm*<sup>+/-</sup>;5XFAD životinje bile starosti 2 meseca. Tretman je trajao ukupno 3 meseca, nakon čega su životinje žrtvovane i urađena je analiza tkiva mozga.

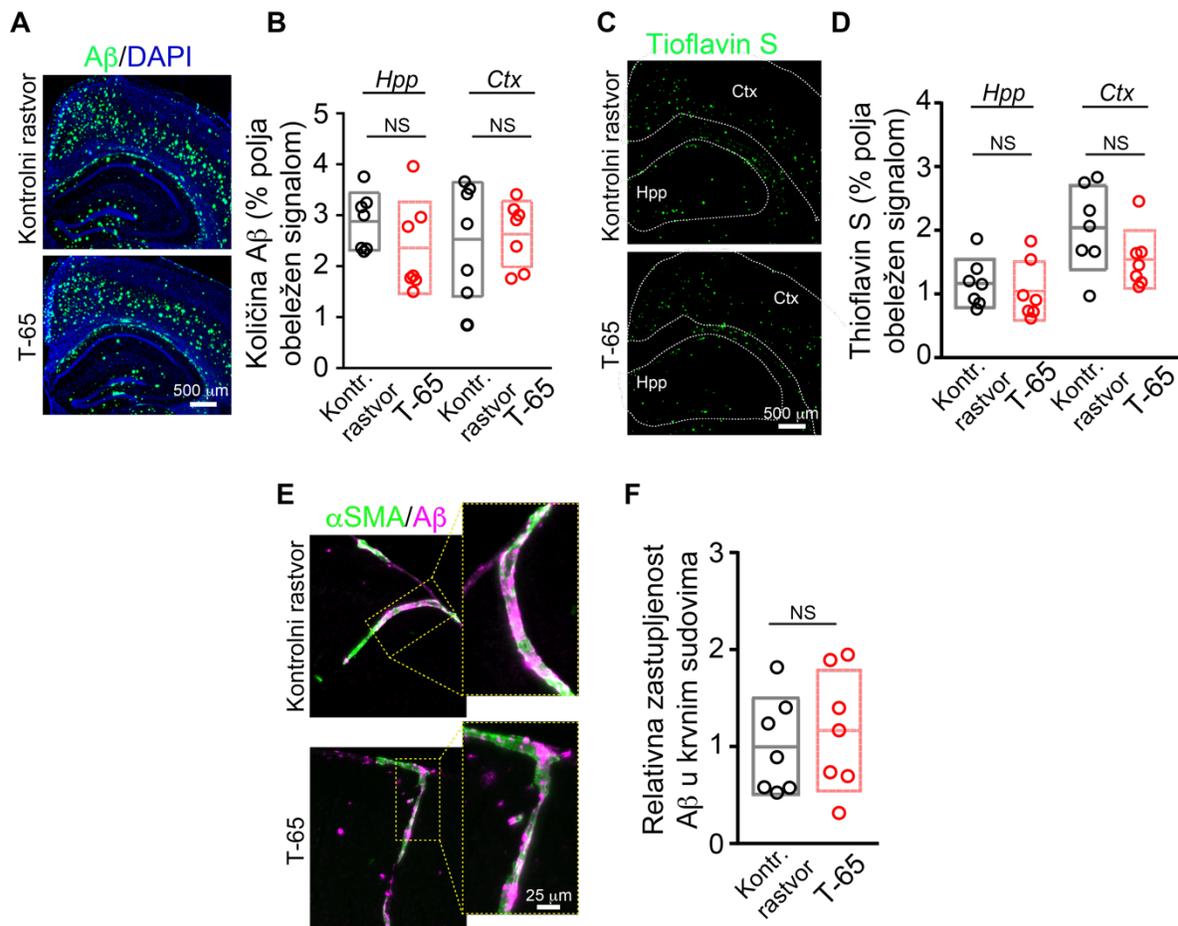
Dobijeni rezultati su pokazali da je nivo A $\beta$  u korteksu i hipokampusu *Picalm*<sup>+/-</sup> 5XFAD životinja značajno smanjen nakon tretmana supstancom T-65, za oko 30-40% u odnosu na kontrolne životinje (**Slika 32A**). Dodatno, bojenje histološkom bojom Tioflavin S je pokazalo da je i količina amiloidnih plaka značajno smanjena, za oko 30%, nakon tretmana supstancom T-65, (**Slika 32B**). Supstanca T-65, ne samo da je umanjila količinu amiloida u parenhimu moždanog tkiva, već je smanjila i narušenost integriteta krvno-moždane barijere, što se ogledalo u smanjenoj količini ekstravaskularnog fibrinogena za 23% (**Slika 32C**). Značajno je bila smanjena i količina amiloida u krvnim sudovima, poznata kao cerebralna amiloidna angiopatija (eng. *cerebral amyloid angiopathy, CAA*), za 40% (**Slika 32D**).



**Slika 32. Tretman supstancom T-65 povećava ekspresiju PICALM-a u endotelnim ćelijama krvno-moždane barijere i povećava eliminaciju A $\beta$  iz mozga. Reprezentativne mikrofotografije i kvantifikacija (A) A $\beta$ , (B) tioflavina, (C) ekstravaskularnog fibrinogena i (D)**

akumulacije A $\beta$  u glatkim mišićnim ćelijama imunohistochemijski obeleženim sa  $\alpha$ SMA u korteksu (*Ctx*) i hipokampusu (*Hpp*) *Picalm*<sup>+/-</sup>; 5XFAD životinja starih 5 meseci koje su tretirane supstancom T-65 ili kontrolnim rastvorom tokom 2 meseca. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija za svaku grupu. *n*=7-12 životinja po grupi. \* *p* < 0,05, \*\* *p* < 0,01, \*\*\* *p* < 0,001. Skala = 500  $\mu$ m (**A** i **B**) i 25  $\mu$ m (**C** i **D**).

Dodatni dokaz da supstanca T-65 specifično povećava ekspresiju PICALM proteina u endotelnim ćelijama je dobijen eksperimentima na miševima (*Picalm*<sup>lox/lox</sup>; *Cadh-Cre*; 5XFAD) koji ekspimiraju PICALM protein u svim, osim u endotelnim ćelijama. *Picalm*<sup>lox/lox</sup>; *Cadh-Cre*; 5XFAD miševi su tretirani supstancom T-65 ili kontrolnim rastvorom tokom 3 meseca počevši od 2 meseca starosti životinja. Nivoi A $\beta$  i amiloidnih plaka u korteksu i hipokampusu se nisu promenili nakon tretmana, kao što je očekivano (**Slika 33A-D**). Takođe, ni nivoi A $\beta$  u krvnim sudovima nisu bili promenjeni nakon tretmana supstancom T-65 (**Slika 33E, F**), ukazujući da je prisustvo endotelnog PICALM proteina neophodno za efekte T-65.



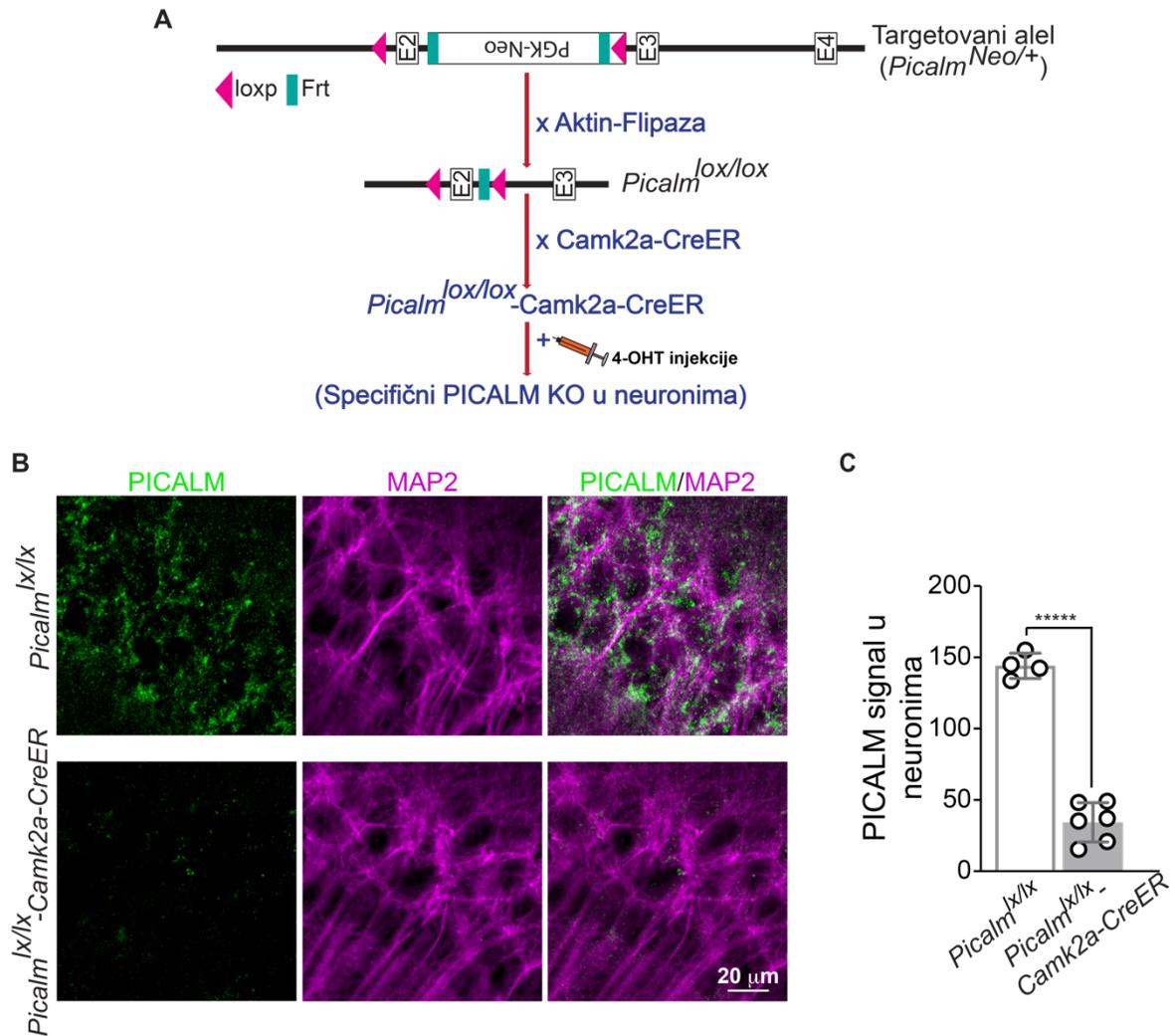
**Slika 33. Tretman supstancom T-65 životinja kojima nedostaje PICALM u endotelnim ćelijama krvno-moždane barijere ne pospešuje eliminaciju Aβ iz mozga.** Reprezentativne mikrofografije i kvantifikacija (A-B) Aβ, (C-D) tioflavina i (E-F) akumulacije Aβ u glatkim mišićnim ćelijama imunohistonemijski obeleženim sa αSMA u korteksu (*Ctx*) i hipokampusu (*Hpp*) *Picalm<sup>lox/lox</sup>; Cadh-Cre; 5XFAD* životinja starih 5 meseci koje su tretirane supstancom T-65 ili kontrolnim rastvorom tokom 2 meseca. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija za svaku grupu. *n*=6 životinja po grupi. NS - nema značajnosti (eng. *non significant*). Skala = 500 μm (A i C) i 25 μm (E).

#### 4.3.2. Delecija PICALM proteina u neuronima dovodi do gubitka neurona i poremećaja u ponašanju

Sve je više podataka o pozitivnoj korelaciji između protektivne *PICALM* varijante (tzv. sa polimorfizmom u jednom nukleotidu, SNP, od eng. *single-nucleotide polymorphysm*) u humanoj populaciji i uvećane debljine korteksa koja je detektivana magnetnom rezonancom (Biffi et al., 2010; Xu et al., 2016). Iako je *PICALM* najzastupljeniji u endotelnim ćelijama mozga gde ima centralnu ulogu u uklanjanju A $\beta$  iz mozga (Zhao et al., 2015b), ovaj protein ima važnu ulogu i u klatrin-zavisnoj endocitozi (Ishikawa et al., 2015). Dosadašnja istraživanja nisu uspela da u potpunosti otkriju ulogu *PICALM* proteina specifično u neuronima i da li nedostatak neuronskog *PICALM* proteina može da doprinese do povećanja patologije.

Da bi se ispitala funkcija *PICALM*-a u neuronima, generisan je novi mišji model sa specifičnom akutnom delecijom *PICALM*-a u *CAMK2a*-pozitivnim ćelijama, od kojih većina zapravo predstavlja ekscitatorne neurone (Liu and Murray, 2012). Model sadži *Lox* elemente oko egzona 2 *Picalm* gena (*Picalm*<sup>lox/lox</sup>). Nakon ukrštanja *Picalm*<sup>lox/lox</sup> miševa sa *Camk2a-CreER* sojem, *Picalm* gen je dostupan za isecanje *Lox-Cre* sistemom indukcijom *Cre* i vezivanjem tamoksifena za estrogenski receptor što omogućava prenos *Cre* rekombinaze u jedro (detaljnije u Odeljku 3.5.) (Slika 34A).

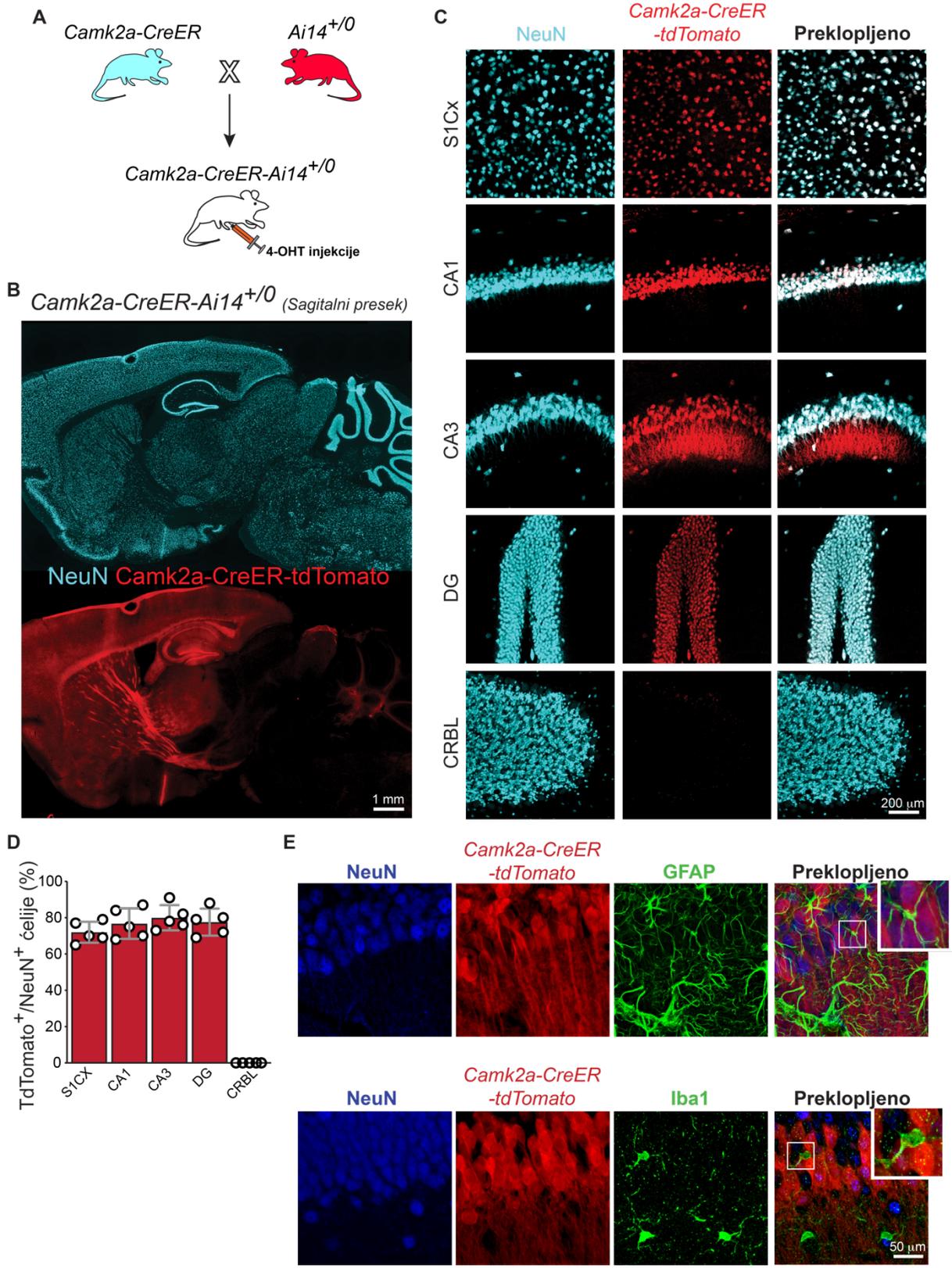
Rezultati imunohistohemijske analize su pokazali da ovako generisan mišji model, *Picalm*<sup>lox/lox</sup>-*Camk2a-CreER*, nema ekspresiju *PICALM*-a u neuronima nakon tretmana tamoksifenom, što je pokazano dvojnim imunohistohemijskim obeležavanjem *PICALM*-a sa neuronalnim markerom, MAP2 (Slika 34B, C).



**Slika 34. Strategija kreiranja soja miša kome nedostaje PICALM (PICALM KO, eng. *knock-out*) u neuronima i karakterizacija soja. (A) Strategija ukrštanja miševa. (B) Reprezentativne mikrofografije i (C) kvantifikacija signala koji potiče od PICALM proteina (zeleno) u MAP2-pozitivnim neuronima (ljubičasto) u hipokampusu *Picalm*<sup>lox/lox</sup>; *Camk2a-Cre-ER* transgenih životinja i *Picalm*<sup>lox/lox</sup> kontrolnih životinja 4 nedelje nakon indukcije tamoksifenom. Rezultati suprikazani kao srednja vrednost ± standardna greška za svaku grupu.  $n=6$  životinja po grupi. \*\*\*\*  $p < 10^{-5}$ . Skala = 20 μm.**

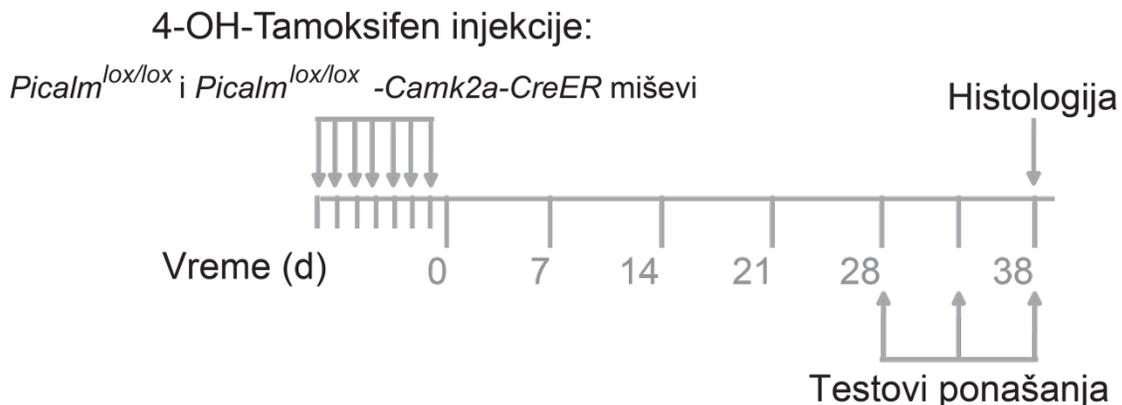
Radi dodatne karakterizacije *Camk2a-CreER* modela i provere specifične ekspresije Cre rekombinaze u neuronima, *Camk2a-CreER* mišji model je ukršten sa mišjim modelom koji nosi *Ail4*<sup>+0</sup> genetički element (**Slika 35A**). U tako nastalom *Camk2a-CreER-Ail4*<sup>+0</sup> modelu, nakon tretmana tamoksifenom, aktivirana je ekspresija *Ail4*<sup>+0</sup>, što bi trebalo da dovede do produkcije TdTomato reportera samo u ćelijama koje nose promotor vezan za Cre rekombinazu, u ovom slučaju *Camk2a*. Ćelije koje nose Cre bi stoga trebalo da budu obeležene crvenom bojom, jer je talasna dužina emisije TdTomato proteina 581 nm. Radi provere specifičnog obeležavanja TdTomato u neuronima (i indirektno provere specifične ekspresije Cre rekombinaze u neuronima), urađena je imunohistohemijska analiza sagitalnih preseka obeleženih sa TdTomato i NeuN markerom neurona, na konfokalnim mikrogramima upotrebom malog (**Slika 35B**) i velikog uveličanja (**Slika 35C**). Analiza je pokazala da su skoro svi NeuN-pozitivni neuroni takođe obeleženi sa TdTomato reporterskim molekulom (između 70%-80%, **Slika 35D**) i to u svim strukturama osim u malom mozgu (**Slika 35B-D**), što je u skladu sa podacima koji su prijavljeni u literaturi za ovaj soj.

Nakon trojnog obeležavanja sa TdTomatom, NeuN-om i markerima glijskih ćelija (GFAP-om kao markerom astrocita i Iba1, markerom mikroglije), pokazano je da je TdTomato specifično eksprimiran u neuronima, a ne u astrocitima ili mikrogliji (**Slika 3E**), obezbeđujući ovom modelu potencijal za ispitivanje uloge PICALM-a u neuronima.



**Slika 35. Karakterizacija *Camk2a-Cre-ER* miševa nedelju dana nakon indukcije tamoksifenom.** (A) Strategija parenja. (B i C) Reprerzentativne mikrografije i (D) kvantifikacija kolokalizacije *Camk2a-Cre-ER-tdTomato* (crveno) i NeuN (plavo) u somatosenzornom korteksu (*S1Ctx*), regionima hipokampusa: cornus ammonis 1 (*CA1*), cornus ammonis 3 (*CA3*) i dentatnom girusu (*DG*) i malom mozgu (*Crbl*) *Camk2a-Cre-ER-Ai14<sup>+0</sup>* transgenih životinja. (E) *Camk2a-Cre-ER-tdTomato* nije eksprimiran u mikrogliji ili astrocitima. Rezultati suprikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška za svaki region mozga.  $n=4$  životinja. Skala = 1 mm (B), 200  $\mu$ m (C) i 50  $\mu$ m (E).

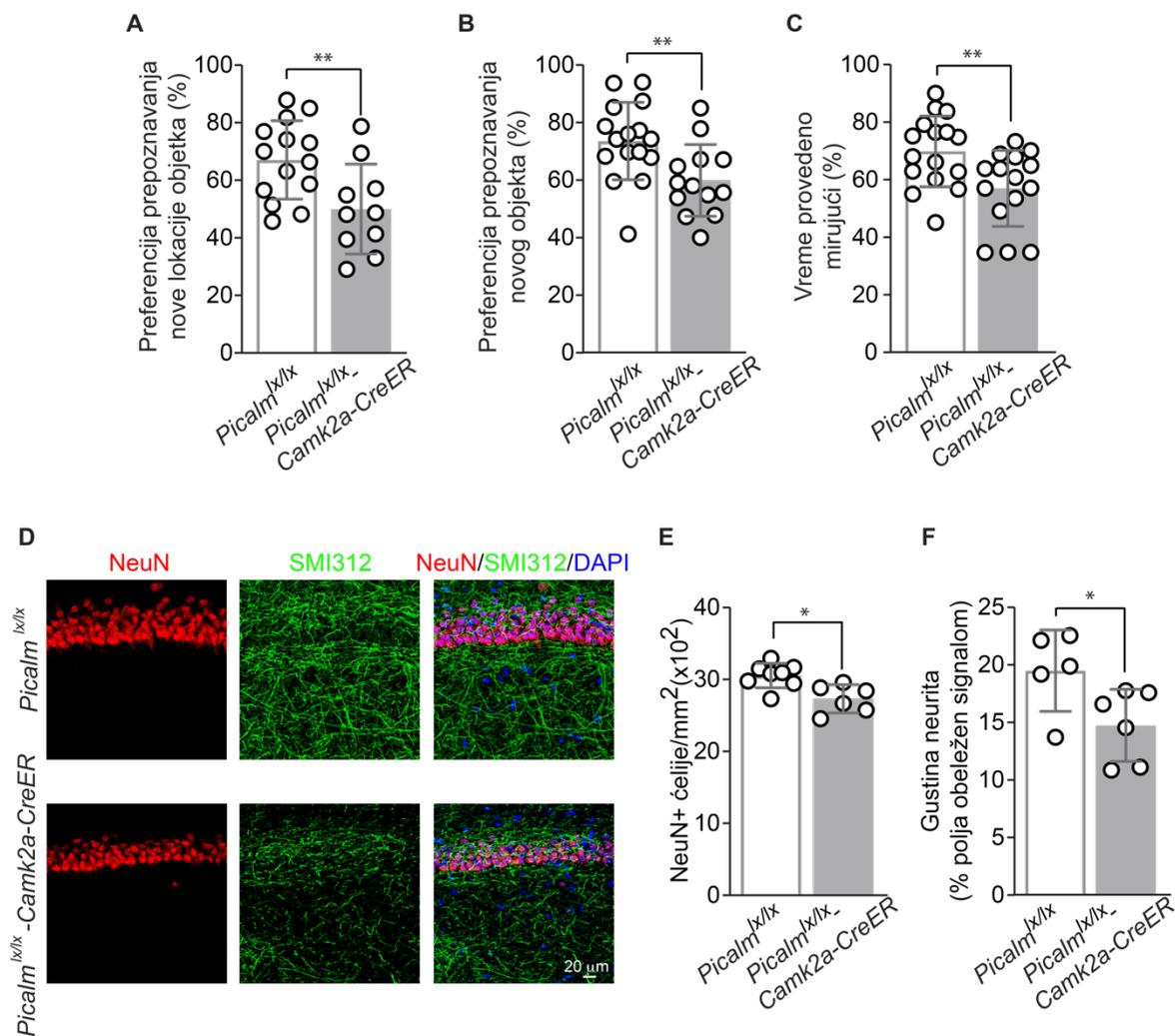
Da bi se još detaljnije proučili efekti gubitka PICALM-a u neuronima, urađen je još jedan eksperiment u kome su *Picalm<sup>lox/lox</sup>-Camk2a-CreER* miševi tretirani tamoksifenom da bi se obezbedila delecija PICALM-a iz *Camk2a*-pozitivnih neurona (Slika 36). S obzirom da se tamoksifen, kao i njegov potentniji derivat, 4-OHT, uobičajeno koriste kao tretman tumora dojke i da mogu indukovati povišenu gensku ekspresiju gena koji nisu relevantni u ovome istraživanju (Alshabi et al., 2019), odlučeno je da se i eksperimentalne životinje, *Picalm<sup>lox/lox</sup>-Camk2a-CreER*, i kontrolne životinje, *Picalm<sup>lox/lox</sup>*, tretiraju tamoksifenom, kako bi se normalizovali potencijalni sporedni efekti na gensku ekspresiju. Tretman obe grupe životinja je trajao sedam dana i miševi su svakodnevno injecirani istom dozom 4-OHT (40 mg/kg). Nakon četiri nedelje, ispitan je efekat na ponašanje životinja, nakon čega su životinje žrtvovane i moždano tkivo je izolovano za histološke analize (Slika 36).



**Slika 36. Eksperimentalni dizajn tretmana *Picalm*<sup>lox/lox</sup>-*Camk2a-CreER* i kontrolne *Picalm*<sup>lox/lox</sup> životinje tamoksifenom.** Životinje starosti 6-12 meseci su tretirane sa 4-OHT tokom 7 dana i nakon mesec dana su ispitani efeketi u testovima ponašanja, nakon čega je tkivo prikupljeno za histološku analizu.

Dobijeni rezultati su pokazali da *Picalm*<sup>lox/lox</sup> - *Camk2a-CreER* životinje pokazuju deficite u memoriji zavisnoj od hipokampusa u poređenju sa kontrolnim životinjama, *Picalm*<sup>lox/lox</sup> (Slika 37A-C). *Picalm*<sup>lox/lox</sup> - *Camk2a-CreER* životinje su provele značajno manje vremena istražujući novu lokaciju objekta u testu prepoznavanja nove lokacije objekta (Slika 37A), a zatim su provele značajno manje vremena istražujući novi objekat u testu prepoznavanja novog objekta (Slika 37B). U testu kontekstualnog uslovljavanja strahom, životinje su takođe provele manje vremena u stanju mirovanja (Slika 37C).

Analize duplog imunohistohemijskog bojenja za markere neuronskih tela, NeuN, i markera nastavaka neurita, SMI312, su pokazale da gubitak PICALM proteina iz neurona, dovodi do gubitka nervnih ćelija (Slika 37D, E) kao i njihovih projekcija (Slika 37D, F) u CA1 regionu hipokampusa.



**Slika 37. Nedostatak PICALM-a dovodi do gubitka neurona i problema u ponašanju.** (A) Prepoznavanje nove lokacije objekta i (B) novog objekta kod *Picalm<sup>lox/lox</sup>; Camk2a-Cre-ER* transgenih životinja i *Picalm<sup>lox/lox</sup>* kontrolnih životinja 4 nedelje nakon indukcije tamoksifenom. (C) Uslovljavanje straha prikazan kao vreme provedeno ne pomerajući se kod *Picalm<sup>lox/lox</sup>; Camk2a-Cre-ER* transgenih životinja i *Picalm<sup>lox/lox</sup>* kontrolnih životinja 4 nedelje nakon indukcije tamoksifenom. (D) Reprezentativne mikrografije obeležene sa NeuN (crveno) i SMI312 (zeleno), (E) kvantifikacija NeuN-pozitivnih ćelija i (F) kvantifikacija SMI312-pozitivnih neurita u hipokampusu *Picalm<sup>lox/lox</sup>; Camk2a-Cre-ER* transgenih životinja i *Picalm<sup>lox/lox</sup>* kontrolnih životinja 4 nedelje nakon indukcije tamoksifenom. Rezultati suprikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška za svaku grupu.  $n=6$  životinja po grupi. \*  $p < 0,05$ . Skala = 20  $\mu$ m.

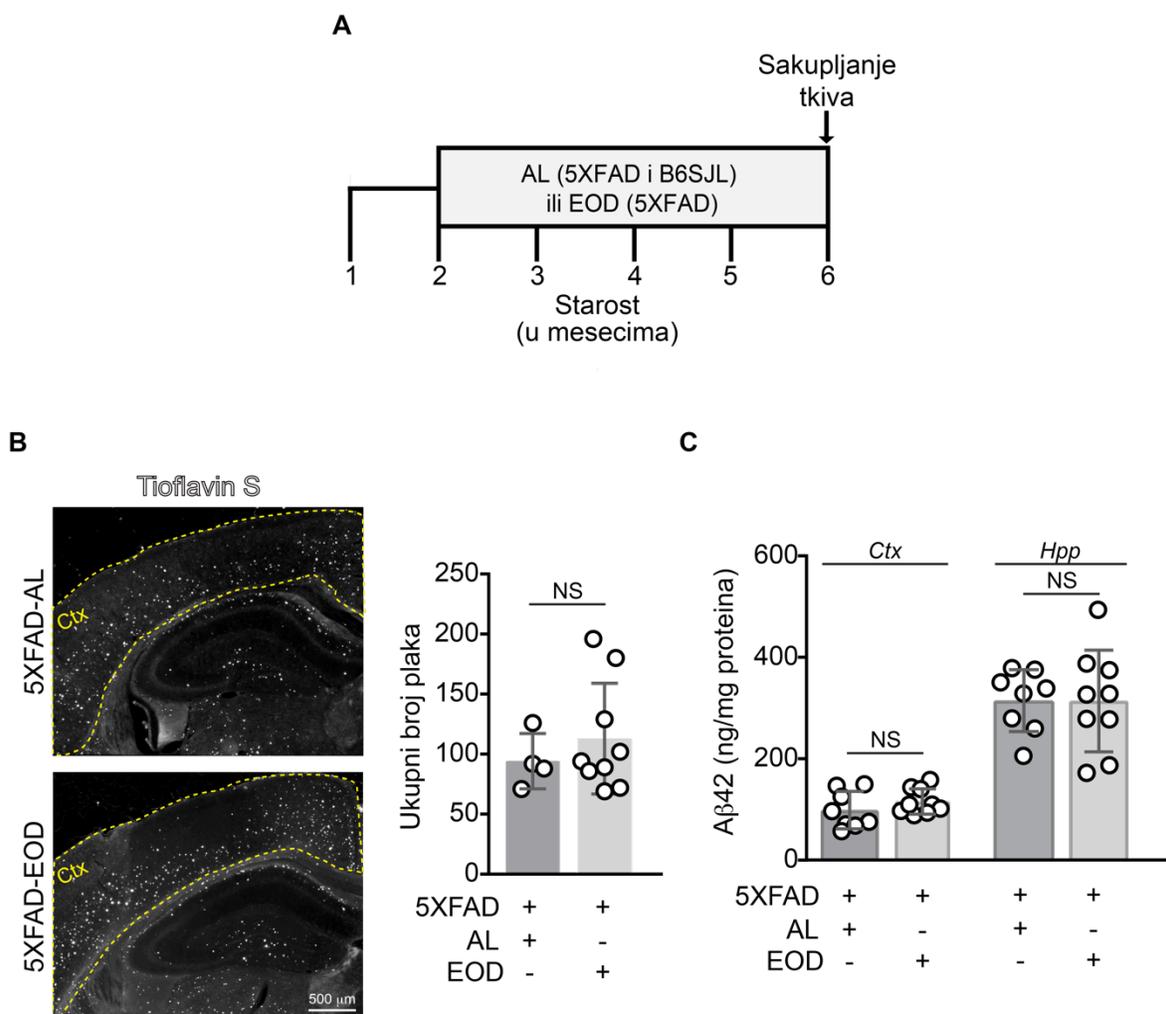
#### 4.4. Efekti restrikcije hrane na patologiju AB

Istraživanja su pokazala da dijetalna restrikcija može da produži životni vek kod kratkoživećih organizama, kao i da deluje protektivno u brojnim modelima starosno-zavisnih patologija (Fontana and Partridge, 2015; Van Cauwenberghe et al., 2016). Primena dijetalne restrikcije je takođe ispitivana u kontekstu neuroprotektivnih efekata i odlaganja neurodegenerativnih bolesti (Arumugam et al., 2010; Bruce-Keller et al., 1999; Halagappa et al., 2007; Loncarevic-Vasiljkovic et al., 2012), ali dosadašnja istraživanja nisu pokazala da li dijetalna restrikcija tipa intermitentnog gladovanja u toku 4 meseca ima uticaja na stabilnost krvno-moždane barijere, kao ni na patologiju AB u 5XFAD modelu.

Da bi se ispitalo da li dijetalna restrikcija utiče na neki od aspekata patologije Alchajmerove bolesti, ženke 5XFAD miševa su sa 2 meseca starosti podvrgnute režimu restrikcije hrane tipa ishrane svakog drugog dana (eng. *every-other-day*, EOD) u toku naredna 4 meseca. Kontrolna grupa je uključivala ženke 5XFAD miševa koje su bile iz istih okota i na regularnom režimu ishrane koji podrazumeva neograničen unos hrane (AL, lat. *ad libitum*). Da bi se uporedili efekti režima restrikcije hrane u odsustvu AD patologije, u pojedine analize su dodatno uključene ne-transgene životinje iz istih okota, B6SJL, koje su bile izložene AL ili EOD režimu ishrane. Eksperimentalni dizajn je prikazan na **Slici 38A**.

##### 4.4.1. Restrikcija hrane EOD ne menja zastupljenost A $\beta$ u korteksu i hipokampusu 5XFAD miševa

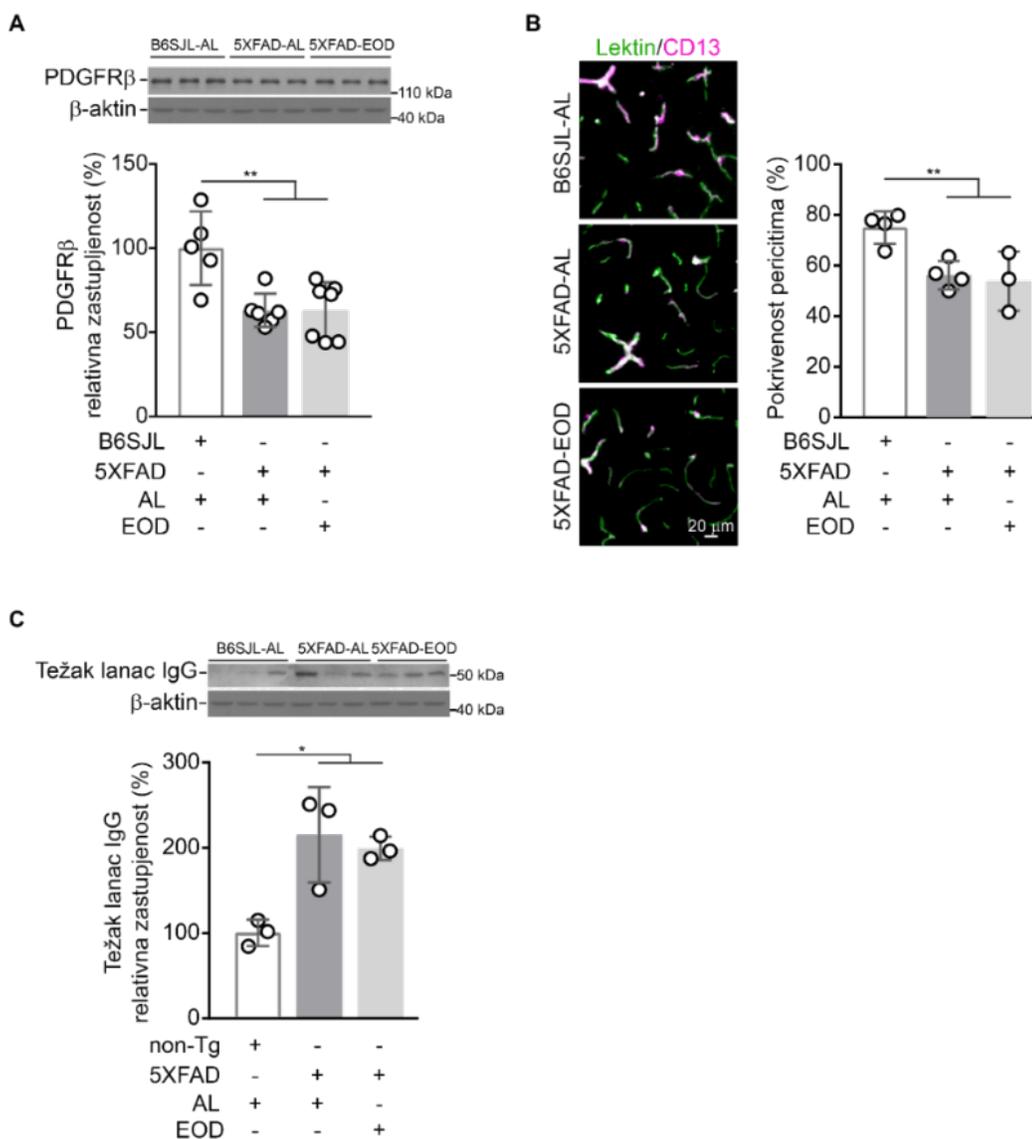
5XFAD miševе karakteriše rana i izražena amiloidna patologija, koja se najpre javlja kao unutarćelijski depoziti u neuronima već od 1,5 meseci starosti. Vanćelijski depoziti A $\beta$  se javljaju od oko 2,5 meseci starosti i sastoje pre svega od A $\beta$ 42, dok je zastupljenost A $\beta$ 40 oko 20 puta manja. Da bi se ispitala zastupljenost A $\beta$  plaka i solubilnog A $\beta$ 42 u moždanom tkivu 5XFAD miševa, kao i uticaj EOD na njihovu zastupljenost, urađeno je najpre bojenje Tioflavinom S, kao i ELISA imunoesej za merenje solubilnog A $\beta$ 42. Pokazano je da EOD ne utiče na broj akumuliranih plaka (**Slika 38B**) i količinu ukupnog A $\beta$ 42 u korteksu i hipokampusu 6 meseci starih ženki 5XFAD miševa (**Slika 38C**).



**Slika 38. Restrikcija hrane ne menja broj A $\beta$  plaka kod 5XFAD miševa.** (A) Eksperimentalni dizajn: 5XFAD miševi starosti 2 meseca su podeljeni u dve grupe, od kojih je jedna grupa tokom naredna 4 meseca imala neograničen pristup hrani (*ad libitum*- AL), dok je druga grupa dobijala hranu svaki drugi dan (eng. *every-other-day*, EOD). Tkivo je analizirano kod životinja starih 6 meseci. (B) Tioflavin-S bojenje i kvantifikacija broja plaka u korteksu i (C) analiza ukupnog A $\beta$ <sub>42</sub> u korteksu (Ctx) i hipokampusu (Hipp) kod 5XFAD životinja starih 6 meseci nakon restrikcije hrane (EOD) ili uobičajenog, *ad libitum* načina ishrane (AL). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija za svaku grupu.  $n=4-9$  životinja po grupi. NS - nema značajnosti (eng. *non significant*). Skala = 500  $\mu$ m.

#### 4.4.2. EOD nema uticaja na integritet krvno-moždane barijere kod 5XFAD miševa

Prethodni podaci su pokazali da intermitentno gladovanje kod APP/PS1 modela AB utiče na polarnost akvaporina 4 (AQP-4) (Zhang et al., 2017), proteina eksprimiranog na astrocitnim stopalima za koji se smatra da ima ulogu u transport vode na KMB (Bonomini et al., 2010), i da na taj način može da utiče na stabilnost KMB. Stoga su ispitani efekti EOD na integritet KMB kod 5XFAD miševa. Rezultati su najpre pokazali da 6 meseci stari 5XFAD miševi imaju smanjenu zastupljenost receptora PDGFR $\beta$  u ukupnom moždanom ekstraktu (**Slika 39A**), kao i smanjenu prekrivenost kapilara pericitima na moždanim presecima u odnosu na ne-transgene životinje (**Slika 39B**). Dodatno, rezultati su pokazali povećani nivo proteina IgG u moždanom parenhimu kod 5XFAD miševa u odnosu na ne-transgene kontrole (**Slika 39C**). Ovi rezultati zajedno ukazuju na to da 5XFAD miševi imaju narušeni integritet KMB u odnosu na njihove ne-transgene kontrole i potom je urađena analiza uticaja restrikcije hrane na gore pomenute parameter. Rezultati su pokazali da se ženke 5XFAD miševa iz EOD grupe nisu razlikovale u parametrima integriteta krvno-moždane barijere u odnosu na 5XFAD-AL životinje. Kod ovih životinja nije utvrđen uticaj EOD režima ishrane na zastupljenost receptora PDGFR $\beta$  (**Slika 39A**), prekrivenost pericitima (**Slika 39B**), kao ni na količinu IgG-a u moždanom parenhimu (**Slika 39C**).



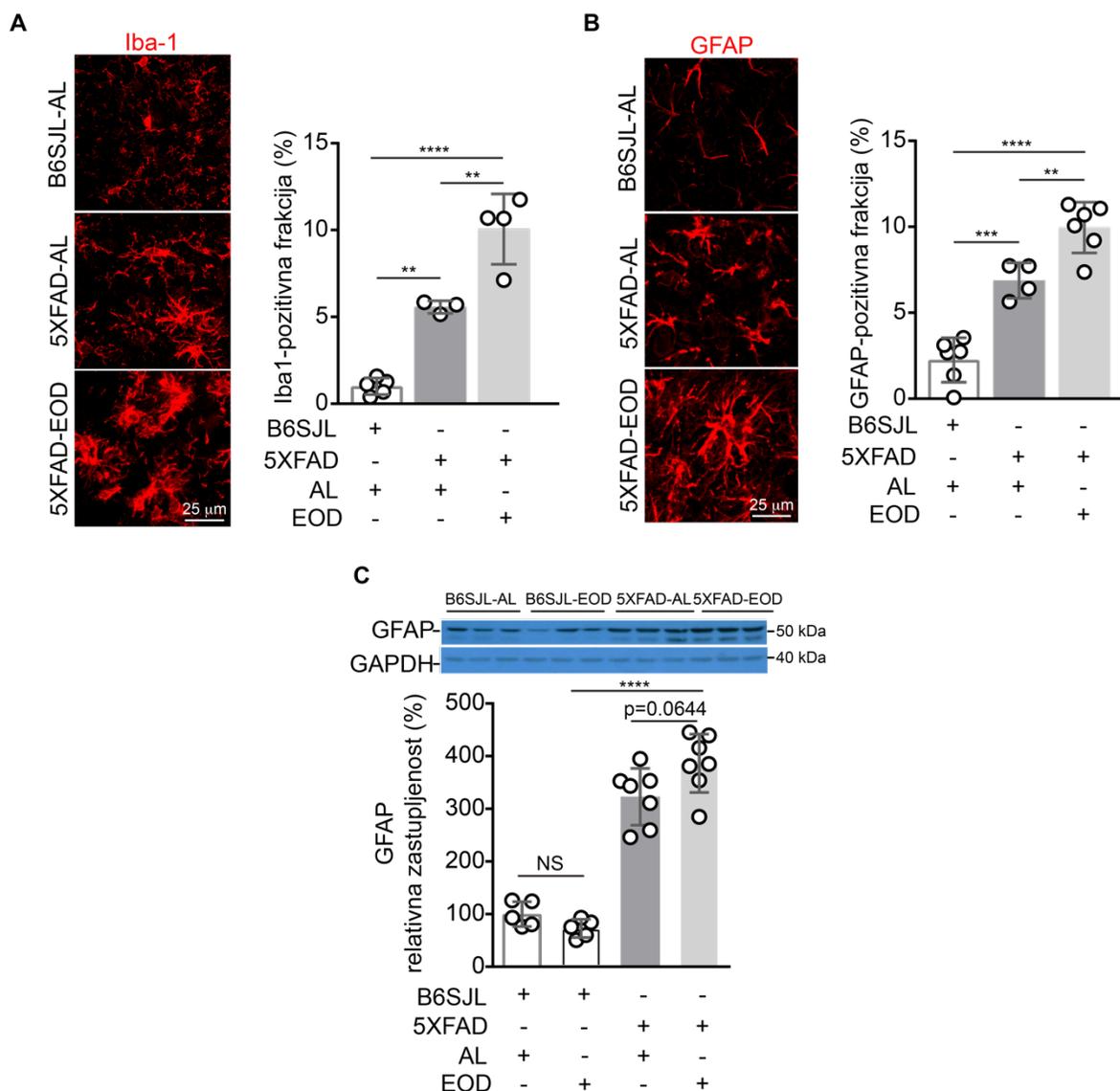
**Slika 39. Restrikcija hrane nema uticaja na integritet krvno-moždane barijere kod 5XFAD miševa.** (A) Relativna zastupljenost PDGFR $\beta$  u moždanom tkivu korteksa, (B) reprezentativne mikrofografije i kvantifikacija prekrivenosti pericitima i (C) relativna zastupljenost teškog lanca IgG kod 5XFAD i B6SJL životinja starih 6 meseci nakon restrikcije hrane (EOD) ili uobičajenog režima ishrane (*ad libitum*, AL). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija za svaku grupu.  $n=3-7$  životinja po grupi. NS - nema značajnosti (eng. *non significant*), \*  $p < 0,05$  ili \*\*  $p < 0,01$ . Skala = 20  $\mu\text{m}$ .

#### 4.4.3. EOD pogoršava inflamaciju kod 5XFAD miševa

Pored izuzetno brze akumulacije amiloida i ranog poremećaja krvno-moždane barijere, karakteristika 5XFAD miševa je i izuzetno rana i intenzivna inflamacija, pre svega u regionima mozga u kojima dolazi do izraženog taloženja A $\beta$ , kao što su subikulum hipokampusa i V sloj kore velikog mozga (Giannoni et al., 2016; Oakley et al., 2006). Stoga su dalja ispitivanja imala cilj da se pokaže da li EOD, iako nema efekata na količinu zastupljenog amiloida, kao ni na poboljšanje integriteta krvno-moždane barijere, može da umanji nivo inflamacije.

Imunohistohemijsko bojenje sa markerima glioze, Iba-1 markerom mikroglije i GFAP-om markerom astrocita, ukazalo je da u korteksu 5XFAD miševa dolazi do porasta intenziteta obojenosti mikroglijskih ćelija za oko 5 puta i astrocita za oko 3 puta u poređenju sa ne-transgenim kontrolama (**Slika 40A, B**). Dobijeni rezultat je bio u skladu sa očekivanim porastom inflamacije usled patoloških procesa taloženja A $\beta$ . Nasuprot dobro poznatim anti-inflamatornim efektima restrikcije hrane, kod transgenih životinja na EOD režimu ishrane je uočen dalji porast u zastupljanosti ispitvanih markera u korteksu ženki 5XFAD miševa, odnosno povećanje od dodatnih 1.5 – 2 puta u poređenju sa 5XFAD miševima hranjenim AL (**Slika 40A, B**).

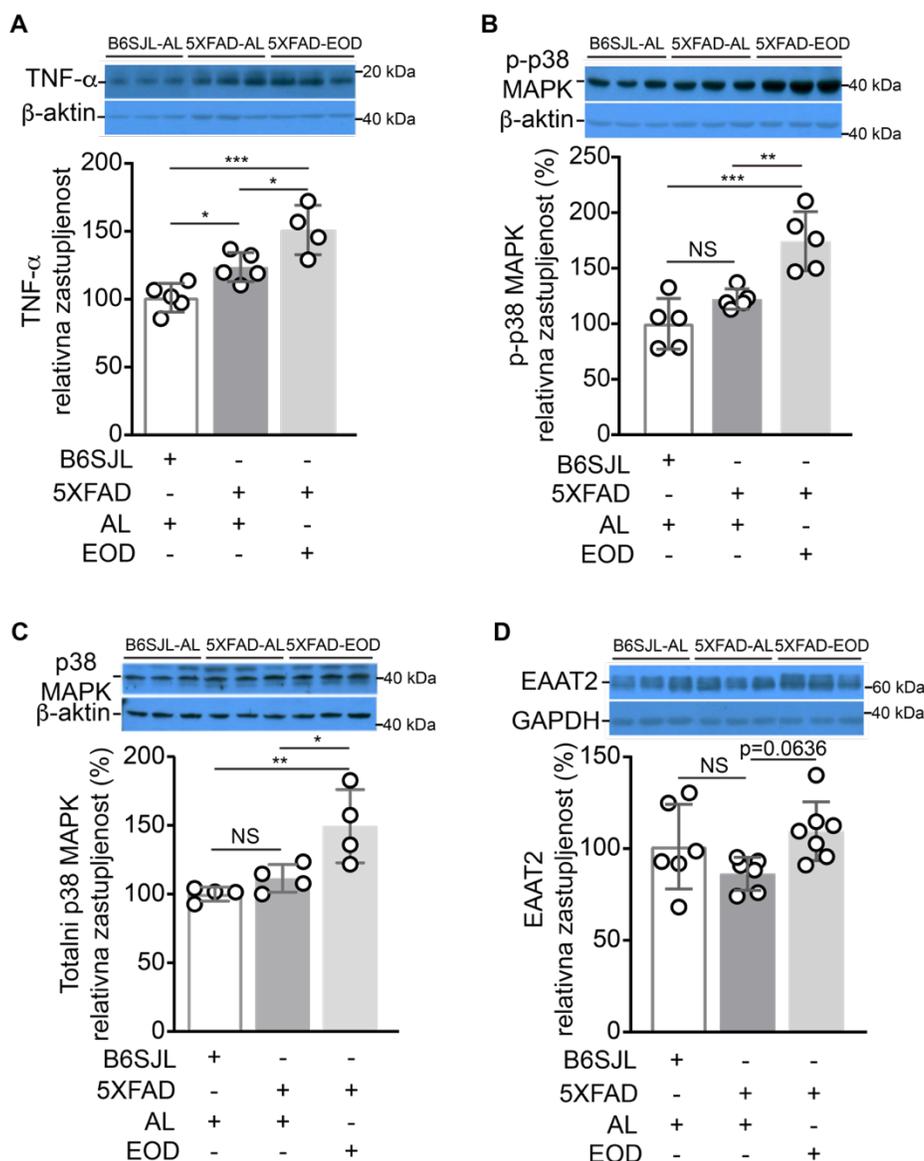
Kako bi se ustanovilo da li je uočen porast specifičan za transgene životinje, u analizu je dalje uključena grupa ne-transgenih životinja (B6SJL miševi) koje su bile na EOD režimu ishrane. Efekti EOD u korteksu transgenih i ne-transgenih miševa su upoređeni Western blot analizom astrocitnog markera, GFAP (**Slika 40C**). Rezultati su pokazali da je EOD povećao nivo GFAP proteina kod 5XFAD miševa, dok je kod ne-transgenih životinja prisutan trend ka smanjenju proteinskog nivoa GFAP, ali bez statističke značajnosti.



**Slika 40. Restrikcija hrane povećava gliozu kod 5XFAD miševa.** Reprezentativne mikrografije i kvantifikacija Iba-1 (A) i GFAP (B) imunobojenja u korteksu i (C) relativna zastupljenost GFAP u korteksu 5XFAD i B6SJL životinja starosti 6 meseci nakon primene restrikcije hrane (EOD) ili uobičajenog načina ishrane *ad libitum* (AL). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija za svaku grupu.  $n=3-7$  životinja po grupi. NS - nema značajnosti (eng. *non significant*), \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  i \*\*\*\* $p < 0,0001$ . Skala = 25  $\mu\text{m}$ .

Pored glioze i/ili proliferacije glijskih ćelija nakon EOD režima ishrane, ispitivani su i dodatni markeri inflamacije. Najpre su izmereni nivoi inflamatornog citokina TNF $\alpha$ , i dobijeni rezultati su pokazali da su nivoi TNF $\alpha$  značajno povećani kod 5XFAD-AL miševa u poređenju sa njihovim ne-transgenim kontrolama, kao i da je nivo TNF $\alpha$  kod 5XFAD miševa na EOD režimu ishrane još više povećan u odnosu na 5XFAD-AL (**Slika 41A**). Dodatno, analize p38 mitogen-aktivirajuće protein kinaze (p38 MAPK), kinaze koja je uključena u produkciju citokina poreklom iz glijskih ćelija i inflamacijom-indukovane neurotoksičnosti koja je povećana u prisustvu citokina (Bachstetter and Van Eldik, 2010), su pokazale da je fosforilisana forma ove kinaze povećana za 30% (**Slika 41B**), dok je njen ukupni nivo povećan za 25% u korteksu 5XFAD-EOD miševa u poređenju sa 5XFAD-AL životinjama (**Slika 41C**).

Nivo glutamatnog transportera koji je specifičan za astrocite (eng. *excitatory amino acid transporter 2*, EAAT2) (Vanlandewijck et al., 2018), pokazao je trend ka povećanju nivoa proteina kod 5XFAD-EOD miševa, za ~30% u poređenju sa 5XFAD-AL životinjama (**Slika 41D**), što je u skladu sa prethodnim studijama koje su pokazale da reaktivne astrocite karakteriše povećana ekspresija EAAT2 (Desilva et al., 2008). Navedeni rezultati stoga ukazuju da EOD režim pojačava već postojeću inflamaciju u korteksu 5XFAD miševa.



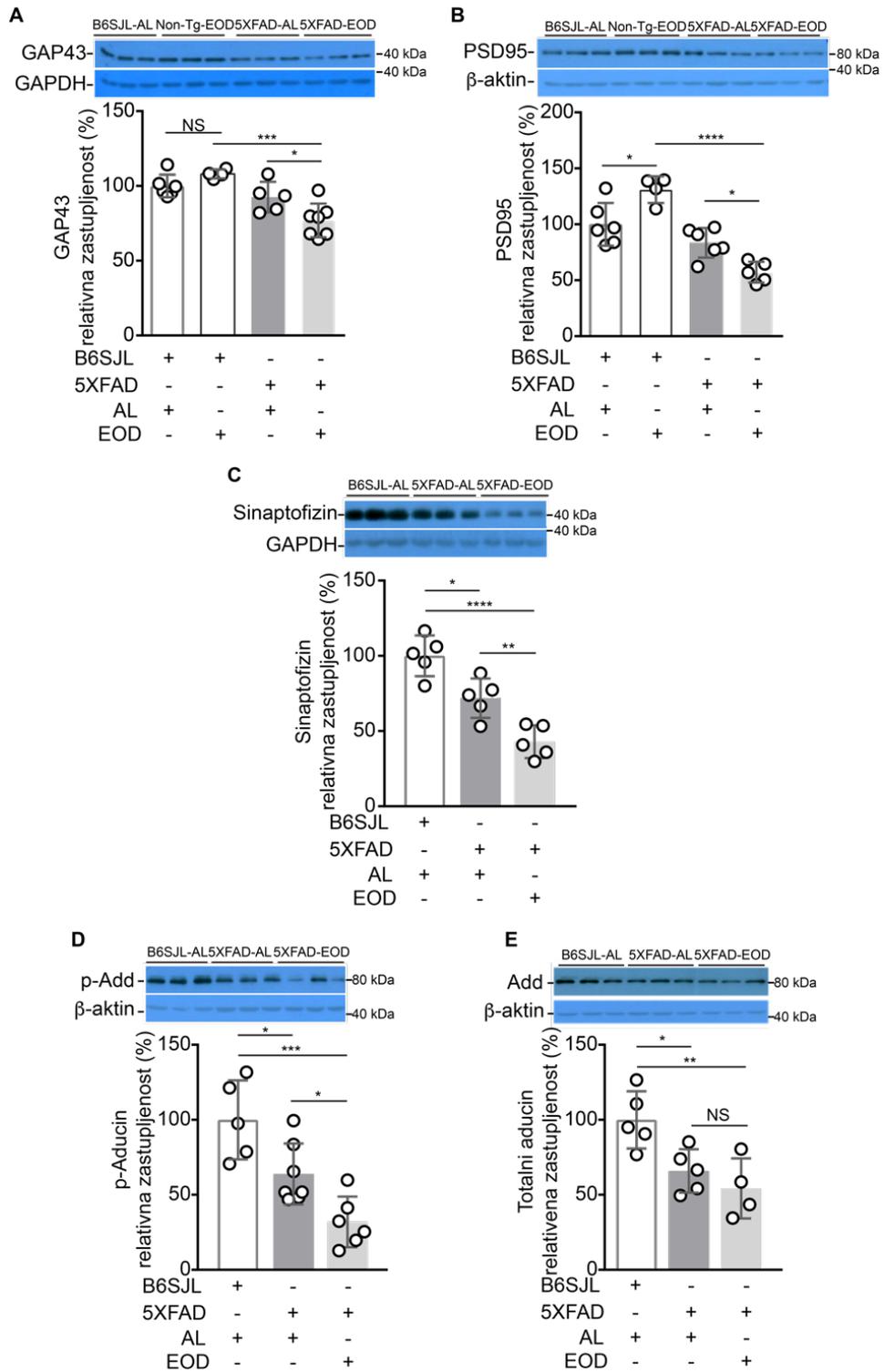
**Slika 41. Restrikcija hrane povećava inflamaciju kod 5XFAD miševa.** (A) relativna zastupljenost TNF- $\alpha$ , (B) fosforilisane forme p-38 MAPK, (C) ukupne p-38 MAPK i (D) EAAT2 kod 6 meseci starihi 5XFAD i B6SJL životinja izloženih restrikciji hrane (EOD) u odnosu na kontrolne, *ad libitum* hranjene životinje (AL). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija za svaku grupu.  $n=3-7$  životinja po grupi. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

#### 4.4.4. EOD dovodi do smanjenja ekspresije markera sinaptičke plastičnosti kod 5XFAD miševa

Degenerativne promene sinapsi u 5XFAD modelu su opisane i poznato je da su već prisutne kod 6 meseci starih životinja (Oakley et al., 2006). Takođe, rezultati iz naše i drugih laboratorija su pokazali neuroprotektivni efekat restrikcije hrane na ekspresiju sinaptičkih proteina u ne-transgenim životinjama (Lončarević-Vasiljković et al., 2009; Mladenovic Djordjevic et al., 2010; Singh et al., 2015). Stoga su, u narednim eksperimentima ispitivani efekti EOD na ekspresiju sinaptičkih proteina u 5XFAD i ne-transgenim miševima. Analizirani su presinaptički marker, GAP-43 (eng. *growth associated protein of 43 kDa*) i postsinaptički marker, PSD-95 (eng. *postsynaptic density protein 95*), Western blot analizama kortikalnog tkiva ne-transgenih miševa hranjenih AL i EOD, kao i 5XFAD miševa koji su bili na AL i EOD režimu ishrane. Rezultati su pokazali blago povišenje u nivou GAP43 proteina kod ne-transgenih-EOD miševa u poređenju ne-Tg-AL miševima, dok je značajan pad u GAP43 proteinu detektovan između 5XFAD-EOD i 5XFAD-AL miševa. Dodatno, nivo GAP43 proteina je smanjen za oko 30% kod 5XFAD-EOD miševa u poređenju sa ne-Tg-EOD grupom (**Slika 42A**). Prilikom analize Western blot rezultata za protein PSD95 utvrđeno je da je nivo PSD95 značajno povišen kod ne-Tg miševa hranjenih EOD u poređenju sa ne-Tg-AL miševima, za oko 25% (**Slika 42B**), što je bilo i očekivano. EOD režim je ipak značajno smanjio nivo PSD95 proteina kod 5XFAD miševa, za oko 32% u poređenju sa 5XFAD-AL i za oko 57% u poređenju sa ne-Tg-EOD grupom. Rezultati su dalje pokazali statistički značajnu interakciju između režima ishrane i genotipa prilikom analize nivoa proteina GAP43 i PSD95, sa značajnim efektom genotipa u oba slučaja.

Dalje analize su pokazale da se nivoi dodatnih markera sinaptičke plastičnosti, sinaptofizina i aducina (Add), kod ne-Tg-AL, 5XFAD-AL i 5XFAD-EOD miševa takođe značajno menjaju nakon restrikcije hrane. Western blot analize su pokazale značajni pad od 35% u nivou sinaptofizina kod 5XFAD-AL životinja u poređenju sa ne-Tg-AL miševima. Kod 5XFAD-EOD životinja, je detektovan značajan dalji pad od 43% u nivou sinaptofizina u poređenju sa 5XFAD-AL miševima. Dodatno, nivoi ukupne i fosforilisane forme aducina (p-Add), proteina koji reguliše stabilnost sinapse, su bili takođe smanjeni kada su kao faktori za analizu bili genotip i primenjen režim ishrane (**Slika 42D, E**). Kod 5XFAD-AL životinja,

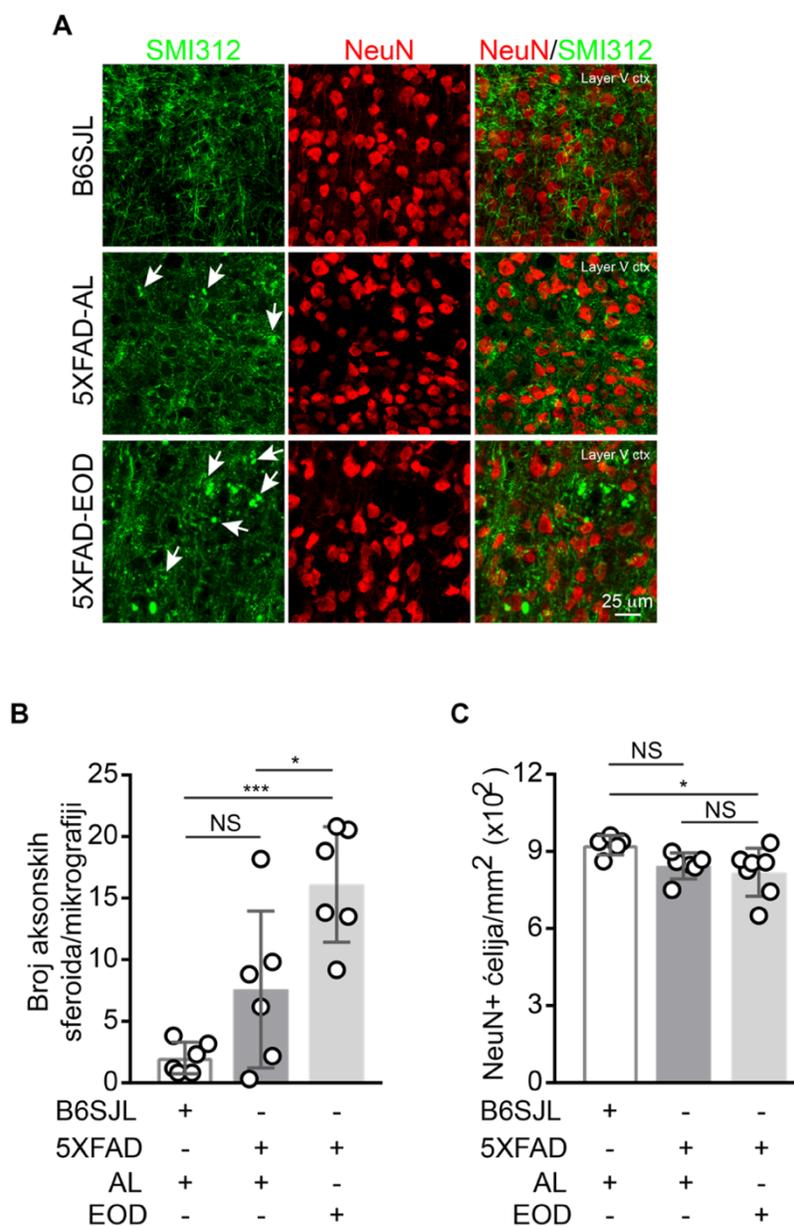
nivoi p-Add i Add proteina su redukovani za 35-40% u poređenju sa nivoima istih proteina u ne-Tg-AL kontrolnim životinjama. EOD režim ishrane u trajanju od 4 meseca je doveo do dodatnog pada nivoa fosforilisane forme Add proteina za 40%, dok je nivo ukupnog Add ostao nepromenjen između 5XFAD-AL i 5XFAD-EOD grupe miševa, iako pokazuje trend ka smanjenju kod 5XFAD-EOD grupe (**Slika 42D, E**).



**Slika 42. Restrikcija hrane izaziva smanjenu ekspresiju sinaptičkih proteina kod 5XFAD miševa.** (A) Relativna zastupljenost GAP43, (B) sinaptofizina, (C) PSD-95, (D) p-aducina i (E) ukupnog aducina kod 5XFAD i B6SJL životinja starih 6 meseci nakon restrikcije hrane (EOD) ili uobičajenog režima ishrane (AL). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija za svaku grupu.  $n=5-7$  životinja po grupi. NS - nema značajnosti (eng. *non significant*), \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  ili \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

#### 4.4.5. EOD dovodi do povećanja broja distrofičnih neurita i gubitka neurona kod 5XFAD miševa

Utvrđen pad sinaptičkih proteina kod 5XFAD miševa koji su bili na EOD režimu ishrane je uslovio dalju analizu statusa i zdravlja neurona, istovremenim imunohistohemijskim obeležavanjem sa SMI312, markerom neuritskih nastavaka i NeuN, markerom neuronskih tela, u korteksu ženki 5XFAD i ne-Tg miševa. Rezultati SMI312 imunohistohemijske analize su pokazali značajni porast broja tzv. aksonskih sferoida, obeležja distrofičnih neurita, kod 5XFAD-EOD u poređenju sa ne-Tg-AL, kao i u poređenju sa 5XFAD-AL miševima (**Slika 43A, B**). Dodatno, kvantitativna analiza NeuN-obeležanih ćelija je ukazala na smanjen broj NeuN-pozitivnih ćelija u 5XFAD-EOD grupi u poređenju sa ne-Tg-AL grupom (**Slika 43A, C**). Ovi rezultati, zajedno sa rezultatima dobijenim za sinaptičke markere, ukazuju da EOD režim ishrane u trajanju od 4 meseca ugrožava sinaptičku plastičnost i dovodi do oštećenja koja rezultuju u smanjenom broju neurona kod 5XFAD miševa, kao i da su ovi deficiti verovatno posledica povećane inflamacije koja je izazvana EOD režimom ishrane kod transgenih, 5XFAD životinja.



**Slika 43. Restrikcija hrane izaziva gubitak neurona kod 5XFAD miševa.** (A) Reprerzentativne mikrografije i kvantifikacija broja aksonskih sferoida (B) i NeuN-pozitivnih ćelija (C) kod 5XFAD i B6SJL životinja starih 6 meseci nakon restrikcije hrane (EOD) ili uobičajenog režima ishrane (AL). Rezultati suprikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija za svaku grupu.  $n=5-7$  životinja po grupi. NS - nema značajnosti (eng. *non significant*), \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  ili \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Skala = 25  $\mu\text{m}$ .

## 5. DISKUSIJA

### 5.1. Uticaj hroničnog gubitka pericita KMB na neurone i ponašanje

Periciti, muralne ćelije KMB, imaju mnogobrojne uloge u održavanju fiziološke homeostaze mozga (Armulik et al., 2011). Naležući na površinu endotelnih ćelija, na elektronskoj mikroskopiji pokazano je da periciti prekrivaju kapilare sa oko 85% u retini i mozgu kod zdravih majmuna i ljudi (Frank et al., 1990). Osim elektronske mikroskopije, prekrivenost pericitima se može utvrditi i na dvojnomo imunohistohemijskom bojenju korišćenjem markera pericita CD13 (poznat i kao aminopeptidaza N) i lektina koji obeležava krvne sudove (Bell et al., 2010; Halliday et al., 2016; Kisler et al., 2017b; Montagne et al., 2018; Nikolakopoulou et al., 2017). Gubitak ili genetičke mutacije na receptoru PDGFR $\beta$  dovode do značajnog gubitka pericita i time smanjene pokrivenosti kapilara, što dalje dovodi do strukturnog narušenja integriteta KMB (Winkler et al., 2014).

Pokazano je da *Pdgfr $\beta$ <sup>+/-</sup>* miševi starosti od 1-2 meseca gube već oko 20% pericita (Kisler et al., 2017b; Sagare et al., 2013b), dok su naši rezultati su pokazali da *Pdgfr $\beta$ <sup>+/-</sup>* miševi starosti 6-8 meseci imaju za oko 40% manju prekrivenost kapilara pericitima u somatosenzornom korteksu u poređenju sa odgovarajućim kontrolama (129s/SvImJ), što se poklapa sa prethodno objavljenim studijama (Sagare et al., 2013a). Pokazano je takođe da kod *Pdgfr $\beta$ <sup>F7/F7</sup>* miševa dolazi do bržeg gubitka pericita i time smanjenja pokrivenosti kapilara u *corpus callosum*-u (CC), koje počinje već od 4-6 nedelja starosti i iznosi oko 24%, dok kod 3-4 meseca starih životinja iznosi do 50%, a 60% kod 9-12 meseci starih životinja. PDGFR $\beta$  je tirozin kinaza receptor, koji nakon vezivanja liganda podleže dimerizaciji i autofosforilaciji na 13 tirozinskih ostataka. Ovi fosforilisani tirozini su zatim dostupni vezivanju proteina koji sadrže domen SH2 čime se inicira kaskada mnogih signalnih puteva. Ovi signalni putevi imaju uloge u kontroli brojnih ćelijskih funkcija, uključujući proliferaciju, migraciju, taloženje matriksa i odgovor ranih gena (Tallquist et al., 2003). Razlog za obilniji gubitak prekrivenosti pericitima u odnosu na *Pdgfr $\beta$ <sup>+/-</sup>* model, je prisustvo 7 mutacija na PDGFR $\beta$  receptoru na mestima koje sadrže tirozin, što dovodi do odsustva fosforilacije tirozinskih ostataka i vezivanja proteina koji sadrže domen SH2, te do odsustva

aktivacije mnogih prethodno nabrojanih signalnih puteva, dok je kod *Pdgfr* $\beta^{+/-}$  miševa prisutna jedna funkcionalna kopija PDGFR $\beta$  receptora koja je sposobna da inicira signalnu kaskadu. U poređenju sa prethodno objavljenim podacima (Nikolakopoulou et al., 2017), naši rezultati su pokazali da je prekrivenost kapilara pericitima u CC značajno manja u odnosu na korteks, hipokampus i talamus kod *Pdgfr* $\beta^{F7/F7}$  miševa u svim ispitanim vremenskim tačkama, dok prekrivenost kapilara u talamusu nije narušena kod ovih životinja starih 4-6 nedelja. Regionalne razlike u vaskularnom fenotipu, naročito u CC, su verovatno posledica regionalnih razlika u prenosu signala u okviru odgovarajućih neurovaskularnih jedinica, ali ćelijski i molekularni mehanizmi nisu sasvim razjašnjeni (Nikolakopoulou et al., 2017).

Prethodno objavljeni podaci su pokazali da *Pdgfr* $\beta^{F7/F7}$  životinje imaju gubitak pericita u većini moždanih regiona (Nikolakopoulou et al., 2017). Međutim, ove životinje nemaju deficite na svim testovima ponašanja podjednako, verovatno zbog kombinacije osetljivosti određenog regiona na vaskularne promene i osetljivost testa da detektuje deficite. U ovoj tezi je pokazano da *Pdgfr* $\beta^{F7/F7}$  životinje 3-4 meseca starosti nemaju probleme u testu otvorenog polja, hodanje po gredi i uklanjanje adheziva, a pokazano je da nemaju ni gubitak neurona u korteksu i hipokampusu (Montagne et al., 2018). Za razliku od ovih testova, *Pdgfr* $\beta^{F7/F7}$  životinje su pokazale probleme u učenju na testu rotarod, trčanje na kompleksnom točku i čak u testu prostorne memorije - radijalnom lavirintu. Kod ovih životinja je detektovan i gubitak mijelina i nervnih nastavaka u CC koji se pogoršava sa starenjem, što je verovatno razlog deficita u ovim testovima. Ovo je u skladu sa literaturnim podacima da učenje motornih veština zahteva centralnu mijelinizaciju (McKenzie et al., 2014), kao i da modeli hirurškog ili genetičkog uklanjanja CC (Schalomon and Wahlsten, 2002) ili kuprizonski modeli demijelinizacije (Franco-Pons et al., 2007; Hibbits et al., 2009) pokazuju probleme u rotarodu i trčanju na kompleksnom točku. Dodatno, ispitivanja su pokazala da hronična hipoperfuzija izazvana stenozom bilateralne karotidne arterije, dovodi do oštećenja bele mase i gubitka mijelina, bez gubitka nervnih ćelija u hipokampusu, što se na funkcionalnom nivou ogleda jedino u problemima sa prostornim učenjem i pamćenjem u radijalnom lavirintu, a ne u drugim testovima koji su zavisni od hipokampusa (Coltman et al., 2011; Shibata et al., 2007). Slično objavljenim rezultatima (Shibata et al., 2007),

strukturne promene bele mase ne utiču na ponašanje u klasičnom kontekstualnom uslovljanju straha, što se slaže i sa našim rezultatima. Međutim, gubitak pericita je doveo do deficita u sposobnosti prisećanja (2 nedelje nakon izlaganja električnom šoku), verovatno zbog oštećenja bele mase i time neadekvatnog prenosa informacija od hipokampusa do anteriornog cingulatnog korteksa (Bubb et al., 2017) koji ima veliku ulogu u ovom tipu memorije (Einarsson and Nader, 2012; Frankland et al., 2004)

Naši rezultati su pokazali da periciti imaju ključnu ulogu u održavanju optimalne fiziološke sredine u belojoj masi što je izuzetno važno za pravilno funkcionisanje nervnih ćelija kod *Pdgfr $\beta$ <sup>F7/F7</sup>* životinja. Međutim, mehanizmi kojima gubitak pericita dovodi do promena na nekim vrstama ponašanja i gubitka mijelina u CC, su nepoznati. Prethodna istraživanja su pokazala da gubitak pericita dovodi do povećane propustljivosti krvno-moždane barijere preko najmanje dva mehanizma: regulišući ekspresiju gena specifičnih za KMB u endotelnim ćelijama, kao i indukujući polarizaciju astrocitnih stopala koji okružuju krvne sudove CNS-a (Armulik et al., 2010). Takođe je pokazano da prekrivenost pericitima (i time integritet KMB) u velikoj meri koreliše sa količinom fibrina i fibrinogena u vankapilarnom prostoru u okolnom moždanom tkivu (Bell et al., 2010; Nikolakopoulou et al., 2017). Fibrinogen je protein veličine 340 kDa koji se primarno sintetiše u hepatocitama i najzastupljeniji je u krvi (Kattula et al., 2017), mada postoje podaci da se lanci A $\alpha$ , B $\beta$  i  $\gamma$  ekspimiraju i u astrogliji i neuronima (Golanov et al., 2019). Kako je već pomenuto, fibrinogen se sastoji od dva dimera, od kojih se svaki sastoji od A $\alpha$ , B $\beta$  i  $\gamma$  lanca. U krvi, molekuli fibrinogena cirkulišu sve dok trombin (serin proteaza koja je prisutna i u mozgu) ne odvoji fibrinopeptide FpA i FpB od lanaca A $\alpha$  i B $\beta$  formirajući fibrinske monomere, koji dalje podležu polimerizaciji formirajući mrežu fibrina na mestu povrede tkiva (Golanov et al., 2019; Kattula et al., 2017). Fibrinogen i fibrin imaju ulogu u zgrušavanju krvi, fibrinolizi, interakcijama između ćelija i sa ćelijskim matriksom, inflamaciji, zarastanju rana i neoplaziji (Mosesson, 2005). Kada je KMB narušena, molekuli fibrinogena cure iz krvnih kapilara u moždani parenhim gde imaju direktan kontakt sa različitim ćelijama mozga i ekstraćelijskim matriksom. U mozgu AB pacijenata, fibrinogen kolokalizuje sa amiloidnim plakama, koreliše sa gubitkom pericita, distrofičnim neuritima i aktiviranom mikrogljom, a njegovo povećanje u krvnoj plazmi i cerebrospinalnoj tečnosti koreliše sa atrofijom mozga (Petersen et al., 2018; Strickland,

2018). Depoziti fibrina se javljaju u mnogim životinjskim modelima AB, kao i u pericit-deficijentnim i APOE transgenim miševima (Montagne et al., 2017). Pokazano je da se fibrinogen vezuje za CD11b-CD18 integrin receptor (tzv. komplement receptor 3, Mac-1 i  $\alpha$ M $\beta$ 2) i indukuje aktivaciju mikroglije (Petersen et al., 2018). Zatim, pokazano je da fibrinogen vezuje i A $\beta$  i da farmakološka ili genetička delecija fibrinogena smanjuje kognitivne deficite i neuropatologiju u AB modelima (Cortes-Canteli et al., 2010; Montagne et al., 2018). Fibrinogen i fibrili fibrina su izuzetno toksični za oligodendrocite i pericite *in vitro*, i pokreću ćelijsku smrt aktivirajući autofagiju, dok nemaju uticaja na astrocite (Montagne et al., 2018). Zatim je pokazano da, u prisustvu A $\beta$ , fibrinogen u mozgu pokreće aktivaciju mikroglije kroz receptor CD11b, indukujući produkciju reaktivnih vrsta kiseonika (eng. *reactive oxygen species*, ROS), što dalje promoviše eliminaciju dendritskih trnova i dendrita na neuronima dovodeći do pada kognitivnih sposobnosti (Merlini et al., 2019). Međutim, i u *wild-type* mozgu, fibrinogen takođe aktivira mikrogliju što dovodi do gubitka dendritskih trnova, što pokazuje da je fibrinogen dovoljan da izazove oštećenje neurona čak i u odsustvu abnormalne akumulacije A $\beta$ . S obzirom da je proinflamatorni agens, fibrinogen paralelno sa A $\beta$  može da indukuje oštećenje dendrita i deficite u kogniciji (Merlini et al., 2019). Studije su takođe pokazale da fibrin promoviše inflamaciju i aktivaciju mikroglije u životinjskim modelima AB (Paul et al., 2007) i multiple skleroze (Akassoglou et al., 2004) i stimuliše aktivaciju i indukciju antigen-prezentujućih gena u kulturi primarne mikroglije i makrofagama iz koštane srži (Ryu et al., 2015).

Degeneracija pericita u modelu *Pdgfr $\beta$ <sup>F7/F7</sup>* dovodi do ranog narušavanja KMB što rezultuje u ranoj akumulaciji fibrin(ogena) u beloj masi, dovodeći do agresivnog vaskularnog fenotipa i gubitka mijelina, što dalje dovodi do poremećaja u nervnim mrežama i funkcionalnim deficitima, mnogo ranije nego što se može detektovati gubitak neurona (Montagne et al., 2018). Kod *Pdgfr $\beta$ <sup>F7/F7</sup>* životinja 3-4 meseca starosti, iako je prekrivenost pericitima smanjena i u sivoj i u beloj masi, smanjen broj neurona je primećen samo u beloj masi (Montagne et al., 2018). Ove regionalne razlike su verovatno posledica nekoliko procesa. Pre svega, u beloj masi se nalazi znatno manje krvnih sudova u poređenju sa sivom masom po jedinici merenja i čak i mala promena u propustljivosti kapilara može da utiče na

relativno veliku površinu moždanog tkiva. Zatim, pokazano je da oligodendrociti i neuroni različito reaguju na akumulaciju fibrinogena: dok oligodendrociti preuzimaju fibrinogen i fibrin nastao od mreže fibrinogena, neuroni ne preuzimaju fibrinogen i time „kasne“ sa preuzimanjem toksičnog molekula, fibrina (formiranog u moždanom tkivu iz fibrinogena). Zbog toga je pad broja neurona u korteksu i hipokampusu primećen kasnije, u grupi 9-12 meseci starosti (Montagne et al., 2018). Modulacija sistemskog nivoa fibrinogena smanjuje nivo depozita fibrin(ogena), bilo farmakološkim (korišćenjem anastrozola, supstance serin proteaze slične trombinu, koji je defibrinogenišući agens izolovan iz otrova zmije i koji je ima antikoagulativno dejstvo) ili genetičkim manipulacijama (kod fibrinogen heterozigotnih, *Fga*<sup>+/-</sup> miševa), može da umanja nivo fibrinogena u plazmi i time umanja stepen akumulacije fibrin(ogena), zatim degeneraciju pericita, vaskularnu patologiju i degeneraciju bele mase, dok je povećanje fibrinogena u plazmi pomoću traneksamične kiseline, TXA, imalo suprotne efekte (Montagne et al., 2018). Ovi rezultati su pokazali da akumulacija fibrin(ogena) važan patogeni faktor povezan sa gubitkom pericita, mikrovaskularnom disfunkcijom, patologijom bele mase i gubitkom oligodendrocita. Osim uloge u održavanju KMB, periciti fizički mogu da reaguju sa različitim tipovima ćelija, kao što je potpora diferencijacije oligodendrocitnih prekursorskih ćelija (eng. *oligodendrocyte precursor cells*, OPC) u oligodendrocite, kao što je pokazano *in vitro* i *in vivo* (Maki et al., 2015).

Još jedan mehanizam kojim nedostatak pericita može da dovede do smrti neurona i poremećaja u ponašanju životinja je odsustvo neurovaskularnog kuplovanja. Neurovaskularno kuplovanje je proces kojim se aktivnim regionima mozga adekvatno dostavljaju kiseonik i nutrijenti. Mozak je najaktivniji organ u našem telu, trošeći jednu petinu od ukupne količine kiseonika i glukoze (Kisler et al., 2017a), ali nema sposobnost sinteze i skladištenja kiseonika i nutrijenata. Zbog toga, zahtevi za kiseonikom i nutrijentima su precizno regulisani moždanim protokom krvi. Neurovaskularno kuplovanje je regulisano sinhronizovanom aktivnošću različitih tipova ćelija u okviru neurovaskularne jedinice, i uključuje neurone, glatke mišićne ćelije, endotel i astrocite, ali i pericite. Kako je pokazano, *Pdgfr* $\beta$ <sup>+/-</sup> miševi 1-2 meseci starosti pokazuju poremećaje u neurovaskularnom kuplovanju: imaju smanjeni moždani protok krvi, smanjenu i odloženu promenu i smanjenu amplitudu promene dijametra kapilara nakon stimulusa, kao i smanjenu oksigenaciju tkiva i pojavu

metaboličkog stresa u poređenju sa njihovim *Pdgfr* $\beta^{+/+}$  kontrolama (Kisler et al., 2017b). Ove promene nakon dužeg vremena dovode do kompromitovanja nervne funkcije i neurodegeneracije, i pokazano je da *Pdgfr* $\beta^{+/-}$  miševi 6-8 meseci starosti imaju izražene deficite u odgovoru neurona nakon električnog stimulusa, što je zabeleženo odsustvom promene fluorescentnog signala boje koja je osetljiva na voltažu (eng. *voltage sensitive dye*, VSD), povećanu smrt neurona i poremećaje u ponašanju, ukazujući na dodatni mehanizam kojim periciti doprinose ukupnoj homeostazi nervnog tkiva.

## 5.2. Uticaj akutnog gubitka pericita KMB na neurone i ponašanje

U prethodnom odeljku je diskutovano o ulozi pericita u modelima koji imaju hroničan gubitak ovih ćelija. Postavlja se pitanje, međutim, da li akutni gubitak pericita takođe može da dovede do poremećaje u ponašanju, i koji su potencijalni mehanizmi. Stoga smo kreirali specijalan mišji model, Pericit-Cre, kod kojeg se, uz pomoć strategije duplog promotora, eksprimira DT receptor samo na pericitima i nakon tretmana sa toksinom difterije dolazi do njihove smrti. Za razliku od Pericit-Cre miševa, kod kojih je gubitak specifičan za pericite i ne utiče na druge ćelije KMB (Nikolakopoulou et al., 2019), kod modela sa naslednim formama mutiranog PDGFR $\beta$  receptora, gubitak ćelija nije specifičan samo za pericite (Tallquist et al., 2003). Naši rezultati su pokazali da kod Pericit-Cre miševa, gubitak neurona u korteksu se javlja već 15 dana nakon administracije difterije toksina, dok se gubitak neurona kod modela sa naslednim formama mutiranog PDGFR $\beta$  javlja kasnije u životu oko 6-8 meseci starosti i odvija se 20 puta sporije. Ovo je verovatno posledica brzog gubitka pericita u Pericit-Cre modelu, za oko 60-80 puta brže nego kod modela sa mutacijom na PDGFR $\beta$ , što dalje dovodi do akutnih problema u cirkulaciji. Takođe, u naslednim mutacijama na receptoru PDGFR $\beta$ , gubitak pericita se dešava tokom razvića što pruža organizmu šansu da kompenzuje i prilagodi na vaskularne promene.

Neurotrofički faktori su kritični za pravilno razviće i održanje nervnog sistema (Wanaka et al., 1993). Prve studije su započete na NGF (eng. *nerve growth factor*), za koji je pokazano da je nephodan za preživljavanje perifernih simpatičkih i senzornih neurona poreklom iz nervne kreste. Zatim je pokazano da se NGF kao i BDNF (eng. *brain derived*

*neurotrophic factor*) (Leibrock et al., 1989) i neurotrofin-3 (NT-3) (Hohn et al., 1990; Maisonpierre et al., 1990) eksprimiraju u neuronima CNS-a i da promovišu njihovo preživljavanje. Drugi faktori kao što su faktori rasta koji vezuju heparin (eng. *heparin binding growth factors*) takođe mogu da utiču na nervnu funkciju. Plejotrofin (eng. *pleiotrophin*, PTN) je protein koji vezuje heparin koji je izolovan 90tih godina iz neonatalnog mozga pacova i pokazano je da promoviše rast neurita iz kortikalnih neurona (Rauvala, 1989), a nezavisna studije je pokazala prisustvo PTN-a u uterusu goveda (Milner et al., 1989). Iako su biohemijske i funkcionalne osobine PTN-a vrlo slične proteinima koji pripadaju FGF familiji (eng. *fibroblast growth factor*), primarna struktura PTN-a se razlikuje od članova FGF familije. PTN se eksprimira na regulisan način tokom razvića. Naročito je zastupljen u mozgu, crevima i mišićima tokom ranog postnatalnog perioda, dok kod odraslih životinja, ekspresija PTN-a drastično opada (Wanaka et al., 1993). PTN je sekretovani faktor rasta, ali i citokin koji je asociran za vanćelijskim matriksom. U tkivima koja ga eksprimiraju utiče na ćelijsku proliferaciju, rast i diferencijaciju kroz interakcije sa različitim receptorima. U CNS-u, PTN ima neurotrofičke i protektivne efekte u kasnijem razviću i njegova uloga je prepozanta i u neurodegenerativnim i nervnim poremećajima (González-Castillo et al., 2014). Pokazano je da u modelu koji ima deleciju *Ptn*-a, (*Ptn knock-out* miševi), PTN ima ulogu u učenju i pamćenju, što ukazuje da je PTN neuromodulatorni molekul u CNS-u, naročito hipokampusu (González-Castillo et al., 2014).

Pokazano je da su periciti veliki izvor trofičkog faktora PTN-a u mozgu (Vanlandewijck et al., 2018), ali nekoliko studija pokazuju da i druge ćelije CNS-a mogu da eksprimiraju *Ptn* osim pericita (Zeisel et al., 2018), naročito glijske ćelije olfaktornog bulbusa koje po nekim podacima eksprimiraju najviše nivoa *Ptn* (Zeisel et al., 2018). Kako je pokazano da postoji više podtipova pericita (Zeisel et al., 2018), moguće je da se nivoi ekspresije *Ptn* razlikuju između njih. Pokazano je da infuzijom PTN-a u lateralne komore Pericit-Cre miša dovodi do poboljšanja u kognitivnim testovima ponašanja i do odsustva smrti neurona (Nikolakopoulou et al., 2019). Međutim, pokazano je da injekcijom malih interferišućih RNK molekula (eng. *small interfering RNA*, siRNA), u ovom slučaju *siPtn*, koji imaju ulogu u blokiranju ekspresije *Ptn* gena (eng. *silencing*) u modelu koji nije tretiran sa DT, ne dolazi do smrti neurona, ni problema u ponašanju, što govori o tome da je za izražen

fenotip potrebno i gubitak pericita (i time problemi u KMB) i gubitak trofičkog faktora važnog za pravilno funkcionisanje neurona. Smrt neurona i problemi u ponašanju nisu detektovani 3 dana nakon poslednje DT injekcije, iako je broj pericita značajno smanjen u toj ispitanoj tački, verovatno zbog delimične plastičnosti i tolerancije neurona na gubitak neurotrofičke podrške.

Zdravlje pericita i mehanizme kojima oni doprinose fiziologiji i patologiji je izuzetno važno dodatno ispitati i razumeti. Pokazano je da kod pacijenata AB, degeneracija pericita i poremećaj KMB mogu biti rani nezavisni markeri kognitivne disfunkcije (Nation et al., 2019), međutim mehanizmi njihove degeneracije u različitim neurološkim oboljenjima zahtevaju dodatne studije.

### **5.3. Poremećenost KMB u modelima AB**

Naši rezultati na starim Tg2576 i 3xTg-AD miševima su pokazali povećanu količinu IgG proteina u moždanom parenhimu ukazujući na otvorenost KMB. Kod Tg2576, povećani nivo IgG smo detektovali i u 12-13 meseci starim životinjama, mnogo ranije nego što je zabeležen gubitak neurona. Slično, naši rezultati na 5XFAD miševima su pokazali da 7 meseci stare životinje imaju izuzetnu otvorenost KMB. Ovaj rezultat je u saglasnosti sa literaturnim podacima da 5XFAD miševi imaju otvorenu KMB veoma rano, čak od 4 meseca starosti, što je nekoliko meseci pre početka gubitka neurona u ovom modelu (Eimer and Vassar, 2013; Oakley et al., 2006). Gubitak neurona kod 6 meseci starih 5XFAD životinja nije jasno pokazan, a izgleda da nije ni uniforman kod svih životinja (Eimer and Vassar, 2013). Naši rezultati su pokazali da 7 meseci stari 5XFAD miševi imaju probleme u kogniciji, pre gubitka neurona, a koje je verovatno posledica toksičnosti izazvane amiloidom (Cleary et al., 1995; Lesné et al., 2006) i probleme u dugotrajnoj potencijaciji (Walsh et al., 2002), ali verovatno i zbog povećane propustljivosti KMB i prisustva fibrinogena i fibrina, koji su toksični za mnoge ćelije mozga, kao što je prethodno diskutovano (poglavlje 5.1.).

Poremećaji KMB u AB modelima i kod pacijenata su evidentni, i većina istraživača bi se složila da je intaktna KMB neophodna za fiziološko funkcionisanje mozga (Erickson and Banks, 2013). Međutim, da li se prvo javljaju poremećaji KMB ili A $\beta$  dovodi do njih,

još uvek je predmet debate i mnogih istraživanja. Naime, postavljena je alternativna hipoteza vaskularnoj, a to je da amiloidogeneza promoviše neoangiogenezu što dovodi do povećane propustljivosti krvnih sudova i posledičnoj hipervaskularizaciji (Biron et al., 2011; Hartz et al., 2012). U mišjem modelu Tg2576 je pokazana poremećenost čvrstih veza između endotelnih ćelija, kao posledica povećane gustine krvnih sudova, a ne apoptoze, što podržava pretpostavku da hipervaskularnost izazvana amiloidom može dalje da izazove remećenje KMB i njenu povećanu propustljivost (Biron et al., 2011). Slični rezultati su prikazani i kod AB pacijenata (Biron et al., 2011). Sa druge strane, poremećena KMB dovodi do smanjenog efluksa A $\beta$  iz mozga u krv, što dodatno povećava amiloidnu patologiju i poremećaje KMB. Deponovanje A $\beta$  u krvnim sudovima je označeno kao CAA, i prisutno je kod većine pacijenata i životinjskih modela AB. CAA doprinosi patologiji neurovaskularne jedinice uključujući hemoragiju, mikrokrvarenja, ishemiju i hemosiderozu, i smatra se da je CAA patologija izazvana uticajem A $\beta$  na KMB (Hartz et al., 2012). Naime, pokazano je da A $\beta$  dovodi do smanjene ekspresije proteina čvrstih veza, kladina-1 i kladina-5, kao i do povećane ekspresije MMP-2 i MMP-9 (Hartz et al., 2012), matriks metaloproteinaza koje regulišu stabilnost vanćelijskog matriksa i bazalne membrane u okviru KMB (Misko et al., 2002), zajedno doprinoseći povećanoj propustljivosti KMB.

#### **5.4. Uloga PICALM-a u AB**

Alchajmerova bolest je progresivna neurodegenerativna bolest asocirana sa A $\beta$  plakama, tau neurofibrilarnim klubadima, ozbiljnoj neurovaskularnoj disfunkciji i poremećajima u kogniciji (Benilova et al., 2012; Farkas and Luiten, 2001; Hardy and Selkoe, 2002; Marchesi, 2011). Kako je već pomenuto, većina slučajeva se javlja sporadično i većina bioloških mehanizama koji doprinose nastanku ili progresiji bolesti je nepoznata. Prisustvo mutacija u *PICALM* genu koji kodira fosfatidilinozitol vezujući protein koji pomaže u povezivanju klatrina (eng. *phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein*), predstavljaju faktor rizika za sporadičnu AB, kako je pokazano u nekoliko genomskih studija (eng. *genome-wide association studies*, GWAS) (Furney et al., 2011; Harold et al., 2009; Huang et al., 2017; Kunkle et al., 2019; Lambert et al., 2013; Naj et al., 2014).

U mozgu, PICALM se visoko eksprimira u endotelnim ćelijama (Ando et al., 2013; Zhao et al., 2015b), ali se nalazi i u neuronima i mikrogliji (Ando et al., 2013; Baig et al., 2010; Parikh et al., 2014). Pokazano je da ima centralnu ulogu u regulaciji unutarćelijskog prometa endocitotskih vezikula (Ishikawa et al., 2015; Merthan et al., 2019). U neuronima, PICALM igra osnovnu ulogu u regulaciji rasta aksona (Bushlin et al., 2008), kao i u regulaciji prometa sinaptičkih vezikula i receptora i asistira fuziju sinaptičkih vezikula sa presinaptičkom membranom na taj način regulišući njihovu veličinu i gustinu, i doprinoseći sinaptičkoj transmisiji (Petralia et al., 2013).

Mnogi polimorfizmi u jednom nukleotidu (SNP) blizu *PICALM*-a, od kojih je većina u ne-kodirajućem region, su identifikovani kao izuzetno asocirani sa AB, sa statističkom vrednošću nižom od  $10^{-8}$  (SNP *rs3851179*  $p=6.02 \times 10^{-25}$ , *rs541458*  $p=1.49 \times 10^{-18}$ , *rs592297*  $p=5.518 \times 10^{-10}$ , *rs10792832*  $p=6.872 \times 10^{-25}$ , *rs561655*  $p=1.90 \times 10^{-22}$ , *rs1237999*  $p=1.212 \times 10^{-20}$ , *rs543293*  $p=1.841 \times 10^{-23}$ ) (Kunkle et al., 2019; Lambert et al., 2013). Objavljeno je nekoliko studija koje su koristile strukturnu i funkcionalnu magnetnu rezonancu sa ciljem da utvrde da li genetički polimorfizmi *PICALM*-a mogu da utiču na stepen moždane atrofije ili da modulišu funkcionalnu konektivnost kod kognitivno zdravih, blago poremećenih ili pacijenata sa AB. Za SNP *rs642949 C*, koji je u pozitivnoj neravnotežnoj povezanosti (eng. *linkage disequilibrium*, LD) sa SNP *rs592297*, je pokazano da je asociran sa bržom moždanom atrofijom u desnom posteriornom cingulatnom korteksu (Xu et al., 2016), dok je SNP *rs541458 T* povezan sa smanjenom spontanom aktivnošću, naročito u okviru *default mode network* (DMN) (Zhuang et al., 2019), koje uključuju hipokampus, precuneus, medijalni prefrontalni korteks i lateralni partijetalni korteks. DMN je aktivan u stanju mirovanja, dok tokom izvođenja kognitivno zahtevnog zadatka, DMN aktivnost dramatično opada kod pacijenata AB (Montagne et al., 2016b). Dodatno, SNP *rs3851179 G* je asociran sa istanjivanjem entorinalnog korteksa (Saykin et al., 2010), dok interakcija *rs3851179 G* sa apolipoproteinom E4 (*APOE4*), najčešćim genetičkim faktorom rizika za AB, dovodi do smanjenog volumena sive mase (Morgen et al., 2014). U jednoj od naših ranijih studija smo pokazali da neuroni nastali od indukovanih pluripotentnih stem ćelija (eng. *induced pluripotent stem cell*, iPSC) koji nose *rs3851179 G* alel imaju značajno smanjen nivo PICALM proteina u poređenju sa *rs3851179 A* (Zhao et al., 2015b), što je i potvrđeno u

literaturi da SNP *rs3851179 G* dovodi do smanjene ekspresije izoforme 2 PICALM proteina u frontalnom i temporalnom korteksu (Thomas et al., 2016), ukazujući da niži nivo PICALM-a može povećati rizik za AB. Dodatno, naši preliminarni rezultati koji nisu prikazani u ovoj disertaciji su pokazali redukciju ekspresije PICALM-a u neuronima u korteksu i hipokampusu kod pacijenata AB (Braak stupanj III-IV), u poređenju sa kognitivno normalnim kontrolama, što je konzistentno sa studijom koja pokazuje niže nivoe *full-length* PICALM-a i njegovog abnormalnog isecanja kod AB pacijenata (Braak stupanj V-VI) (Ando et al., 2013). Sa druge strane, nekoliko *PICALM* SNP, *rs3851179 A*, *rs561655 G*, *rs543293 A*, *rs592297 C*, *rs1237999 G* and *rs7941541 G* su asocirani sa povećanom debljinom korteksa i povećanim volumenom hipokampusa, kao i sa sporijim stepenom atrofije desnog posteriornog cingulatnog korteksa (Biffi et al., 2010; Furney et al., 2011; Ramirez et al., 2016; Saykin et al., 2010; Xu et al., 2016; Yang et al., 2016; Zhao et al., 2015b).

Prethodni podaci su pokazali da u mišjem modelu AB, heterozigotni gubitak PICALM-a dovodi do brže AB patologije. Ova patologija se ogleda u smanjenoj eliminaciji A $\beta$  iz mozga, merenoj pomoću mikrodijalize intrasticijalne tečnosti u hipokampusu kod *Picalm*<sup>+/-</sup>;*AppSw*<sup>+0</sup> miševa. Smanjena sposobnost eliminacije A $\beta$  dovodi dalje do obilnije akumulacije A $\beta$  u mozgu i lošijim rezultatima na kognitivnim testovima u poređenju sa kontrolnim, *AppSw*<sup>+0</sup> miševima (Zhao et al., 2015b). Nakon ukrštanja *Picalm*<sup>+/-</sup>;*AppSw*<sup>+0</sup> miševa sa *Tie2-Cre* sojem i injekcijom *AAV-Flex-Picalm* virusa dolazi do specifične re-ekspresije *Picalm*-a u endotelnim ćelijama, značajno smanjene akumulacije A $\beta$  u mozgu i poboljšanja na testovima ponašanja, ukazujući na ulogu endotelnog PICALM-a u eliminaciji A $\beta$  (Zhao et al., 2015b). Pokazano je da eliminacija A $\beta$  iz mozga uključuje LRP-1 i da A $\beta$  nakon dodatka u jednoslojnoj endotelnoj ćelijskoj kulturi vezuje LRP-1 i menja konformaciju C-terminusa, što omogućava vezivanje PICALM-a za njegov C-terminalni citoplazmatski domen (motiv YXXL) sa kojim ostaje asociran tokom dugog vremenskog perioda. Kompleks PICALM-LRP-1-A $\beta$  podleže internalizaciji i regrutovanju klatrina i njegovih adaptornih proteina, nakon čega se klatrin i adaptor odvajaju, a A $\beta$  podleže transcitozi uz pomoć GTPaza, Rab5 i Rab11 (Zhao et al., 2015b).

Da bi se ispitali efekti farmakološke intervencije i povećanja ekspresije PICALM-a na nivoe A $\beta$  u još agresivnijem modelu AB (5XFAD), kreiran je *Picalm*<sup>+/-</sup>;5XFAD mišji model koji je tretiran supstancom T-65, koja je pri testiranju od više od 2000 supstanci odobrenih od strane FDA pokazala da u EA.hy926 humanim endotelnim ćelijama povećava ekspresiju *Picalm*-a 2-3 puta na genskom i proteinskom nivou. *Picalm*<sup>+/-</sup>;5XFAD miševi su tretirani 3 meseca počevši od 2 meseca starosti, kako bi se ispitala rana faza akumulacije A $\beta$  i utvrdilo da li tretman poboljšava njegovu eliminaciju. Rezultati su pokazali da farmakološki izazvana povećana ekspresija *Picalm*-a uz pomoć T-65 dovodi do smanjenog A $\beta$  nivoa u moždanom parenhimu i krvnim sudovima, i poboljšava integritet KMB. Međutim, tretman T-65 nije imao nikakvog efekta na nivo A $\beta$ , ni integritet KMB kod *Picalm*<sup>lox/lox</sup>; *Cdh5*-Cre; 5XFAD životinja koje nemaju PICALM u endotelnim ćelijama, ukazujući da je endotelni PICALM naročito odgovoran za eliminaciju A $\beta$  kroz KMB. Mehanizam kojim T-65 utiče na povećanje je nepoznat, kao ni sama genetička regulacija *Picalm* ekspresije. Neki podaci ukazuju da receptor ranog faktora rasta 1 (eng. *early growth factor receptor 1*, EGR1) može da utiče na ekspresiju *Picalm*-a, i da povećanje ekspresije ovog receptora utiče i na povećanje ekspresije PICALM-a (Koldamova et al., 2014). Pokazano je da PI3K/Akt signalni put može da utiče na regulaciju u ekspresiji EGR1 (Liu et al., 2015), ali da li je aktivacija ovog signalnog mehanizma odgovorna za efekte koje T-65 ima na PICALM, ostaje da se ispita u budućim studijama. Ovi rezultati ukazuju na važnost PICALM-a u održavanju vaskularnog integriteta i eliminacije A $\beta$  kroz KMB u cilju prevencije progresije patologije slične AB. Iako je naš tretman bio uspešan kod životinja sa ranim stupnjem  $\beta$ -amiloidoze, pre razvijanja kompletne AB patologije, stepen uspešnosti istog tretmana u životinjama starijim od 10 meseci, kada A $\beta$  patologija dostiže plato, nije za sada poznat. Buduće kliničke studije bi takođe trebalo da ispitaju efekte T-65 i kod pacijenata, naročito u ranom stupnju AB sa blagim kognitivnim poremećajem.

Iako prethodno opisani rezultati pokazuju da globalna delecija PICALM-a ubrzava patologiju AB, kao i da globalna farmakološkim putem povećana ekspresija PICALM-a utiče na smanjenje AB patologije, naše razumevanje do kog stepena pojedinačni ćelijski tipovi, naročito neuroni kojima nedostaje PICALM, doprinose patologiji AB je još uvek nepotpuno.

PICALM u neuronima reguliše internalizaciju i unutarćelijski promet APP-a, kao i enzima koji obrađuju APP,  $\beta$  i  $\gamma$  sekretaze, što utiče na modulaciju produkcije A $\beta$  (Kanatsu et al., 2014; R. S. Thomas et al., 2016; Tian et al., 2013; Xiao et al., 2012). Takođe je pokazano da u *in vitro* modelu toksičnosti A $\beta$ , povećana ekspresija PICALM-a u primarnoj ćelijskoj kulturi neurona izolovanih iz pacova umanjuje toksičnost solubilnih A $\beta$  oligomera (Treusch et al., 2011), a neki od naših prethodnih podataka, koji nisu prikazani u ovoj disertaciji, ukazuju da su PICALM-deficijentni neuroni znatno podložniji toksičnosti izazvanoj A $\beta$  oligomerima. Precizan mehanizam ove povećane osetljivosti neurona kojima nedostaje PICALM tek treba da se razjasni i biće predmet budućih ispitivanja.

Kalcijum/kalmodulin zavisna protein kinaza II (CaMKII) pripada familiji serin/treonin kinaza koje su aktivirane kalcijumom i koje su izuzetno zastupljene u mozgu, čak do 0.3% ukupnih proteina (Chia et al., 2018), od čega 1% eksprimira prednji mozak, a 2% hipokampus (Wang et al., 2013). CaMKII familija kinaza ima 4 izoforme:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$  (Bayer et al., 1999). U ranom stupnju razvića ekspimirane su samo  $\gamma$  i  $\delta$  izoforme, dok kod adulta  $\alpha$  i  $\beta$  preuzimaju glavnu ekspresiju (Miller and Kennedy, 1985). CaMKII $\alpha$  se uglavnom eksprimira u prednjem mozgu i nalazi se u citoplazmi, ali i specifičnim subćelijskim kompartmanima. Čak do 75% svih neurona u hipokampusu ekspimiraju CaMKII $\alpha$  (Wang et al., 2013). Zbog izuzetne zastupljenosti CaMKII $\alpha$  u mozgu, da bi ispitali ulogu PICALM-a u neuronima i njegov doprinos u održavanju moždane homeostaze, kreirali smo model koji ima akutni gubitak PICALM-a specifično u *Camk2a* neuronima. Ukrstili smo model koji sadrži inducibilnu Cre rekombinazu u *Camk2a* neuronima sa modelom koji ima *lox* mesta sa obe strane egzona 2 *Picalm* gena, i potvrdili gubitak PICALM-a nakon administracije tamoksifena. Naši rezultati su pokazali gubitak neurona u hipokampusu i probleme u kognitivnim testovima, čak i u odsustvu A $\beta$  patologije, što ukazuje na važnost prisustva PICALM-a u neuronima. Prethodne studije su pokazale da poremećaji u klatrin-zavisnoj endocitozi može da dovede do povećane osetljivosti ćelija na glutamatnu ekscitotoksičnost smanjenom stopom internalizacije površinskih glutamatnih receptora (Rudinskiy et al., 2009; Shi et al., 2019, 2018). S obzirom da PICALM ima krucijalnu ulogu u intraćelijskom prometu proteina i receptora (Harel et al., 2011; Maritzen et al., 2012), kao i da inhibicija transkripcije *Picalm* gena korišćenjem siRNK dovodi do nagomilavanja GluR2

subjedinice glutamatnog receptora (Harel et al., 2011), moguće je da u odsustvu PICALM-a dolazi do nagomilavanja receptora na ćelijskoj membrani, što dalje neurone čini podložnim i osetljivim za vezivanje liganda sa većim afinitetom iz okolne sredine. Glutamat je jedan od glavnih neurotransmitera ekscitatornih sinapsi (Hackett and Ueda, 2015; Lewerenz and Maher, 2015), ali u slučajevima povećane aktivacije glutamatnih receptora bilo povećanjem koncentracije glutamata u okolnoj sredini ili povećane ekspresije njegovih receptora (Lewerenz and Maher, 2015), može da dođe do ekscitotoksičnosti, oblika ćelijske smrti neurona koja se javlja u hroničnim i akutnim oboljenjima CNS-a (Meldrum and Garthwaite, 1990). Postoje 3 klase glutamatnih jonotropnih receptora: AMPA, NMDA i kainatni i nekoliko metarbotropnih receptora kuplovanih sa G proteinom (Choi, 1994; Dong et al., 2009). Nakon vezivanja glutamata za svoje receptore, dolazi do poremećaja u balansu kalcijuma, aktivacije sinteze azot monoksida, generacije slobodnih radikala, promene permeabilnosti mitohondrija, degradacije proteina, membrana i nukleinskih kiselina što vodi u progamiranu ćelijsku smrt (Dong et al., 2009). Smatra se da NMDA receptori najviše doprinose ekscitotoksičnosti (Rothstein, 1996). Kontinuirana aktivnost ovih receptora (naročito subjedinica NR1/NR2B) dovodi do povećanih koncentracija kalcijuma u ćeliji i povećanih kataboličkih aktivnosti enzima, što dalje može da aktivira kaskadu događaja dovodeći do apoptoze ili nekroze (Ndountse and Chan, 2009). AMPA receptori su takođe prepoznati u ekscitotoksičnosti i pokazano je da smanjenje GluR2 subjedinice dovodi do zaštite od neurodegeneracije (Van Damme et al., 2007). Preliminarni rezultati koji nisu prikazani u ovoj tezi su pokazali povećan nivo NR1 i GluR1 u izolovanim post-sinaptičkim gustinama (eng. *post-synaptic density*, PSD) iz *Picalm<sup>lox/lox</sup>; Camk2a-CreER* miševa. Moguće je da u odsustvu PICALM-a dolazi do nagomilavanja NMDA i AMPA receptora na površini ćelije za koje se inače vezuje glutamat u fiziološkim koncentracijama od oko 3,5  $\mu\text{M}$  (Nikolakopoulou et al., 2019), što dalje pokreće kaskadu koja vodi ekscitotoksičnosti i apoptozi (Elmore, 2007) neurona i poremećajima u ponašanju.

Dodatno, moguće je da nedostatak PICALM-a dovodi do poremećene homeostaze u šaperonima. Naime, naši preliminarani podaci koji nisu prikazani u ovoj disertaciji su pokazali da PICALM vezuje članove familije proteina toplotnog stresa 70 (eng. *heat shock protein 70*, HSP70), naročito protein regulisan glukozom 75 (eng. *glucose-regulated protein 75*, GRP75)

koji ima ulogu u uspostavljanju fizičkog kontakta između mitohondrija i endoplazmatičnog retikuluma (ER) tzv. MAM (eng. *mitochondria-associated membranes*), što ima ulogu u distribuciji kalcijuma (Honrath et al., 2018). Pokazano je i da farmakološka ili genetička inhibicija proteina GRP75 dovodi do umanjene toksičnosti nakon tretmana glutamatom (Honrath et al., 2017). Stoga, moguće je da u odsustvu PICALM-a, pored povećane ekspresije glutamatnih receptora u PSD, dolazi do povećane koncentracije GRP75 koji je u slobodnom, nevezanom stanju, dostupnom da uđe u sastav MAM, omogućujući povećan ulazak kalcijuma u mitohondrije, dovodeći do oksidativnog stresa i ćelijske smrti. Ovi predloženi mehanizmi ranjivosti neurona u odsustvu PICALM-a zahtevaju dodatna istraživanja i potvrde, a naročito u sredini koja sadrži A $\beta$ , kao što je u slučaju AB.

Povećana proteoliza adaptornih proteina kao što su  $\alpha$ - i  $\beta$ 2-adaptin, epsin 1, adaptor protein 180 i PICALM, je prisutna u ishemiji i AB (Rudinskiy et al., 2009), i pokazano je da je hidroliza  $\alpha$ - i  $\beta$ 2-subjedinica adaptornog kompleksa 2 kalpainom indukovana glutamatom i da dovodi do smanjenja klatrin zavisne endocitoze, ukazujući da kalpain može da promovise neurodegeneraciju povećanjem osetljivosti ćelija na glutamatnu ekscitotoksičnost tako što utiče na smanjenu internalizaciju receptora sa površine ćelijske membrane (Rudinskiy et al., 2009). Da li je nivo hidrolize drugih adaptornih proteina u odsustvu PICALM-a povećan, i time dodatno doprinosi gomilanju glutamatnih receptora na membrani, takođe ostaje budućim studijama da utvrde.

## 5.5. Uticaj restrikcije hrane na patologiju 5XFAD ženki miševa

Produžetak života ljudske populacije donosi i nove bolesti tipične za starenje, za koje za sada nema leka. Koncept krhkosti (eng. *frailty*) predstavlja klinički sindrom usko asociran sa starenjem koji je evoluirao na osnovu kliničkog iskustva gerijatarata. Krhkost je teško definisati jer su uzroci kompleksni i prepliću se, a smatra se da potiču iz uzajamnog dejstva genetičkih, bioloških, fizioloških, psiholoških, socioloških i sredinskih faktora (Fulop et al., 2010). Krhkost je nespecifično stanje ranjivosti organizma, koje se ogleda u mnogim fiziološkim promenama, koje ne dovode uvek do bolesti čak ni kod starih ljudi. Smatra se da ne samo fizički, već i psihološki, kognitivni i socijalni faktori doprinose ovom sindromu i

moraju se uzeti u obzir u njegovom definisanju i tretmanu. Generalno je prihvaćeno da u starenju dolazi do smanjenja funkcionalnih rezervi i pada sposobnosti adaptacije na bilo kakve izvore stresa (čak i u odsustvu spoljašnjeg stresa), što dovodi do toga da su krhki stariji ljudi pod visokim rizikom pada fizičkih i kognitivnih sposobnosti, invalidnosti i smrti. Smatra se da je glavni doprinos krhkosti povišena sistemska inflamacija (Fulop et al., 2010). Alchajmerova bolest je jedna od bolesti koja se pojavila kao posledica produženog životnog veka i predviđa se da će u narednoj deceniji oko 15 miliona ljudi oboleti od AB (Barnard et al., 2014). Pokazano je da je kod pacijenata povećan stepen krhkosti u pozitivnoj korelaciji sa depozitom A $\beta$  (Maltais et al., 2019), ali i sa drugim biomarkerima AB (Wallace et al., 2018).

Restrikcija ili modifikacija ishrane se praktikuje kao metod za produženje dužine i kvaliteta života već više od 500 godina (Speakman and Mitchell, 2011). Restrikcija hrane je oduvek bila predmet fascinacije i izučavanja, i još je početkom 20. veka pronađena korelacija između količine i sastava obroka sa dijabetesom i gojaznosti kod ljudi (Modern and Johnson, 1928; Spriggs, 1916), a ubrzo su započela i istraživanja na životinjama (McCay, 1947). Ovaj vid intervencije predstavlja verovatno najjednostavniji način da se poboljša zdravlje i odlože bolesti koje su inače javljaju u starenju i dan danas je popularan u mnogim kulturama širom sveta. Postoji više tipova restrikcije hrane, a najviše su izučene kalorijska restrikcija i intermitentno gladovanje (Anson et al., 2003). Kalorijska restrikcija obuhvata ili izmenjeni sastav hrane ili smanjeni unos, dok intermitentno gladovanje obuhvata pravljenje velike pauze između obroka. Najčešći oblik intermitentnog gladovanja je potpuno oduzimanje hrane svakog drugog dana, dok je u toku ostalih dana hrana dostupna ili u neograničenim količinama (lat. *ad libitum*) ili u određenim smanjenim količinama (Speakman and Mitchell, 2011).

Brojna istraživanja su pokazala protektivne efekte dugotrajne restrikcije hrane na starenje i patologiju kod mnogih organizama (Fontana and Partridge, 2015). Intermitentni režim restrikcije hrane tipa ishrane svakog drugog dana (eng. *every-other-day*, EOD) je u prethodnim studijama jasno pokazao poboljšanje u sinaptičkoj plastičnosti tokom starenja (Mladenovic Djordjevic et al., 2010; Singh et al., 2012), kao i kogniciji nakon ishemične i ekscitotoksične povrede (Anson et al., 2003; Fann et al., 2014; Kaur et al., 2008; Parinejad

et al., 2009; Sharma and Kaur, 2005). Iako su efekti EOD režima pokazali redukciju inflamacije i oksidativnog stresa u mozgu i povećanu produkciju neurotrofičkih faktora kao što je neurotrofički faktor poreklom iz mozga (Martin et al., 2006), skorašnja studija je pokazala da produženje dužine života usled EOD-a, može pre biti objašnjeno odlaganjem neoplastičnih poremećaja, nego generalnog usporavanja procesa starenja (Xie et al., 2017). U životinjskim modelima AB je pokazano da EOD povećava stopu uklanjanja A $\beta$  iz mozga kod APP/PS1 miševa indukujući promene polarosti akvaporin 4 proteina (Zhang et al., 2017), dok je druga studija na 3xTgAD miševima pokazala da EOD indukuje poboljšanje kognitivnih performansi bez uticaja na nivo A $\beta$  ili tau proteina (Halagappa et al., 2007). Podaci o efektu EOD na nivo tau proteina takođe nisu u saglasnosti u istraživanjima na različitim modelima AB (Brownlow et al., 2014; Dhurandhar et al., 2013), što zajedno ukazuje da životinjski soj, kao i tip i obim već postojeće patologije mogu u značajnoj meri da utiču na ishod EOD.

Za izradu ove teze je odabrano intermitentno gladovanje kao restriktivni režim ishrane, koji je popularan u mnogim kulturama i religijama (npr. za vreme posta) i generalno obuhvata duge periode gladovanja između obroka. Konkretno, odabran je tip ishrane svaki drugi dan (EOD), u trajanju od 4 meseca i ispitani su efekti ovog tipa ishrane na patologiju Alchajmerove bolesti u 5XFAD mišijem transgenom modelu. Promene su praćene kod ženki 5XFAD miševa zbog veće prevalencije AB u humanoj populaciji kod žena u odnosu na muškarce (Schmidt et al., 2008). Najpre su ispitani efekti EOD na količinu i raspored plaka, i rezultati ove teze su pokazali, za razliku od prethodnih studija u kojima EOD dovodi do smanjenja nivoa plaka (Zhang et al., 2017), da EOD nema efekta na količinu amiloidnih plaka, kao i na ukupni nivo A $\beta$ 42 u korteksu i hipokampusu 5XFAD miševa. U prilog našim rezultatima ide studija na 3xTg-AD miševima gde je pokazano da EOD nije promenila nivo A $\beta$ , ni tau proteina (Halagappa et al., 2007). Razlog za suprotstavljene nalaze u našoj studiji i studiji na 3xTg-AD miševima u poređenju sa studijom na APP/PS1 modelu, može biti različit stepen AB patologije u ovim modelima AB, različita starost životinja kada je restrikcija hrane započeta, kao i tip i dužina trajanja restrikcije hrane. 5XFAD miševi imaju bržu i izraženiju amiloidnu patologiju od ostalih modela i moguće je da je EOD režim uveden prekasno. U tezi su korišćene samo ženke jer su neki podaci pokazali da ženke 5XFAD

miševa bolje reaguju na tretmane i intervencije, kako farmakološke i primenu suplemenata, tako i genetičke manipulacije (Bhattacharya et al., 2014; Devi et al., 2010; Dinkins et al., 2015; Fragkouli et al., 2014; Sadleir et al., 2015). Nasuprot ovome, skoro je pokazano da mužjaci APP/PS1 miševa znatno bolje reaguju od ženki na tretman antibiotika koji dovodi do izmena u crevnoj mikroflori, smanjenja amiloidnih plaka i glioze. Slični rezultati samo na mužjacima su pokazani kada je izvršena transplantacija fekalnih peleta iz mužjaka tretiranih antibiotikom u mužjake koji nisu prethodno tretirani, ukazujući tako na važnu ulogu mikrobioma u modulaciji amiloida i mikroglije (Dodiya et al., 2019). S obzirom da postoje značajne razlike između ishodatretmana između mužjaka i ženki, odsustvo mužjaka u ovim eksperimentima takođe može, bar delimično, biti uzrok suprotstavljenim rezultatima prethodno objavljenih studija.

5XFAD miševi počevši od 4 meseci starosti imaju izuzetno narušenu KMB, što je pokazano smanjenjem broja pericita, i povećanoj propustljivosti (Giannoni et al., 2016; Kook et al., 2012; Lazic et al., 2019; Park et al., 2017). Rezultati su nakon restrikcije hrane prvi put pokazali da EOD nije imala uticaj na prekrivenost kapilara pericitima, kao ni na propustljivost IgG u moždani parenhim, što zajedno ukazuje da stabilnost KMB nije promenjena nakon EOD. Kako A $\beta$  može da dovede do poremećaja KMB (Hartz et al., 2012), odsustvo promena u propustljivosti pod EOD režimom nije iznenađujuće i može se objasniti odsustvom promena u nivou A $\beta$ .

Intaktna tkivna homeostaza je izuzetno važna da se održi optimalna funkcija nervnih ćelija, koje su veoma osetljive i na najmanje promene okolne sredine. Mnoge ćelije mozga, kao i krvni sudovi, imaju upravo ulogu da obezbede neuronima odgovarajuće uslove za njihovo funkcionisanje. Mikroglijske ćelije su jedne od prvih ćelija koje reaguju na potencijalnu „opasnost“. Tranzicija od mirujuće mikroglije do aktivirane je precizno regulisana i izazvana različitim egzogenim (npr. CD200, CX3CR1 and TREM2) ili endogenim signalima (npr. Runx-1, Irf8 i Pu. 1) (Kierdorf and Prinz, 2013). U fiziološkim uslovima, čak i male promene ovih signala su dovoljne da izazovu fatalnu poremećanu homeostazu mikroglijskih ćelija i izazovu ozbiljnu patologiju CNS-a. Aktivacija egzogenim signalima je posredovana receptorima na ćelijskoj površini mikroglijske membrane. Većina molekula na površini mikroglije pripada familiji citokinskih receptora, receptora čistača (eng.

*scavenger*) i receptora koji prepoznaju određeni obrazac (eng. *pattern recognition receptors*, PRPs), kao i hemokinski receptori koji prepoznaju pro-inflamatorne medijatore prilikom inflamacije ili infekcije. Većina ovih receptora vezuje ligande koji su sekretovani ili se ekspimiraju na membrani zdravih neurona, i njihova aktivacija rezultuje u brzom aktivaciji „mirujuće mikroglije“ u pokretne ćelije koje dodatno doprinose postojećoj inflamaciji (Kierdorf and Prinz, 2013). Jedino mali broj molekula tzv. „inhibitorni molekuli“ na površini mikroglije, nakon vezivanja za svoje ligande, ne dovode do pro-inflamatorne aktivacije (Ransohoff and Perry, 2009). Endogeni signali koji kontrolišu aktivaciju mikroglije su različiti transkripcioni faktori koji imaju dodatne ključne uloge u regulaciji diferencijacije tokom embriogeneze. Većina studija je zabeležila anti-inflamatorne efekte gladovanja (Fann et al., 2014; Faris et al., 2012; Johnson et al., 2007; Lavin et al., 2011; Loncarevic-Vasiljkovic et al., 2012; Shojaie et al., 2017; Vasconcelos et al., 2014). Naši rezultati su takođe pokazali anti-inflamatorne efekte zabeležene smanjenom ekspresijom GFAP, markera astrocita u korteksu ne-transgenih životinja nakon EOD. Međutim iznenađujuće, EOD režim je rezultovao u dodatnom izuzetnom porastu kortikalne inflamacije 5XFAD miševa. Neke studije su zabeležile slične efekte u modelu Poly(I:C) tretmana, gde je pokazano da intermitentno gladovanje dovodi do još više izražene inflamacije i pogoršanja u ponašanju C57BL6 miševa (Zenz et al., 2019), zatim da kalorijska restrikcija ima negativne efekte na broj NK ćelija kod miševa i da stari miševi imaju pojačan odgovor na tretman Poly (I:C), poznat stimulator NK ćelija (Weindruch et al., 1983).

Suprotstavljajući rezultati su takođe prijavljeni i za druge tipove FR, naročito povodom dužine života i kognitivnih deficita (Ingram and de Cabo, 2017; Sohal and Forster, 2014). Naime, pokazano je da je FR štetna u veoma ranom ili veoma kasnom životnom dobu (Cardoso et al., 2016; Forster et al., 2003; Todorovic et al., 2018), kao i da pol i čak najmanje genetičke razlike imaju značajnu ulogu u dostizanju protektivnih efekata čak i u okviru iste vrste (Sohal et al., 2009). Postoje takođe dokazi da FR može da pogorša toksičnost nekih jedinjenja (Seki et al., 2000), smanji rezistenciju na infekciju (Gardner, 2005; Goldberg et al., 2015; Kristan, 2018; Sun et al., 2001), kao i da oduži proces zarastanja rana (Hunt et al., 2012). Brojni negativni efekti su takođe zabeleženi kod ljudi koji praktikuju FR uključujući smanjeni krvni pritisak, hormonalni disbalans, osteoporozu, izmenjenu osetljivost na hladno,

gubitak snage i razvoj psiholoških problema kao što su depresija i disforija (Dirks and Leeuwenburgh, 2006), što implicira da FR fenomen ima selektivne, a ne univerzalne efekte. Dodatno, FR može vrlo lako da dovede do neuhranjenosti koja je zajedno sa imunokompromitovanosti u direktnoj vezi sa povećanim rizikom od post-operativnih komplikacija, rizikom od infekcije, i povećanim stepenom smrtnosti kod pacijenata (Thomas et al., 2016; Waitzberg et al., 2001). Zbog toga, dužina, životno doba u kome se primenjuje i stepen striktnosti FR su identifikovani kao glavni faktori koji određuju finalni molekularni, bihevioralni i funkcionalni ishod (Mattson et al., 2017; Sohal and Forster, 2014; Todorovic et al., 2018).

Jedna studija je identifikovala intermitentno gladovanje kao povoljan stres (eng. *eustress*) i pokazala da za razliku od nepovoljnog stresa (eng. *distress*), IF ima efekte u smanjenju inflamacije indukovane distresom (Shojaie et al., 2017). Distres (u ovom slučaju električni šok) je, kao i IF značajno povećao nivo kortikosterona (CORT) u krvnoj plazmi, međutim, IF zajedno sa distresom je dovelo do značajnog smanjenja kortikosterona, ukazujući da se dve različite vrste stresa međusobno mogu neutralisati (Shojaie et al., 2017). IF je dodatno dovela do smanjenja IL-6 i TNF- $\alpha$ , proinflamatornih citokina koji mogu da stimulišu hipotalamo-hipofizno-adrenalnu osu (eng. *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*, HPA) i povećaju nivo CORT-a, koji dodatno doprinosi neuroinflamaciji i kognitivnim poremećajima (Kelly et al., 2012). Fizička aktivnost je još jedan vid povoljnog stresa, međutim, kratkotrajno vežbanje dovodi do povećanja CORT-a, dok hronično vežbanje dovodi do njegovog smanjenja, što je važno uzeti u obzir prilikom evaluacije povoljnih efekata različitih stresora (Hare et al., 2014). U slučaju robustne patologije, kao što je prisutna u 5XFAD miševima, moguće je da povoljan stresor deluje kao negativan. Opisana studija je jedan od primera hormezisa, teorije tolerancije restrikcije hrane (Calabrese and Mattson, 2017). Hormezis efekti restrikcije hrane, naročito kao preventivne metode kod starenja i patologije, obuhvataju sposobnost organizma da se navikne na blagi nivo stresa i tako pripremi za veliki stres. U modelu izučavanom u ovoj tezi, koji već ima značajnu patologiju i pre početka restrikcije hrane, princip hormeze verovatno nije bio moguć. 5XFAD miševi su u konstantnoj borbi sa postojećom patologijom, koja je izuzetno robustna, za šta im treba više energije u poređenju sa ne-transgenim kontrolama. Naročito u danima kada hrana (i energija)

nisu dostupni, postojeće rezerve su limitirane da bi se organizam izborio sa patologijom. Zbog toga, stres izazvan nedostatkom energije, dovodi do još povećane inflamacije kao deo imunskog odgovora na već postojeće stresore. Sličan odgovor imunskog sistema tokom IF je i ranije prijavljen u starenju, ali i u uslovima akutne inflamacije (Weindruch et al., 1983; Zenz et al., 2019).

Predloženo je da su povoljni efekti FR zavisni od metaboličkog stanja organizma (Sacher, 1977). Imbalans između preuzimanja energije i potrošnje energije u uslovima povećanih zahteva za energijom, mogu time da ograniče održavanje telesne homeostaze. Negativni balans energije izazvan FR je asociran sa povećanom podložnosti bolestima (Dorighello et al., 2014; Hamadeh et al., 2018). Hronična inflamacija predstavlja jedan od faktora koji su uključeni u kontrolu potrošnje energije. Aktivacija neuroinflamacije je jedan od centralnih i ključnih koraka u patogenezi AB (Heneka et al., 2015), i naši rezultati pokazuju da EOD režim dodatno promoviše inflamaciju u mozgu 5XFAD miševa. U prethodnim istraživanjima je naime pokazano da smanjena inflamacija može imati povoljne efekte na zdravlje neurona (Spangenberg et al., 2016) i da EOD utiče povoljno na ponašanje životinja (Halagappa et al., 2007), čak i bez promene u broju plaka. U našoj studiji EOD izaziva povećanu inflamaciju, takođe bez promene u broju plaka. Moguće je da inflamacija deluje nezavisno na nekoliko signalnih puteva koji sinergistički doprinose deficitima u sinaptičkoj plastičnosti i povredi neurona. Prethodne studije su pokazale da TNF $\alpha$  može da aktivira p38 MAPK signalnu transdukciju u mikrogliji ili drugim ćelijama CNS-a (astrociti i neuroni), koja povratno aktivira p38 MAPK i otpuštanje proinflamatornih citokina iz mikroglije, formirajući pozitivnu povratnu spregu, što dalje doprinosi progresiji i ozbiljnosti bolesti (Bachstetter and Van Eldik, 2010). Dodatno, aktivirana p38 MAPK može direktno da izazove sinaptičku disfunkciju u AB (Lee and Kim, 2017). Imbalans u GABAergičkim and glutamatergičkim sinapsama može takođe da bude posledica neuroinflamacije (El-Ansary and Al-Ayadhi, 2014), jer TNF $\alpha$  indukuje brzo i uporno smanjenje jačine inhibitornih sinapsi (Pribrag and Stellwagen, 2013), i time reguliše homeostazu nervnih mreža pogoršavajući ekscitotoksično oštećenje rezultujući u nervnoj povredi (Stellwagen et al., 2005). Još jedna važna komponenta inflamacije je nuklearni faktor kapa B (NF $\kappa$ B), i pokazano je da je NF $\kappa$ B ključni faktor uključen u indukciju ekspresije EAAT2 i njegove transportne sposobnosti

(Ghosh et al., 2011). Zbog toga, povećana ekspresija EAAT2 u 5XFAD-EOD eksperimentalnoj grupi može biti zbog povećanog inflamatornog odgovora. EOD je u ne-transgenim 5XFAD miševima dovela do povećanja ekspresije sinaptičkih markera, GAP43 i PSD95, kao što je bilo i očekivano na osnovu prethodnih studija (Mladenovic Djordjevic et al., 2010). Međutim, kod 5XFAD miševa je dovela do drastičnog smanjenja u ovim, ali i drugim ispitanim pre- i post-sinaptičkim markerima. Ne samo to, već je dovela i do gubitka neurona i povećanja distrofičnih neurita kod 6 meseci starih 5XFAD životinja, koji na normalnoj ishrani većinom nemaju gubitak neurona (Eimer and Vassar, 2013).

Tačan mehanizam koji stoji iza povećane inflamacije i povrede neurona nakon EOD je nepoznat. Da bi se objasnilo povećanje već postojeće inflamacije kod 5XFAD miševa, buduće studije bi trebalo da ispituju važnu kariku koja povezuje dijetalnu restrikciju sa neuroinflamacijom, tj. da odgovore na pitanje kako EOD signalizira imunskom sistemu da se aktivira. Jedan od mehanizama može da uključuje nivo grelina i leptina u cirkulaciji (Demas and Sakaria, 2005; Dixit et al., 2004), ali i CORT. Povećana inflamacija zatim može da deluje na smanjenje nivoa neurotrofičkih faktora koji su ključni za moždanu plastičnost kao što je BDNF (Zhang et al., 2016), i da ovo redukuje interakciju sa njegovim TrkB receptorom. Pokazano je da disfunkcionalni TrkB pogoršava memoriju bez uticaja na  $\beta$ -amiloidozu, ali pogoršava i procese koji su  $A\beta$ -zavisni što uključuje deficitarne CREB- i Akt-posredovane signalizacije i povećanje NMDAR2B nivoa (Devi and Ohno, 2015). Dalje je moguće da EOD utiče na oksidativni stres, hormonski imbalance, promene u moždanom protoku krvi ili modifikujući postojeći mikrobiom u gastrointestinalnom traktu, ali dodatna istraživanja su neophodna da bi se testirale ove hipoteze.

Naši rezultati po prvi put pokazuju u životinjskom modelu da EOD ima nepovoljne efekte u korteksu 5XFAD miševa, što je suprotno od široko prihvaćenih, prethodno objavljenih studija, koje su pokazale protektivne efekte dijetalne restrikcije na neurone i sinapse tokom starenja (Guo et al., 2000; Mladenovic Djordjevic et al., 2010), ali i od naših rezultata sa ne-transgenim životinjama. Iako uzročno-posledična veza između EOD i progresije bolesti se ne može utvrditi na osnovu ove studije, rezultati sugerišu sledeće: najpre da 5XFAD mišji model možda nije najbolji model za studiranje EOD-a, jer samo u nekoliko aspekata imitira AB kod ljudi, a brzina kojom se razvija amiloidna patologija svakako nije

jedan od njih; i dodatno, da odluku o korišćenju EOD kod pacijenata AB treba pažljivo doneti. Kako je već istaknuto, nekoliko faktora doprinose riziku razvoja kasnog oblika AB, uključujući starenje, genetičke faktore (naročito APOEε4 alel), porodičnu istoriju, povredu glave, hipertenziju u srednjem dobu, gojaznost, dijabetes i hiperholesterolemiju (Bendlin et al., 2010; Nelson et al., 2016). Nekoliko studija su pokazale da su izvesni dijetalni i faktori životnog stila, uključujući unos zasićenih masti, vitamina E i fizička aktivnost asocirani sa smanjenim rizikom od AB, sugerišući da preventivne strategije mogu biti primenjene za ove faktore. Nažalost, naučni dokazi su nekompletni. Buduće studije efekata EOD na AB patologiju su neophodne da bi se odredio stepen EOD-a, trajanje, starosno doba kada se započinje, kao i upotreba pre ili nakon pojave simptoma, da bi se postiglo optimalno zdravlje, promovisala nervna rezistencija na povredu i smanjilo oštećenje mozga, kao i da bi osobe sa rizikom od nastanka AB imale mogućnost da donesu odluku o dijetalnim i drugim faktorima životnog stila bazirajući se na dokazima koji su im dostupni, čak i kada naučni konsenzus nije postignut (Barnard et al., 2014).

## 6. ZAKLJUČAK

Ova doktorska disertacija je pružila dublji uvid u značaj fiziološki adekvatne strukture i funkcije KMB, koja je narušena u mnogim bolestima i patološkim stanjima, kao i kod pacijenata i životinjskih modela AB. Pokazano je dalje da PICALM, pored opšte uloge u regulaciji endocitoze, u endotelnim ćelijama i neuronima ima naizgljed odvojene uloge, u endotelnim ćelijama ima ulogu u izbacivanju A $\beta$ , dok u neuronima ima ulogu u održavanju homeostaze, a da gubitak PICALM-a iz neurona utiče negativno na kognitivne sposobnosti. Zatim je pokazano da restrikcija hrane tipa intermitentne ishrane može da ima negativne efekte i da pogoršava patologiju AB. Na osnovu dobijenih rezultata u ovoj tezi, mogu se izvesti sledeći specifični zaključci:

- 1. Genetičke mutacije ili heterozigotni gubitak PDGFR $\beta$  receptora dovode do smanjenja broja pericita koji prekrivaju kapilare KMB mozga.** Gubitak pericita kod životinja koje nose 7 mutacija u PDGFR $\beta$  receptoru, *Pdgfr $\beta$ <sup>F7/F7</sup>*, je većih razmera nego kod životinja koje imaju heterozigotni gubitak PDGFR $\beta$  receptora, kao što su *Pdgfr $\beta$ <sup>+/-</sup>* životinje.
- 2. Periciti imaju ključnu ulogu u održavanju fiziološke homeostaze mozga i njihov gubitak dovodi do poremećaja u nekim motoričkim i kognitivnim testovima ponašanja.**
  - 2a. Gubitak pericita ne dovodi do promena na testu otvorenog polja koji meri opštu pokretljivost, aktivnost i anksioznost, kao ni na senzomotorim testovima, kao što su hodanje po gredi i uklanjanje adheziva kod 5-7 meseci starih *Pdgfr $\beta$ <sup>F7/F7</sup>*.
  - 2b. Gubitak pericita kod 5-7 meseci starih *Pdgfr $\beta$ <sup>F7/F7</sup>* miševa dovodi do deficita u rotarod testu četvrtog dana testiranja.
  - 2c. *Pdgfr $\beta$ <sup>F7/F7</sup>* miševi starosti 3-4 i 9-12 meseci pokazuju deficite u testu trčanja na kompleksnom točku, za razliku od *Pdgfr $\beta$ <sup>F7/F7</sup>* miševa starosti 4-6 nedelja. *Pdgfr $\beta$ <sup>F7/F7</sup>*

miševi ne pokazuju deficite u testu trčanja na običnom točku ni u jednoj ispitanoj starosnoj grupi.

2d. *Pdgfr* $\beta^{F7/F7}$  miševi starosti 3-4 meseca prave značajno više grešaka u odabiru kraka u radijalnom lavirintu i time pokazuju deficite u testu prostorne memorije već sedmog dana testiranja.

2e. *Pdgfr* $\beta^{F7/F7}$  miševi starosti 5-7 meseci ne pokazuju deficite u memoriji 24 h nakon izlaganja električnom šoku u testu kontekstualnog uslovljavanja straha, međutim pokazuju blage ali značajne deficite u memoriji dve nedelje nakon izlaganja električnom šoku.

3. **Gubitak pericita dovodi do gubitka bele mase.** Kod *Pdgfr* $\beta^{F7/F7}$  životinja dovodi do stanjivanja *corpus callosum*-a već od 3-4 meseca starosti i do značajnog smanjenja ekspresije mijelin baznog proteina i SMI312, markera neurofilamenata. Pad ekspresije MBP i SMI312 je dodatno izražen u starijoj grupi *Pdgfr* $\beta^{F7/F7}$  životinja od 9-12 meseci starosti. Promena u ekspresiji MBP i SMI312 proteina nije zabeležen kod životinja starih 4-6- nedelja.

4. **Akutni gubitak pericita kod adultnih životinja ima negativne posledice na moždanu homeostazu.**

4a. Strategija duplog promotora *Pdgfr* $\beta$  i *Cspg4*, zajedno sa ekspresijom iDTR receptora i tretmana sa DT, omogućava akutnu i specifičnu deleciju pericita, koja se detektuje već trećeg dana tokom administracije DT.

4b. Akutni gubitak pericita dovodi do gubitka neurita i smrti neurona u korteksu i hipokampusu 15 dana nakon DT-a kod Pericit-Cre miševa.

4c. Akutni gubitak pericita 15 dana nakon DT-a dovodi do problema u kratkotrajnoj memoriji detektovanoj testom prepoznavanja lokacije novog objekta i dugotrajnoj

memoriji u testu kontekstualnog uslovljavanja straha 24 h nakon izlaganja električnom šoku.

4d. iDTR nije eksprimiran bez prisustva Cre rekombinaze i tretman miševa koji nose iDTR toksinom difterije ne dovodi do smrti pericita i time ne dovodi do promena u krvnim sudovima, broju neurona i ponašanju.

**5. Transgeni modeli AB imaju povećanu propustljivost KMB i funkcionalne poremećaje pre gubitka neurona.**

5a. Tg2576 miševi starosti 12-13 meseci i 25-28 meseci i 3xTg miševi starosti 18-20 meseci sadrže viši nivo IgG u moždanom parenhimu u poređenju sa njihovim ne-transgenim kontrolama.

5b. 5XFAD miševi 6-7 meseci starosti imaju narušenu KMB, što je pokazano curenjem fibrinogena i IgG-a izvan krvnih sudova u moždani parenhim, kao i smanjenom ekspresijom i PDGFR $\beta$  receptora u ukupnom kortikalnom homogenatu i smanjenoj prekrivenosti kapilara pericitima. Zabeležena je i akumulacija hemosiderina u korteksu ovih životinja, takođe ukazujući na povećanu propustljivost KMB.

5c. 5XFAD miševi 7 meseci starosti pokazuju deficite u funkcionalnim testovima kao što je moždani protok krvi i nekim od testova ponašanja. Ove životinje ne pokazuju deficite u testu iskopavanja peleta, ali imaju deficite u pravljenju gnezda i testu zakopavanja klikera, ukazujući na delimične probleme u svakodnevnom ponašanju karakterističnom za vrstu. Ove životinje takođe pokazuju probleme u memoriji u testovima prepoznavanja nove lokacije objekta i kontekstualnog uslovljavanja straha.

**6. PICALM protein ima značajnu ulogu u endotelnim ćelijama KMB u eliminaciji A $\beta$  i održanju homeostaze neurona.**

6a. Povećana ekspresija PICALM-a u endotelnim ćelijama KMB pomoću farmakološkog agensa, T-65, dovodi do smanjenja količine A $\beta$  u moždanom parenhimu, kao i u zidovima krvnih sudova kod 5 meseci starih *Picalm*<sup>+/-</sup>; 5XFAD miševa.

6b. Povećanje ekspresije PICALM-a kod 5 meseci starih *Picalm*<sup>+/-</sup>; 5XFAD miševa nakon tretmana sa T-65 dovodi do smanjene propustljivosti KMB.

6c. Gubitak PICALM proteina specifično iz endotela krvnih sudova kod *Picalm*<sup>lox/lox</sup>; *Cadh-Cre*; 5XFAD životinja onemogućava dejstvo supstance T-65, pri čemu nakon tretmana sa T-65 ne dolazi do promena u zastupljenosti A $\beta$  u moždanom parenhimu i zidovima krvnih sudova.

6d. Specifična delecija egzona 2 *Picalm* gena dovodi do gubitka PICALM-a iz Camk2a-pozitivnih neurona i dovodi do smanjenja broja nervnih ćelija i njihovih nastavaka u hipokampusu, kao i do problema u memoriji i u testovima prepoznavanje novog objekta, nove lokacije objekta i kontekstualno uslovljavanje straha.

**7. EOD restriktivni režim primenjen kao preventivni tretman u prodromalnoj fazi AB ima nepovoljne posledice na patologiju AB kod ženki 5XFAD miševa starosti 6 meseci.**

7a. EOD nije doveo do promene broja amiloidnih plaka ni zastupljenosti ukupnog A $\beta$ 42 u korteksu i hipokampusu, kao ni do promena u prekrivenosti kapilara pericitima, zastupljenosti proteina PDGFR $\beta$ , kao ni u nivou IgG u moždanom kortikalnom parenhimu.

7b. EOD režim je rezultovao u povećanju kortikalne inflamacije koja se ogleda u povećanju ekspresije glijskih markera GFAP i Iba1, kao i ekspresije pro-inflamatornog TNF $\alpha$  i p38 MAPK.

7c. EOD režim je doveo do pada ekspresije markera sinaptičke plastičnosti GAP43, PSD95, sinaptofizina i aducina, kao i do gubitka nervnih ćelija i povećanog broja distrofičnih neurita.

## 7. LITERATURA

- Akassoglou, K., Adams, R.A., Bauer, J., Mercado, P., Tseveleki, V., Lassmann, H., Probert, L., Strickland, S., 2004. Fibrin depletion decreases inflammation and delays the onset of demyelination in a tumor necrosis factor transgenic mouse model for multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 6698–6703.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0303859101>
- Alshabi, A.M., BasavarajVastrad, Shaikh, I.A., Vastrad, C., 2019. Exploring the Molecular Mechanism of the Drug-Treated Breast Cancer Based on Gene Expression Microarray. *Biomolecules* 9. <https://doi.org/10.3390/biom9070282>
- Alzheimer's Association, 2011. 2011 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* 7, 208–244. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.02.004>
- Ando, K., Brion, J.-P., Stygelbout, V., Suain, V., Authelet, M., Dedecker, R., Chanut, A., Lacor, P., Lavaur, J., Sazdovitch, V., Rogaeva, E., Potier, M.-C., Duyckaerts, C., 2013. Clathrin adaptor CALM/PICALM is associated with neurofibrillary tangles and is cleaved in Alzheimer's brains. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 125, 861–878.  
<https://doi.org/10.1007/s00401-013-1111-z>
- Anson, R.M., Guo, Z., Cabo, R. de, Iyun, T., Rios, M., Hagepanos, A., Ingram, D.K., Lane, M.A., Mattson, M.P., 2003. Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 6216–6220.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1035720100>
- Armulik, A., Genové, G., Betsholtz, C., 2011. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev. Cell* 21, 193–215.  
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.07.001>
- Armulik, A., Genové, G., Mäe, M., Nisancioglu, M.H., Wallgard, E., Niaudet, C., He, L., Norlin, J., Lindblom, P., Strittmatter, K., Johansson, B.R., Betsholtz, C., 2010. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature* 468, 557–561.  
<https://doi.org/10.1038/nature09522>
- Arumugam, T.V., Phillips, T.M., Cheng, A., Morrell, C.H., Mattson, M.P., Wan, R., 2010. Age and energy intake interact to modify cell stress pathways and stroke outcome. *Ann. Neurol.* 67, 41–52. <https://doi.org/10.1002/ana.21798>
- Bachstetter, A.D., Van Eldik, L.J., 2010. The p38 MAP Kinase Family as Regulators of Proinflammatory Cytokine Production in Degenerative Diseases of the CNS. *Aging Dis.* 1, 199–211.
- Baig, S., Joseph, S.A., Tayler, H., Abraham, R., Owen, M.J., Williams, J., Kehoe, P.G., Love, S., 2010. Distribution and expression of picalm in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 69, 1071–1077.  
<https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181f52e01>
- Barnard, N.D., Bush, A.I., Ceccarelli, A., Cooper, J., de Jager, C.A., Erickson, K.I., Fraser, G., Kesler, S., Levin, S.M., Lucey, B., Morris, M.C., Squitti, R., 2014. Dietary and lifestyle guidelines for the prevention of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 35, S74–S78. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.033>

- Basun, H., Bogdanovic, N., Ingelsson, M., Almkvist, O., Näslund, J., Axelman, K., Bird, T.D., Nochlin, D., Schellenberg, G.D., Wahlund, L.-O., Lannfelt, L., 2008. Clinical and neuropathological features of the arctic APP gene mutation causing early-onset Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 65, 499–505.  
<https://doi.org/10.1001/archneur.65.4.499>
- Bateman, R.J., Aisen, P.S., De Strooper, B., Fox, N.C., Lemere, C.A., Ringman, J.M., Salloway, S., Sperling, R.A., Windisch, M., Xiong, C., 2011. Autosomal-dominant Alzheimer's disease: a review and proposal for the prevention of Alzheimer's disease. *Alzheimers Res. Ther.* 3, 1. <https://doi.org/10.1186/alzrt59>
- Bayer, K.U., Löhler, J., Schulman, H., Harbers, K., 1999. Developmental expression of the CaM kinase II isoforms: ubiquitous gamma- and delta-CaM kinase II are the early isoforms and most abundant in the developing nervous system. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 70, 147–154. [https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(99\)00131-x](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(99)00131-x)
- Bell, R.D., Winkler, E.A., Sagare, A.P., Singh, I., LaRue, B., Deane, R., Zlokovic, B.V., 2010. Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging. *Neuron* 68, 409–427.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.09.043>
- Bell, R.D., Winkler, E.A., Singh, I., Sagare, A.P., Deane, R., Wu, Z., Holtzman, D.M., Betsholtz, C., Armulik, A., Sallstrom, J., Berk, B.C., Zlokovic, B.V., 2012. Apolipoprotein E controls cerebrovascular integrity via cyclophilin A. *Nature* 485, 512–516. <https://doi.org/10.1038/nature11087>
- Bendlin, B.B., Carlsson, C.M., Gleason, C.E., Johnson, S.C., Sodhi, A., Gallagher, C.L., Puglielli, L., Engelman, C.D., Ries, M.L., Xu, G., Wharton, W., Asthana, S., 2010. Midlife predictors of Alzheimer's disease. *Maturitas* 65, 131–137.  
<https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2009.12.014>
- Benilova, I., Karran, E., De Strooper, B., 2012. The toxic A $\beta$  oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat. Neurosci.* 15, 349–357.  
<https://doi.org/10.1038/nn.3028>
- Bhattacharya, S., Haertel, C., Maelicke, A., Montag, D., 2014. Galantamine slows down plaque formation and behavioral decline in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *PloS One* 9, e89454.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089454>
- Biffi, A., Anderson, C.D., Desikan, R.S., Sabuncu, M., Cortellini, L., Schmansky, N., Salat, D., Rosand, J., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI), 2010. Genetic variation and neuroimaging measures in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 67, 677–685. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2010.108>
- Biron, K.E., Dickstein, D.L., Gopaul, R., Jefferies, W.A., 2011. Amyloid Triggers Extensive Cerebral Angiogenesis Causing Blood Brain Barrier Permeability and Hypervascularity in Alzheimer's Disease. *PLoS ONE* 6, e23789.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023789>
- Bond, N.W., Everitt, A.V., Walton, J., 1989. Effects of dietary restriction on radial-arm maze performance and flavor memory in aged rats. *Neurobiol. Aging* 10, 27–30.
- Bondi, M.W., Edmonds, E.C., Salmon, D.P., 2017. Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future. *J. Int. Neuropsychol. Soc. JINS* 23, 818–831.  
<https://doi.org/10.1017/S135561771700100X>

- Bonomini, F., Francesca, B., Rezzani, R., 2010. Aquaporin and blood brain barrier. *Curr. Neuropharmacol.* 8, 92–96. <https://doi.org/10.2174/157015910791233132>
- Bowman, G.L., Kaye, J.A., Quinn, J.F., 2012. Dyslipidemia and blood-brain barrier integrity in Alzheimer’s disease. *Curr. Gerontol. Geriatr. Res.* 2012, 184042. <https://doi.org/10.1155/2012/184042>
- Brownlow, M.L., Joly-Amado, A., Azam, S., Elza, M., Selenica, M.-L., Pappas, C., Small, B., Engelman, R., Gordon, M.N., Morgan, D., 2014. Partial rescue of memory deficits induced by calorie restriction in a mouse model of tau deposition. *Behav. Brain Res.* 271, 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.06.001>
- Bruce-Keller, A.J., Umberger, G., McFall, R., Mattson, M.P., 1999. Food restriction reduces brain damage and improves behavioral outcome following excitotoxic and metabolic insults. *Ann. Neurol.* 45, 8–15.
- Bubb, E.J., Kinnavane, L., Aggleton, J.P., 2017. Hippocampal - diencephalic - cingulate networks for memory and emotion: An anatomical guide. *Brain Neurosci. Adv.* 1. <https://doi.org/10.1177/2398212817723443>
- Bushlin, I., Petralia, R.S., Wu, F., Harel, A., Mughal, M.R., Mattson, M.P., Yao, P.J., 2008. Clathrin assembly protein AP180 and CALM differentially control axogenesis and dendrite outgrowth in embryonic hippocampal neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 10257–10271. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2471-08.2008>
- Calabrese, E.J., Mattson, M.P., 2017. How does hormesis impact biology, toxicology, and medicine? *NPJ Aging Mech. Dis.* 3, 13. <https://doi.org/10.1038/s41514-017-0013-z>
- Cardoso, A., Marrana, F., Andrade, J.P., 2016. Caloric restriction in young rats disturbs hippocampal neurogenesis and spatial learning. *Neurobiol. Learn. Mem.* 133, 214–224. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.07.013>
- Carter, C.S., Leeuwenburgh, C., Daniels, M., Foster, T.C., 2009. Influence of calorie restriction on measures of age-related cognitive decline: role of increased physical activity. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 64, 850–859. <https://doi.org/10.1093/gerona/64.7.glp060>
- Chan, K.Y., Jang, M.J., Yoo, B.B., Greenbaum, A., Ravi, N., Wu, W.-L., Sánchez-Guardado, L., Lois, C., Mazmanian, S.K., Deverman, B.E., Gradinaru, V., 2017. Engineered AAVs for efficient noninvasive gene delivery to the central and peripheral nervous systems. *Nat. Neurosci.* 20, 1172–1179. <https://doi.org/10.1038/nn.4593>
- Chapman, P.F., White, G.L., Jones, M.W., Cooper-Blacketer, D., Marshall, V.J., Irizarry, M., Younkin, L., Good, M.A., Bliss, T.V., Hyman, B.T., Younkin, S.G., Hsiao, K.K., 1999. Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat. Neurosci.* 2, 271–276. <https://doi.org/10.1038/6374>
- Chia, P.H., Zhong, F.L., Niwa, S., Bonnard, C., Utami, K.H., Zeng, R., Lee, H., Eskin, A., Nelson, S.F., Xie, W.H., Al-Tawalbeh, S., El-Khateeb, M., Shboul, M., Pouladi, M.A., Al-Raqad, M., Reversade, B., 2018. A homozygous loss-of-function CAMK2A mutation causes growth delay, frequent seizures and severe intellectual disability. *eLife* 7, e32451. <https://doi.org/10.7554/eLife.32451>
- Choi, D.W., 1994. Chapter 6 Glutamate receptors and the induction of excitotoxic neuronal death, in: *Progress in Brain Research*. Elsevier, pp. 47–51. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)60767-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)60767-0)

- Cleary, J., Hittner, J.M., Semotuk, M., Mantyh, P., O'Hare, E., 1995. Beta-amyloid(1–40) effects on behavior and memory. *Brain Res.* 682, 69–74. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00323-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00323-1)
- Coatti, G.C., Frangini, M., Valadares, M.C., Gomes, J.P., Lima, N.O., Cavaçana, N., Assoni, A.F., Pelatti, M.V., Birbrair, A., de Lima, A.C.P., Singer, J.M., Rocha, F.M.M., Da Silva, G.L., Mantovani, M.S., Macedo-Souza, L.I., Ferrari, M.F.R., Zatz, M., 2017. Pericytes Extend Survival of ALS SOD1 Mice and Induce the Expression of Antioxidant Enzymes in the Murine Model and in iPSCs Derived Neuronal Cells from an ALS Patient. *Stem Cell Rev.* 13, 686–698. <https://doi.org/10.1007/s12015-017-9752-2>
- Coltman, R., Spain, A., Tsenkina, Y., Fowler, J.H., Smith, J., Scullion, G., Allerhand, M., Scott, F., Kalaria, R.N., Ihara, M., Dumas, S., Deary, I.J., Wood, E., McCulloch, J., Horsburgh, K., 2011. Selective white matter pathology induces a specific impairment in spatial working memory. *Neurobiol. Aging* 32, 2324.e7–2324.e12. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.09.005>
- Cortes-Canteli, M., Paul, J., Norris, E.H., Bronstein, R., Ahn, H.J., Zamolodchikov, D., Bhuvanendran, S., Fenz, K.M., Strickland, S., 2010. Fibrinogen and beta-amyloid association alters thrombosis and fibrinolysis: a possible contributing factor to Alzheimer's disease. *Neuron* 66, 695–709. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.05.014>
- Costa, R.M., Cohen, D., Nicolelis, M.A.L., 2004. Differential corticostriatal plasticity during fast and slow motor skill learning in mice. *Curr. Biol.* CB 14, 1124–1134. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.06.053>
- De Strooper, B., Karran, E., 2016. The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. *Cell* 164, 603–615. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.056>
- Deacon, R., 2012. Assessing burrowing, nest construction, and hoarding in mice. *J. Vis. Exp. JoVE* e2607. <https://doi.org/10.3791/2607>
- Deacon, R.M.J., 2006a. Burrowing in rodents: a sensitive method for detecting behavioral dysfunction. *Nat. Protoc.* 1, 118–121. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.19>
- Deacon, R.M.J., 2006b. Assessing nest building in mice. *Nat. Protoc.* 1, 1117–1119. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.170>
- Deacon, R.M.J., Croucher, A., Rawlins, J.N.P., 2002. Hippocampal cytotoxic lesion effects on species-typical behaviours in mice. *Behav. Brain Res.* 132, 203–213.
- Deane, R., Du Yan, S., Subramanian, R.K., LaRue, B., Jovanovic, S., Hogg, E., Welch, D., Manness, L., Lin, C., Yu, J., Zhu, H., Ghiso, J., Frangione, B., Stern, A., Schmidt, A.M., Armstrong, D.L., Arnold, B., Liliensiek, B., Nawroth, P., Hofman, F., Kindy, M., Stern, D., Zlokovic, B., 2003. RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat. Med.* 9, 907–913. <https://doi.org/10.1038/nm890>
- Deane, R., Singh, I., Sagare, A.P., Bell, R.D., Ross, N.T., LaRue, B., Love, R., Perry, S., Paquette, N., Deane, R.J., Thiyagarajan, M., Zarcone, T., Fritz, G., Friedman, A.E., Miller, B.L., Zlokovic, B.V., 2012. A multimodal RAGE-specific inhibitor reduces amyloid  $\beta$ -mediated brain disorder in a mouse model of Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.* 122, 1377–1392. <https://doi.org/10.1172/JCI58642>

- DeKosky, S.T., Scheff, S.W., 1990. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann. Neurol.* 27, 457–464. <https://doi.org/10.1002/ana.410270502>
- Demas, G.E., Sakaria, S., 2005. Leptin regulates energetic tradeoffs between body fat and humoral immunity. *Proc. Biol. Sci.* 272, 1845–1850. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3126>
- Desilva, T.M., Billiards, S.S., Borenstein, N.S., Trachtenberg, F.L., Volpe, J.J., Kinney, H.C., Rosenberg, P.A., 2008. Glutamate transporter EAAT2 expression is up-regulated in reactive astrocytes in human periventricular leukomalacia. *J. Comp. Neurol.* 508, 238–248. <https://doi.org/10.1002/cne.21667>
- Devi, L., Alldred, M.J., Ginsberg, S.D., Ohno, M., 2010. Sex- and brain region-specific acceleration of  $\beta$ -amyloidogenesis following behavioral stress in a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol. Brain* 3, 34. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-3-34>
- Devi, L., Ohno, M., 2015. TrkB reduction exacerbates Alzheimer's disease-like signaling aberrations and memory deficits without affecting  $\beta$ -amyloidosis in 5XFAD mice. *Transl. Psychiatry* 5, e562. <https://doi.org/10.1038/tp.2015.55>
- Devi, L., Ohno, M., 2010. Genetic reductions of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 and amyloid-beta ameliorate impairment of conditioned taste aversion memory in 5XFAD Alzheimer's disease model mice. *Eur. J. Neurosci.* 31, 110–118. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.07031.x>
- Dhurandhar, E.J., Allison, D.B., van Groen, T., Kadish, I., 2013. Hunger in the absence of caloric restriction improves cognition and attenuates Alzheimer's disease pathology in a mouse model. *PloS One* 8, e60437. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060437>
- Dinkins, M.B., Dasgupta, S., Wang, G., Zhu, G., He, Q., Kong, J.N., Bieberich, E., 2015. The 5XFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease Exhibits an Age-Dependent Increase in Anti-Ceramide IgG and Exogenous Administration of Ceramide Further Increases Anti-Ceramide Titers and Amyloid Plaque Burden. *J. Alzheimers Dis.* JAD 46, 55–61. <https://doi.org/10.3233/JAD-150088>
- Dirks, A.J., Leeuwenburgh, C., 2006. Caloric restriction in humans: potential pitfalls and health concerns. *Mech. Ageing Dev.* 127, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2005.09.001>
- Dixit, V.D., Schaffer, E.M., Pyle, R.S., Collins, G.D., Sakthivel, S.K., Palaniappan, R., Lillard, J.W., Taub, D.D., 2004. Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells. *J. Clin. Invest.* 114, 57–66. <https://doi.org/10.1172/JCI21134>
- Dodart, J.C., Meziane, H., Mathis, C., Bales, K.R., Paul, S.M., Ungerer, A., 1999. Behavioral disturbances in transgenic mice overexpressing the V717F beta-amyloid precursor protein. *Behav. Neurosci.* 113, 982–990.
- Dodiya, H.B., Kuntz, T., Shaik, S.M., Baufeld, C., Leibowitz, J., Zhang, Xulun, Gottel, N., Zhang, Xiaoqiong, Butovsky, O., Gilbert, J.A., Sisodia, S.S., 2019. Sex-specific effects of microbiome perturbations on cerebral A $\beta$  amyloidosis and microglia phenotypes. *J. Exp. Med.* 216, 1542–1560. <https://doi.org/10.1084/jem.20182386>

- Dong, X., Wang, Y., Qin, Z., 2009. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol. Sin.* 30, 379–387. <https://doi.org/10.1038/aps.2009.24>
- Dore-Duffy, P., 2008. Pericytes: pluripotent cells of the blood brain barrier. *Curr. Pharm. Des.* 14, 1581–1593. <https://doi.org/10.2174/138161208784705469>
- Dorighello, G.G., Rovani, J.C., Luhman, C.J.F., Paim, B.A., Raposo, H.F., Vercesi, A.E., Oliveira, H.C.F., 2014. Food restriction by intermittent fasting induces diabetes and obesity and aggravates spontaneous atherosclerosis development in hypercholesterolaemic mice. *Br. J. Nutr.* 111, 979–986. <https://doi.org/10.1017/S0007114513003383>
- Dubois, B., Feldman, H.H., Jacova, C., Hampel, H., Molinuevo, J.L., Blennow, K., DeKosky, S.T., Gauthier, S., Selkoe, D., Bateman, R., Cappa, S., Crutch, S., Engelborghs, S., Frisoni, G.B., Fox, N.C., Galasko, D., Habert, M.-O., Jicha, G.A., Nordberg, A., Pasquier, F., Rabinovici, G., Robert, P., Rowe, C., Salloway, S., Sarazin, M., Epelbaum, S., de Souza, L.C., Vellas, B., Visser, P.J., Schneider, L., Stern, Y., Scheltens, P., Cummings, J.L., 2014. Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer’s disease: the IWG-2 criteria. *Lancet Neurol.* 13, 614–629. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70090-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70090-0)
- Eimer, W.A., Vassar, R., 2013. Neuron loss in the 5XFAD mouse model of Alzheimer’s disease correlates with intraneuronal A $\beta$ 42 accumulation and Caspase-3 activation. *Mol. Neurodegener.* 8, 2. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-8-2>
- Einarsson, E.Ö., Nader, K., 2012. Involvement of the anterior cingulate cortex in formation, consolidation, and reconsolidation of recent and remote contextual fear memory. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 19, 449–452. <https://doi.org/10.1101/lm.027227.112>
- El-Ansary, A., Al-Ayadhi, L., 2014. GABAergic/glutamatergic imbalance relative to excessive neuroinflammation in autism spectrum disorders. *J. Neuroinflammation* 11. <https://doi.org/10.1186/s12974-014-0189-0>
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Erickson, M.A., Banks, W.A., 2013. Blood-brain barrier dysfunction as a cause and consequence of Alzheimer’s disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 33, 1500–1513. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.135>
- Etchevers, H.C., Vincent, C., Le Douarin, N.M., Couly, G.F., 2001. The cephalic neural crest provides pericytes and smooth muscle cells to all blood vessels of the face and forebrain. *Dev. Camb. Engl.* 128, 1059–1068.
- Fame, R.M., MacDonald, J.L., Macklis, J.D., 2011. Development, specification, and diversity of callosal projection neurons. *Trends Neurosci.* 34, 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.10.002>
- Fann, D.Y.-W., Santro, T., Manzanero, S., Widiapradja, A., Cheng, Y.-L., Lee, S.-Y., Chunduri, P., Jo, D.-G., Stranahan, A.M., Mattson, M.P., Arumugam, T.V., 2014. Intermittent fasting attenuates inflammasome activity in ischemic stroke. *Exp. Neurol.* 257, 114–119. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.04.017>
- Faris, “Mo’ez Al-Islam” E., Kacimi, S., Al-Kurd, R.A., Fararjeh, M.A., Bustanji, Y.K., Mohammad, M.K., Salem, M.L., 2012. Intermittent fasting during Ramadan

- attenuates proinflammatory cytokines and immune cells in healthy subjects. *Nutr. Res.* 32, 947–955. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2012.06.021>
- Farkas, E., Luiten, P.G., 2001. Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* 64, 575–611.
- Filley, C.M., Rollins, Y.D., Anderson, C.A., Arciniegas, D.B., Howard, K.L., Murrell, J.R., Boyer, P.J., Kleinschmidt-DeMasters, B.K., Ghetti, B., 2007. The genetics of very early onset Alzheimer disease. *Cogn. Behav. Neurol. Off. J. Soc. Behav. Cogn. Neurol.* 20, 149–156. <https://doi.org/10.1097/WNN.0b013e318145a8c8>
- Fontana, L., Partridge, L., 2015. Promoting health and longevity through diet: from model organisms to humans. *Cell* 161, 106–118. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.020>
- Forster, M.J., Morris, P., Sohal, R.S., 2003. Genotype and age influence the effect of caloric intake on mortality in mice. *FASEB J.* 17, 690–692. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0533fje>
- Foster, E.M., Dangla-Valls, A., Lovestone, S., Ribe, E.M., Buckley, N.J., 2019. Clusterin in Alzheimer's Disease: Mechanisms, Genetics, and Lessons From Other Pathologies. *Front. Neurosci.* 13, 164. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00164>
- Fragkouli, A., Tsilibary, E.C., Tzinia, A.K., 2014. Neuroprotective role of MMP-9 overexpression in the brain of Alzheimer's 5xFAD mice. *Neurobiol. Dis.* 70, 179–189. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.06.021>
- Franco-Pons, N., Torrente, M., Colomina, M.T., Vilella, E., 2007. Behavioral deficits in the cuprizone-induced murine model of demyelination/remyelination. *Toxicol. Lett.* 169, 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.01.010>
- Frank, R.N., Turczyn, T.J., Das, A., 1990. Pericyte coverage of retinal and cerebral capillaries. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 31, 999–1007.
- Frankland, P.W., Bontempi, B., Talton, L.E., Kaczmarek, L., Silva, A.J., 2004. The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science* 304, 881–883. <https://doi.org/10.1126/science.1094804>
- Franzblau, M., Gonzales-Portillo, C., Gonzales-Portillo, G.S., Diamandis, T., Borlongan, M.C., Tajiri, N., Borlongan, C.V., 2013. Vascular damage: a persisting pathology common to Alzheimer's disease and traumatic brain injury. *Med. Hypotheses* 81, 842–845. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2013.09.012>
- Fréchou, M., Margaill, I., Marchand-Leroux, C., Beray-Berthat, V., 2018. Behavioral tests that reveal long-term deficits after permanent focal cerebral ischemia in mouse. *Behav. Brain Res.* 360, 69–80. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.11.040>
- Frost, S.B., Barbay, S., Mumert, M.L., Stowe, A.M., Nudo, R.J., 2006. An animal model of capsular infarct: endothelin-1 injections in the rat. *Behav. Brain Res.* 169, 206–211. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.01.014>
- Fulop, T., Larbi, A., Witkowski, J.M., McElhaney, J., Loeb, M., Mitnitski, A., Pawelec, G., 2010. Aging, frailty and age-related diseases. *Biogerontology* 11, 547–563. <https://doi.org/10.1007/s10522-010-9287-2>
- Furney, S.J., Simmons, A., Breen, G., Pedroso, I., Lunnon, K., Proitsi, P., Hodges, A., Powell, J., Wahlund, L.-O., Kloszewska, I., Mecocci, P., Soininen, H., Tsolaki, M., Vellas, B., Spenger, C., Lathrop, M., Shen, L., Kim, S., Saykin, A.J., Weiner, M.W., Lovestone, S., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, AddNeuroMed Consortium, 2011. Genome-wide association with MRI atrophy measures as a

- quantitative trait locus for Alzheimer's disease. *Mol. Psychiatry* 16, 1130–1138. <https://doi.org/10.1038/mp.2010.123>
- Furtado, D., Björnalm, M., Ayton, S., Bush, A.I., Kempe, K., Caruso, F., 2018. Overcoming the Blood-Brain Barrier: The Role of Nanomaterials in Treating Neurological Diseases. *Adv. Mater. Deerfield Beach Fla* 30, e1801362. <https://doi.org/10.1002/adma.201801362>
- Gardner, E.M., 2005. Caloric restriction decreases survival of aged mice in response to primary influenza infection. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 60, 688–694.
- Ghosh, M., Yang, Y., Rothstein, J.D., Robinson, M.B., 2011. Nuclear factor- $\kappa$ B contributes to neuron-dependent induction of glutamate transporter-1 expression in astrocytes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 9159–9169. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0302-11.2011>
- Giannoni, P., Arango-Lievano, M., Neves, I.D., Rousset, M.-C., Baranger, K., Rivera, S., Jeanneteau, F., Claeysen, S., Marchi, N., 2016. Cerebrovascular pathology during the progression of experimental Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 88, 107–117. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.01.001>
- Goate, A., Chartier-Harlin, M.C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., 1991. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349, 704–706. <https://doi.org/10.1038/349704a0>
- Golanov, E.V., Sharpe, M.A., Regnier-Golanov, A.S., Del Zoppo, G.J., Baskin, D.S., Britz, G.W., 2019. Fibrinogen Chains Intrinsic to the Brain. *Front. Neurosci.* 13, 541. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00541>
- Goldberg, E.L., Romero-Aleshire, M.J., Renkema, K.R., Ventevogel, M.S., Chew, W.M., Uhrlaub, J.L., Smithey, M.J., Limesand, K.H., Sempowski, G.D., Brooks, H.L., Nikolich-Žugich, J., 2015. Lifespan-extending caloric restriction or mTOR inhibition impair adaptive immunity of old mice by distinct mechanisms. *Aging Cell* 14, 130–138. <https://doi.org/10.1111/accel.12280>
- González-Castillo, C., Ortuño-Sahagún, D., Guzmán-Brambila, C., Pallàs, M., Rojas-Mayorquín, A.E., 2014. Pleiotrophin as a central nervous system neuromodulator, evidences from the hippocampus. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 443. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00443>
- Guo, H., Zhao, Z., Yang, Q., Wang, M., Bell, R.D., Wang, S., Chow, N., Davis, T.P., Griffin, J.H., Goldman, S.A., Zlokovic, B.V., 2013. An activated protein C analog stimulates neuronal production by human neural progenitor cells via a PAR1-PAR3-S1PR1-Akt pathway. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 6181–6190. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4491-12.2013>
- Guo, Z., Ersoz, A., Butterfield, D.A., Mattson, M.P., 2000. Beneficial effects of dietary restriction on cerebral cortical synaptic terminals: preservation of glucose and glutamate transport and mitochondrial function after exposure to amyloid beta-peptide, iron, and 3-nitropropionic acid. *J. Neurochem.* 75, 314–320.
- Hackett, J.T., Ueda, T., 2015. Glutamate Release. *Neurochem. Res.* 40, 2443–2460. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1622-1>
- Halagappa, V.K.M., Guo, Z., Pearson, M., Matsuoka, Y., Cutler, R.G., Laferla, F.M., Mattson, M.P., 2007. Intermittent fasting and caloric restriction ameliorate age-

- related behavioral deficits in the triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 26, 212–220. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.12.019>
- Halliday, M.R., Pomara, N., Sagare, A.P., Mack, W.J., Frangione, B., Zlokovic, B.V., 2013. Relationship between cyclophilin a levels and matrix metalloproteinase 9 activity in cerebrospinal fluid of cognitively normal apolipoprotein e4 carriers and blood-brain barrier breakdown. *JAMA Neurol.* 70, 1198–1200. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2013.3841>
- Halliday, M.R., Rege, S.V., Ma, Q., Zhao, Z., Miller, C.A., Winkler, E.A., Zlokovic, B.V., 2016. Accelerated pericyte degeneration and blood-brain barrier breakdown in apolipoprotein E4 carriers with Alzheimer's disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 36, 216–227. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2015.44>
- Hamadeh, M.J., Rodriguez, M.C., Kaczor, J.J., Tarnopolsky, M.A., 2018. Caloric restriction transiently improves motor performance but hastens clinical onset of disease in the Cu/Zn-superoxide dismutase mutant G93A mouse. *Muscle Nerve* 31, 214–220. <https://doi.org/10.1002/mus.20255>
- Hardy, J., Selkoe, D.J., 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353–356. <https://doi.org/10.1126/science.1072994>
- Hare, B.D., Beierle, J.A., Toufexis, D.J., Hammack, S.E., Falls, W.A., 2014. Exercise-Associated Changes in the Corticosterone Response to Acute Restraint Stress: Evidence for Increased Adrenal Sensitivity and Reduced Corticosterone Response Duration. *Neuropsychopharmacology* 39, 1262–1269. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.329>
- Harel, A., Mattson, M.P., Yao, P.J., 2011. CALM, a clathrin assembly protein, influences cell surface GluR2 abundance. *Neuromolecular Med.* 13, 88–90. <https://doi.org/10.1007/s12017-010-8142-6>
- Harel, A., Wu, F., Mattson, M.P., Morris, C.M., Yao, P.J., 2008. Evidence for CALM in directing VAMP2 trafficking. *Traffic Cph. Den.* 9, 417–429. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00694.x>
- Harold, D., Abraham, R., Hollingworth, P., Sims, R., Gerrish, A., Hamshere, M.L., Pahwa, J.S., Moskvin, V., Dowzell, K., Williams, A., Jones, N., Thomas, C., Stretton, A., Morgan, A.R., Lovestone, S., Powell, J., Proitsi, P., Lupton, M.K., Brayne, C., Rubinsztein, D.C., Gill, M., Lawlor, B., Lynch, A., Morgan, K., Brown, K.S., Passmore, P.A., Craig, D., McGuinness, B., Todd, S., Holmes, C., Mann, D., Smith, A.D., Love, S., Kehoe, P.G., Hardy, J., Mead, S., Fox, N., Rossor, M., Collinge, J., Maier, W., Jessen, F., Schürmann, B., Heun, R., van den Bussche, H., Heuser, I., Kornhuber, J., Wiltfang, J., Dichgans, M., Frölich, L., Hampel, H., Hüll, M., Rujescu, D., Goate, A.M., Kauwe, J.S.K., Cruchaga, C., Nowotny, P., Morris, J.C., Mayo, K., Sleegers, K., Bettens, K., Engelborghs, S., De Deyn, P.P., Van Broeckhoven, C., Livingston, G., Bass, N.J., Gurling, H., McQuillin, A., Gwilliam, R., Deloukas, P., Al-Chalabi, A., Shaw, C.E., Tsolaki, M., Singleton, A.B., Guerreiro, R., Mühleisen, T.W., Nothen, M.M., Moebus, S., Jöckel, K.-H., Klopp, N., Wichmann, H.-E., Carrasquillo, M.M., Pankratz, V.S., Younkin, S.G., Holmans, P.A., O'Donovan, M., Owen, M.J., Williams, J., 2009. Genome-wide association

- study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 41, 1088–1093. <https://doi.org/10.1038/ng.440>
- Hartz, A.M.S., Bauer, B., Soldner, E.L.B., Wolf, A., Boy, S., Backhaus, R., Mihaljevic, I., Bogdahn, U., Klünemann, H.H., Schuierer, G., Schlachetzki, F., 2012. Amyloid- $\beta$  Contributes to Blood–Brain Barrier Leakage in Transgenic Human Amyloid Precursor Protein Mice and in Humans With Cerebral Amyloid Angiopathy. *Stroke* 43, 514–523. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.627562>
- Heldin, C.-H., 2013. Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment. *Cell Commun. Signal. CCS* 11, 97. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-11-97>
- Heneka, M.T., Carson, M.J., El Khoury, J., Landreth, G.E., Brosseron, F., Feinstein, D.L., Jacobs, A.H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R.M., Herrup, K., Frautschy, S.A., Finsen, B., Brown, G.C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., Petzold, G.C., Town, T., Morgan, D., Shinohara, M.L., Perry, V.H., Holmes, C., Bazan, N.G., Brooks, D.J., Hunot, S., Joseph, B., Deigendesch, N., Garaschuk, O., Boddeke, E., Dinarello, C.A., Breitner, J.C., Cole, G.M., Golenbock, D.T., Kummer, M.P., 2015. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 14, 388–405. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5)
- Hibbits, N., Pannu, R., Wu, T.J., Armstrong, R.C., 2009. Cuprizone demyelination of the corpus callosum in mice correlates with altered social interaction and impaired bilateral sensorimotor coordination. *ASN Neuro* 1. <https://doi.org/10.1042/AN20090032>
- Hohn, A., Leibrock, J., Bailey, K., Barde, Y.A., 1990. Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* 344, 339–341. <https://doi.org/10.1038/344339a0>
- Holtzman, D.M., Herz, J., Bu, G., 2012. Apolipoprotein E and apolipoprotein E receptors: normal biology and roles in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006312. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006312>
- Honrath, B., Culmsee, C., Dolga, A.M., 2018. One protein, different cell fate: the differential outcome of depleting GRP75 during oxidative stress in neurons. *Cell Death Dis.* 9, 32. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0148-7>
- Honrath, B., Metz, I., Bendridi, N., Rieusset, J., Culmsee, C., Dolga, A.M., 2017. Glucose-regulated protein 75 determines ER-mitochondrial coupling and sensitivity to oxidative stress in neuronal cells. *Cell Death Discov.* 3, 17076. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2017.76>
- Horie, N., Pereira, M.P., Niizuma, K., Sun, G., Keren-Gill, H., Encarnacion, A., Shamloo, M., Hamilton, S.A., Jiang, K., Huhn, S., Palmer, T.D., Bliss, T.M., Steinberg, G.K., 2011. Transplanted stem cell-secreted vascular endothelial growth factor effects poststroke recovery, inflammation, and vascular repair. *Stem Cells Dayt. Ohio* 29, 274–285. <https://doi.org/10.1002/stem.584>
- Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F., Cole, G., 1996. Correlative memory deficits, A $\beta$  elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274, 99–102.
- Huang, K.-L., Marcora, E., Pimenova, A.A., Di Narzo, A.F., Kapoor, M., Jin, S.C., Harari, O., Bertelsen, S., Fairfax, B.P., Czajkowski, J., Chouraki, V., Grenier-Boley, B., Bellenguez, C., Deming, Y., McKenzie, A., Raj, T., Renton, A.E., Budde, J., Smith,

- A., Fitzpatrick, A., Bis, J.C., DeStefano, A., Adams, H.H.H., Ikram, M.A., van der Lee, S., Del-Aguila, J.L., Fernandez, M.V., Ibañez, L., International Genomics of Alzheimer's Project, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, Sims, R., Escott-Price, V., Mayeux, R., Haines, J.L., Farrer, L.A., Pericak-Vance, M.A., Lambert, J.C., van Duijn, C., Launer, L., Seshadri, S., Williams, J., Amouyel, P., Schellenberg, G.D., Zhang, B., Borecki, I., Kauwe, J.S.K., Cruchaga, C., Hao, K., Goate, A.M., 2017. A common haplotype lowers PU.1 expression in myeloid cells and delays onset of Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.* 20, 1052–1061. <https://doi.org/10.1038/nn.4587>
- Hunt, N.D., Li, G.D., Zhu, M., Levette, A., Chachich, M.E., Spangler, E.L., Allard, J.S., Hyun, D.-H., Ingram, D.K., Cabo, R. de, 2012. Effect of calorie restriction and refeeding on skin wound healing in the rat. *AGE* 34, 1453–1458. <https://doi.org/10.1007/s11357-011-9321-6>
- Iadecola, C., 2017. The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. *Neuron* 96, 17–42. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.07.030>
- Iadecola, C., 2013. The pathobiology of vascular dementia. *Neuron* 80, 844–866. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.008>
- Iadecola, C., 2004. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 347–360. <https://doi.org/10.1038/nrn1387>
- Iadecola, C., Davisson, R.L., 2008. Hypertension and cerebrovascular dysfunction. *Cell Metab.* 7, 476–484. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.03.010>
- Ingram, D.K., de Cabo, R., 2017. Calorie restriction in rodents: Caveats to consider. *Ageing Res. Rev., Nutritional interventions modulating aging and age-associated diseases* 39, 15–28. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.05.008>
- Irizarry, M.C., McNamara, M., Fedorchak, K., Hsiao, K., Hyman, B.T., 1997. APPSw transgenic mice develop age-related A beta deposits and neuropil abnormalities, but no neuronal loss in CA1. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 965–973. <https://doi.org/10.1097/00005072-199709000-00002>
- Ishikawa, Y., Maeda, M., Pasham, M., Aguet, F., Tacheva-Grigorova, S.K., Masuda, T., Yi, H., Lee, S.-U., Xu, J., Teruya-Feldstein, J., Ericsson, M., Mullally, A., Heuser, J., Kirchhausen, T., Maeda, T., 2015. Role of the clathrin adaptor PICALM in normal hematopoiesis and polycythemia vera pathophysiology. *Haematologica* 100, 439–451. <https://doi.org/10.3324/haematol.2014.119537>
- Itoh, T., Koshiba, S., Kigawa, T., Kikuchi, A., Yokoyama, S., Takenawa, T., 2001. Role of the ENTH domain in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding and endocytosis. *Science* 291, 1047–1051. <https://doi.org/10.1126/science.291.5506.1047>
- Jack, C.R., Bennett, D.A., Blennow, K., Carrillo, M.C., Dunn, B., Haeberlein, S.B., Holtzman, D.M., Jagust, W., Jessen, F., Karlawish, J., Liu, E., Molinuevo, J.L., Montine, T., Phelps, C., Rankin, K.P., Rowe, C.C., Scheltens, P., Siemers, E., Snyder, H.M., Sperling, R., Contributors, 2018. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 14, 535–562. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.02.018>

- Jacobsen, J.S., Wu, C.-C., Redwine, J.M., Comery, T.A., Arias, R., Bowlby, M., Martone, R., Morrison, J.H., Pangalos, M.N., Reinhart, P.H., Bloom, F.E., 2006. Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 5161–5166. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600948103>
- Jacobson, O., Kiesewetter, D.O., Chen, X., 2016. Albumin-Binding Evans Blue Derivatives for Diagnostic Imaging and Production of Long-Acting Therapeutics. *Bioconjug. Chem.* 27, 2239–2247. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00487>
- Jiang, Q., Lee, C.Y.D., Mandrekar, S., Wilkinson, B., Cramer, P., Zelcer, N., Mann, K., Lamb, B., Willson, T.M., Collins, J.L., Richardson, J.C., Smith, J.D., Comery, T.A., Riddell, D., Holtzman, D.M., Tontonoz, P., Landreth, G.E., 2008. ApoE promotes the proteolytic degradation of A $\beta$ . *Neuron* 58, 681–693. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.04.010>
- Johnson, J.B., Summer, W., Cutler, R.G., Martin, B., Hyun, D.-H., Dixit, V.D., Pearson, M., Nassar, M., Tellejohan, R., Maudsley, S., Carlson, O., John, S., Laub, D.R., Mattson, M.P., 2007. Alternate day calorie restriction improves clinical findings and reduces markers of oxidative stress and inflammation in overweight adults with moderate asthma. *Free Radic. Biol. Med.* 42, 665–674. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.12.005>
- Jonsson, T., Atwal, J.K., Steinberg, S., Snaedal, J., Jonsson, P.V., Bjornsson, S., Stefansson, H., Sulem, P., Gudbjartsson, D., Maloney, J., Hoyte, K., Gustafson, A., Liu, Y., Lu, Y., Bhangale, T., Graham, R.R., Huttenlocher, J., Bjornsdottir, G., Andreassen, O.A., Jönsson, E.G., Palotie, A., Behrens, T.W., Magnusson, O.T., Kong, A., Thorsteinsdottir, U., Watts, R.J., Stefansson, K., 2012. A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature* 488, 96–99. <https://doi.org/10.1038/nature11283>
- Jović, M., Lončarević-Vasiljković, N., Ivković, S., Dinić, J., Milanović, D., Zlokovic, B., Kanazir, S., 2019. Short-term fish oil supplementation applied in presymptomatic stage of Alzheimer's disease enhances microglial/macrophage barrier and prevents neuritic dystrophy in parietal cortex of 5xFAD mouse model. *PloS One* 14, e0216726. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216726>
- Kanatsu, K., Morohashi, Y., Suzuki, M., Kuroda, H., Watanabe, T., Tomita, T., Iwatsubo, T., 2014. Decreased CALM expression reduces A $\beta$ 42 to total A $\beta$  ratio through clathrin-mediated endocytosis of  $\gamma$ -secretase. *Nat. Commun.* 5, 3386. <https://doi.org/10.1038/ncomms4386>
- Kane, A.E., Hilmer, S.N., Mach, J., Mitchell, S.J., de Cabo, R., Howlett, S.E., 2016. Animal models of frailty: current applications in clinical research. *Clin. Interv. Aging* 11, 1519–1529. <https://doi.org/10.2147/CIA.S105714>
- Kanodia, J.S., Gadkar, K., Bumbaca, D., Zhang, Y., Tong, R.K., Luk, W., Hoyte, K., Lu, Y., Wildsmith, K.R., Couch, J.A., Watts, R.J., Dennis, M.S., Ernst, J.A., Scarce-Levie, K., Atwal, J.K., Ramanujan, S., Joseph, S., 2016. Prospective Design of Anti-Transferrin Receptor Bispecific Antibodies for Optimal Delivery into the Human Brain. *CPT Pharmacomet. Syst. Pharmacol.* 5, 283–291. <https://doi.org/10.1002/psp4.12081>
- Karch, C.M., Cruchaga, C., Goate, A.M., 2014. Alzheimer's disease genetics: from the bench to the clinic. *Neuron* 83, 11–26. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.05.041>

- Karran, E., Mercken, M., Strooper, B.D., 2011. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 10, 698–712. <https://doi.org/10.1038/nrd3505>
- Kattula, S., Byrnes, J.R., Wolberg, A.S., 2017. Fibrinogen and Fibrin in Hemostasis and Thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37, e13–e21. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.308564>
- Kaur, M., Sharma, S., Kaur, G., 2008. Age-related impairments in neuronal plasticity markers and astrocytic GFAP and their reversal by late-onset short term dietary restriction. *Biogerontology* 9, 441–454. <https://doi.org/10.1007/s10522-008-9168-0>
- Kelly, K.A., Miller, D.B., Bowyer, J.F., O'Callaghan, J.P., 2012. Chronic exposure to corticosterone enhances the neuroinflammatory and neurotoxic responses to methamphetamine: CORT primes METH neuroinflammation. *J. Neurochem.* 122, 995–1009. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07864.x>
- Kelton, W., Waindok, A.C., Pesch, T., Pogson, M., Ford, K., Parola, C., Reddy, S.T., 2017. Reprogramming MHC specificity by CRISPR-Cas9-assisted cassette exchange. *Sci. Rep.* 7, 45775. <https://doi.org/10.1038/srep45775>
- Kero, M., Paetau, A., Polvikoski, T., Tanskanen, M., Sulkava, R., Jansson, L., Myllykangas, L., Tienari, P.J., 2013. Amyloid precursor protein (APP) A673T mutation in the elderly Finnish population. *Neurobiol. Aging* 34, 1518.e1–3. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.09.017>
- Kierdorf, K., Prinz, M., 2013. Factors regulating microglia activation. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 44. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00044>
- Kim, T.-K., Han, H.-E., Kim, H., Lee, J.-E., Choi, D., Park, W.J., Han, P.-L., 2012. Expression of the plant viral protease NIa in the brain of a mouse model of Alzheimer's disease mitigates A $\beta$  pathology and improves cognitive function. *Exp. Mol. Med.* 44, 740–748. <https://doi.org/10.3858/emm.2012.44.12.082>
- Kimura, R., Devi, L., Ohno, M., 2010. Partial reduction of BACE1 improves synaptic plasticity, recent and remote memories in Alzheimer's disease transgenic mice. *J. Neurochem.* 113, 248–261. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06608.x>
- Kimura, R., Ohno, M., 2009. Impairments in remote memory stabilization precede hippocampal synaptic and cognitive failures in 5XFAD Alzheimer mouse model. *Neurobiol. Dis.* 33, 229–235. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.10.006>
- Kisler, K., Nelson, A.R., Montagne, A., Zlokovic, B.V., 2017a. Cerebral blood flow regulation and neurovascular dysfunction in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 419–434. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.48>
- Kisler, K., Nelson, A.R., Rege, S.V., Ramanathan, A., Wang, Y., Ahuja, A., Lazic, D., Tsai, P.S., Zhao, Z., Zhou, Y., Boas, D.A., Sakadžić, S., Zlokovic, B.V., 2017b. Pericyte degeneration leads to neurovascular uncoupling and limits oxygen supply to brain. *Nat. Neurosci.* 20, 406–416. <https://doi.org/10.1038/nn.4489>
- Kivimäki, M., Luukkonen, R., Batty, G.D., Ferrie, J.E., Pentti, J., Nyberg, S.T., Shipley, M.J., Alfredsson, L., Fransson, E.I., Goldberg, M., Knutsson, A., Koskenvuo, M., Kuosma, E., Nordin, M., Suominen, S.B., Theorell, T., Vuoksimaa, E., Westerholm, P., Westerlund, H., Zins, M., Kivipelto, M., Vahtera, J., Kaprio, J., Singh-Manoux, A., Jokela, M., 2018. Body mass index and risk of dementia: Analysis of individual-

- level data from 1.3 million individuals. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 14, 601–609. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2017.09.016>
- Koldamova, R., Schug, J., Lefterova, M., Cronican, A.A., Fitz, N.F., Davenport, F.A., Carter, A., Castranio, E.L., Lefterov, I., 2014. Genome-wide approaches reveal EGR1-controlled regulatory networks associated with neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* 63, 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.11.005>
- Kook, S.-Y., Hong, H.S., Moon, M., Ha, C.M., Chang, S., Mook-Jung, I., 2012. A $\beta$ <sub>1-42</sub>-RAGE interaction disrupts tight junctions of the blood-brain barrier via Ca<sup>2+</sup>-calcineurin signaling. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 8845–8854. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6102-11.2012>
- Kovacs, Z.I., Kim, S., Jikaria, N., Qureshi, F., Milo, B., Lewis, B.K., Bresler, M., Burks, S.R., Frank, J.A., 2017. Disrupting the blood-brain barrier by focused ultrasound induces sterile inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E75–E84. <https://doi.org/10.1073/pnas.1614777114>
- Kristan, D.M., 2018. Chronic calorie restriction increases susceptibility of laboratory mice (*Mus musculus*) to a primary intestinal parasite infection. *Aging Cell* 6, 817–825. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00345.x>
- Krueger, M., Bechmann, I., 2010. CNS pericytes: concepts, misconceptions, and a way out. *Glia* 58, 1–10. <https://doi.org/10.1002/glia.20898>
- Kuhla, A., Lange, S., Holzmann, C., Maass, F., Petersen, J., Vollmar, B., Wree, A., 2013. Lifelong caloric restriction increases working memory in mice. *PloS One* 8, e68778. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068778>
- Kunkle, B.W., Grenier-Boley, B., Sims, R., Bis, J.C., Damotte, V., Naj, A.C., Boland, A., Vronskaya, M., van der Lee, S.J., Amlie-Wolf, A., Bellenguez, C., Frizatti, A., Chouraki, V., Martin, E.R., Sleegers, K., Badarinarayan, N., Jakobsdottir, J., Hamilton-Nelson, K.L., Moreno-Grau, S., Ollaso, R., Raybould, R., Chen, Y., Kuzma, A.B., Hiltunen, M., Morgan, T., Ahmad, S., Vardarajan, B.N., Epelbaum, J., Hoffmann, P., Boada, M., Beecham, G.W., Garnier, J.-G., Harold, D., Fitzpatrick, A.L., Valladares, O., Moutet, M.-L., Gerrish, A., Smith, A.V., Qu, L., Bacq, D., Denning, N., Jian, X., Zhao, Y., Del Zompo, M., Fox, N.C., Choi, S.-H., Mateo, I., Hughes, J.T., Adams, H.H., Malamon, J., Sanchez-Garcia, F., Patel, Y., Brody, J.A., Dombroski, B.A., Naranjo, M.C.D., Daniilidou, M., Eiriksdottir, G., Mukherjee, S., Wallon, D., Uphill, J., Aspelund, T., Cantwell, L.B., Garzia, F., Galimberti, D., Hofer, E., Butkiewicz, M., Fin, B., Scarpini, E., Sarnowski, C., Bush, W.S., Meslage, S., Kornhuber, J., White, C.C., Song, Y., Barber, R.C., Engelborghs, S., Sordon, S., Voijnovic, D., Adams, P.M., Vandenberghe, R., Mayhaus, M., Cupples, L.A., Albert, M.S., De Deyn, P.P., Gu, W., Himali, J.J., Beekly, D., Squassina, A., Hartmann, A.M., Orellana, A., Blacker, D., Rodriguez-Rodriguez, E., Lovestone, S., Garcia, M.E., Doody, R.S., Munoz-Fernandez, C., Sussams, R., Lin, H., Fairchild, T.J., Benito, Y.A., Holmes, C., Karamujic-Comic, H., Frosch, M.P., Thonberg, H., Maier, W., Roshchupkin, G., Ghetti, B., Giedraitis, V., Kawalia, A., Li, S., Huebinger, R.M., Kilander, L., Moebus, S., Hernandez, I., Kamboh, M.I., Brundin, R., Turton, J., Yang, Q., Katz, M.J., Concari, L., Lord, J., Beiser, A.S., Keene, C.D., Helisalmi, S., Kloszewska, I., Kukull, W.A., Koivisto, A.M., Lynch, A., Tarraga, L., Larson, E.B., Haapasalo, A., Lawlor, B., Mosley,

T.H., Lipton, R.B., Solfrizzi, V., Gill, M., Longstreth, W.T., Montine, T.J., Frisardi, V., Diez-Fairen, M., Rivadeneira, F., Petersen, R.C., Deramecourt, V., Alvarez, I., Salani, F., Ciaramella, A., Boerwinkle, E., Reiman, E.M., Fievet, N., Rotter, J.I., Reisch, J.S., Hanon, O., Cupidi, C., Andre Uitterlinden, A.G., Royall, D.R., Dufouil, C., Maletta, R.G., de Rojas, I., Sano, M., Brice, A., Cecchetti, R., George-Hyslop, P.S., Ritchie, K., Tsolaki, M., Tsuang, D.W., Dubois, B., Craig, D., Wu, C.-K., Soininen, H., Avramidou, D., Albin, R.L., Fratiglioni, L., Germanou, A., Apostolova, L.G., Keller, L., Koutroumani, M., Arnold, S.E., Panza, F., Gkatzima, O., Asthana, S., Hannequin, D., Whitehead, P., Atwood, C.S., Caffarra, P., Hampel, H., Quintela, I., Carracedo, Á., Lannfelt, L., Rubinsztein, D.C., Barnes, L.L., Pasquier, F., Frölich, L., Barral, S., McGuinness, B., Beach, T.G., Johnston, J.A., Becker, J.T., Passmore, P., Bigio, E.H., Schott, J.M., Bird, T.D., Warren, J.D., Boeve, B.F., Lupton, M.K., Bowen, J.D., Proitsi, P., Boxer, A., Powell, J.F., Burke, J.R., Kauwe, J.S.K., Burns, J.M., Mancuso, M., Buxbaum, J.D., Bonuccelli, U., Cairns, N.J., McQuillin, A., Cao, C., Livingston, G., Carlson, C.S., Bass, N.J., Carlsson, C.M., Hardy, J., Carney, R.M., Bras, J., Carrasquillo, M.M., Guerreiro, R., Allen, M., Chui, H.C., Fisher, E., Masullo, C., Crocco, E.A., DeCarli, C., Bisceglia, G., Dick, M., Ma, L., Duara, R., Graff-Radford, N.R., Evans, D.A., Hodges, A., Faber, K.M., Scherer, M., Fallon, K.B., Riemenschneider, M., Fardo, D.W., Heun, R., Farlow, M.R., Kölsch, H., Ferris, S., Leber, M., Foroud, T.M., Heuser, I., Galasko, D.R., Giegling, I., Gearing, M., Hüll, M., Geschwind, D.H., Gilbert, J.R., Morris, J., Green, R.C., Mayo, K., Growdon, J.H., Feulner, T., Hamilton, R.L., Harrell, L.E., Dricchel, D., Honig, L.S., Cushion, T.D., Huentelman, M.J., Hollingworth, P., Hulette, C.M., Hyman, B.T., Marshall, R., Jarvik, G.P., Meggy, A., Abner, E., Menzies, G.E., Jin, L.-W., Leonenko, G., Real, L.M., Jun, G.R., Baldwin, C.T., Grozeva, D., Karydas, A., Russo, G., Kaye, J.A., Kim, R., Jessen, F., Kowall, N.W., Vellas, B., Kramer, J.H., Vardy, E., LaFerla, F.M., Jöckel, K.-H., Lah, J.J., Dichgans, M., Leverenz, J.B., Mann, D., Levey, A.I., Pickering-Brown, S., Lieberman, A.P., Klopp, N., Lunetta, K.L., Wichmann, H.-E., Lyketsos, C.G., Morgan, K., Marson, D.C., Brown, K., Martiniuk, F., Medway, C., Mash, D.C., Nöthen, M.M., Masliah, E., Hooper, N.M., McCormick, W.C., Daniele, A., McCurry, S.M., Bayer, A., McDavid, A.N., Gallacher, J., McKee, A.C., van den Bussche, H., Mesulam, M., Brayne, C., Miller, B.L., Riedel-Heller, S., Miller, C.A., Miller, J.W., Al-Chalabi, A., Morris, J.C., Shaw, C.E., Myers, A.J., Wiltfang, J., O'Bryant, S., Olichney, J.M., Alvarez, V., Parisi, J.E., Singleton, A.B., Paulson, H.L., Collinge, J., Perry, W.R., Mead, S., Peskind, E., Cribbs, D.H., Rossor, M., Pierce, A., Ryan, N.S., Poon, W.W., Nacmias, B., Potter, H., Sorbi, S., Quinn, J.F., Sacchinelli, E., Raj, A., Spalletta, G., Raskind, M., Caltagirone, C., Bossù, P., Orfei, M.D., Reisberg, B., Clarke, R., Reitz, C., Smith, A.D., Ringman, J.M., Warden, D., Roberson, E.D., Wilcock, G., Rogaeva, E., Bruni, A.C., Rosen, H.J., Gallo, M., Rosenberg, R.N., Ben-Shlomo, Y., Sager, M.A., Mecocci, P., Saykin, A.J., Pastor, P., Cuccaro, M.L., Vance, J.M., Schneider, J.A., Schneider, L.S., Slifer, S., Seeley, W.W., Smith, A.G., Sonnen, J.A., Spina, S., Stern, R.A., Swerdlow, R.H., Tang, M., Tanzi, R.E., Trojanowski, J.Q., Troncoso, J.C., Van Deerlin, V.M., Van Eldik, L.J., Vinters, H.V., Vonsattel, J.P., Weintraub, S., Welsh-Bohmer, K.A., Wilhelmsen,

- K.C., Williamson, J., Wingo, T.S., Woltjer, R.L., Wright, C.B., Yu, C.-E., Yu, L., Saba, Y., Pilotto, A., Bullido, M.J., Peters, O., Crane, P.K., Bennett, D., Bosco, P., Coto, E., Boccardi, V., De Jager, P.L., Lleo, A., Warner, N., Lopez, O.L., Ingelsson, M., Deloukas, P., Cruchaga, C., Graff, C., Gwilliam, R., Fornage, M., Goate, A.M., Sanchez-Juan, P., Kehoe, P.G., Amin, N., Ertekin-Taner, N., Berr, C., Debette, S., Love, S., Launer, L.J., Younkin, S.G., Dartigues, J.-F., Corcoran, C., Ikram, M.A., Dickson, D.W., Nicolas, G., Champion, D., Tschanz, J., Schmidt, H., Hakonarson, H., Clarimon, J., Munger, R., Schmidt, R., Farrer, L.A., Van Broeckhoven, C., C O'Donovan, M., DeStefano, A.L., Jones, L., Haines, J.L., Deleuze, J.-F., Owen, M.J., Gudnason, V., Mayeux, R., Escott-Price, V., Psaty, B.M., Ramirez, A., Wang, L.-S., Ruiz, A., van Duijn, C.M., Holmans, P.A., Seshadri, S., Williams, J., Amouyel, P., Schellenberg, G.D., Lambert, J.-C., Pericak-Vance, M.A., Alzheimer Disease Genetics Consortium (ADGC), European Alzheimer's Disease Initiative (EADI), Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology Consortium (CHARGE), Genetic and Environmental Risk in AD/Defining Genetic, Polygenic and Environmental Risk for Alzheimer's Disease Consortium (GERAD/PERADES), 2019. Genetic meta-analysis of diagnosed Alzheimer's disease identifies new risk loci and implicates A $\beta$ , tau, immunity and lipid processing. *Nat. Genet.* 51, 414–430. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0358-2>
- Lamagna, C., Bergers, G., 2006. The bone marrow constitutes a reservoir of pericyte progenitors. *J. Leukoc. Biol.* 80, 677–681. <https://doi.org/10.1189/jlb.0506309>
- Lambert, J.C., Ibrahim-Verbaas, C.A., Harold, D., Naj, A.C., Sims, R., Bellenguez, C., DeStafano, A.L., Bis, J.C., Beecham, G.W., Grenier-Boley, B., Russo, G., Thorton-Wells, T.A., Jones, N., Smith, A.V., Chouraki, V., Thomas, C., Ikram, M.A., Zelenika, D., Vardarajan, B.N., Kamatani, Y., Lin, C.F., Gerrish, A., Schmidt, H., Kunkle, B., Dunstan, M.L., Ruiz, A., Bihoreau, M.T., Choi, S.H., Reitz, C., Pasquier, F., Cruchaga, C., Craig, D., Amin, N., Berr, C., Lopez, O.L., De Jager, P.L., Deramecourt, V., Johnston, J.A., Evans, D., Lovestone, S., Letenneur, L., Morón, F.J., Rubinsztein, D.C., Eiriksdottir, G., Sleegers, K., Goate, A.M., Fiévet, N., Huentelman, M.W., Gill, M., Brown, K., Kamboh, M.I., Keller, L., Barberger-Gateau, P., McGuinness, B., Larson, E.B., Green, R., Myers, A.J., Dufouil, C., Todd, S., Wallon, D., Love, S., Rogaeva, E., Gallacher, J., St George-Hyslop, P., Clarimon, J., Lleo, A., Bayer, A., Tsuang, D.W., Yu, L., Tsolaki, M., Bossù, P., Spalletta, G., Proitsi, P., Collinge, J., Sorbi, S., Sanchez-Garcia, F., Fox, N.C., Hardy, J., Deniz Naranjo, M.C., Bosco, P., Clarke, R., Brayne, C., Galimberti, D., Mancuso, M., Matthews, F., European Alzheimer's Disease Initiative (EADI), Genetic and Environmental Risk in Alzheimer's Disease, Alzheimer's Disease Genetic Consortium, Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology, Moebus, S., Mecocci, P., Del Zompo, M., Maier, W., Hampel, H., Pilotto, A., Bullido, M., Panza, F., Caffarra, P., Nacmias, B., Gilbert, J.R., Mayhaus, M., Lannefelt, L., Hakonarson, H., Pichler, S., Carrasquillo, M.M., Ingelsson, M., Beekly, D., Alvarez, V., Zou, F., Valladares, O., Younkin, S.G., Coto, E., Hamilton-Nelson, K.L., Gu, W., Razquin, C., Pastor, P., Mateo, I., Owen, M.J., Faber, K.M., Jonsson, P.V., Combarros, O., O'Donovan, M.C., Cantwell, L.B., Soininen, H., Blacker, D., Mead, S., Mosley, T.H., Bennett, D.A., Harris, T.B., Fratiglioni, L.,

- Holmes, C., de Bruijn, R.F., Passmore, P., Montine, T.J., Bettens, K., Rotter, J.I., Brice, A., Morgan, K., Foroud, T.M., Kukull, W.A., Hannequin, D., Powell, J.F., Nalls, M.A., Ritchie, K., Lunetta, K.L., Kauwe, J.S., Boerwinkle, E., Riemenschneider, M., Boada, M., Hiltunen, M., Martin, E.R., Schmidt, R., Rujescu, D., Wang, L.S., Dartigues, J.F., Mayeux, R., Tzourio, C., Hofman, A., Nöthen, M.M., Graff, C., Psaty, B.M., Jones, L., Haines, J.L., Holmans, P.A., Lathrop, M., Pericak-Vance, M.A., Launer, L.J., Farrer, L.A., van Duijn, C.M., Van Broeckhoven, C., Moskvina, V., Seshadri, S., Williams, J., Schellenberg, G.D., Amouyel, P., 2013. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 45, 1452–1458. <https://doi.org/10.1038/ng.2802>
- Lane, C.A., Hardy, J., Schott, J.M., 2018. Alzheimer's disease. *Eur. J. Neurol.* 25, 59–70. <https://doi.org/10.1111/ene.13439>
- Lanz, T.A., Carter, D.B., Merchant, K.M., 2003. Dendritic spine loss in the hippocampus of young PDAPP and Tg2576 mice and its prevention by the ApoE2 genotype. *Neurobiol. Dis.* 13, 246–253.
- Lavin, D.N., Joesting, J.J., Chiu, G.S., Moon, M.L., Meng, J., Dilger, R.N., Freund, G.G., 2011. Fasting induces an anti-inflammatory effect on the neuroimmune system which a high-fat diet prevents. *Obes. Silver Spring Md* 19, 1586–1594. <https://doi.org/10.1038/oby.2011.73>
- Lazic, D., Sagare, A.P., Nikolakopoulou, A.M., Griffin, J.H., Vassar, R., Zlokovic, B.V., 2019. 3K3A-activated protein C blocks amyloidogenic BACE1 pathway and improves functional outcome in mice. *J. Exp. Med.* 216, 279–293. <https://doi.org/10.1084/jem.20181035>
- Lee, J.K., Kim, N.-J., 2017. Recent Advances in the Inhibition of p38 MAPK as a Potential Strategy for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Mol. Basel Switz.* 22. <https://doi.org/10.3390/molecules22081287>
- Leibrock, J., Lottspeich, F., Hohn, A., Hofer, M., Hengerer, B., Masiakowski, P., Thoenen, H., Barde, Y.A., 1989. Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 341, 149–152. <https://doi.org/10.1038/341149a0>
- Lesné, S., Koh, M.T., Kotilinek, L., Kaye, R., Glabe, C.G., Yang, A., Gallagher, M., Ashe, K.H., 2006. A specific amyloid- $\beta$  protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 440, 352–357. <https://doi.org/10.1038/nature04533>
- Leszek, J., Md Ashraf, G., Tse, W.H., Zhang, J., Gasiorowski, K., Avila-Rodriguez, M.F., Tarasov, V.V., Barreto, G.E., Klochkov, S.G., Bachurin, S.O., Aliev, G., 2017. Nanotechnology for Alzheimer Disease. *Curr. Alzheimer Res.* 14, 1182–1189. <https://doi.org/10.2174/1567205014666170203125008>
- Lewerenz, J., Maher, P., 2015. Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases—What is the Evidence? *Front. Neurosci.* 9. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00469>
- Lin, B., Hasegawa, Y., Takane, K., Koibuchi, N., Cao, C., Kim-Mitsuyama, S., 2016. High-Fat-Diet Intake Enhances Cerebral Amyloid Angiopathy and Cognitive Impairment in a Mouse Model of Alzheimer's Disease, Independently of Metabolic Disorders. *J. Am. Heart Assoc.* 5. <https://doi.org/10.1161/JAHA.115.003154>

- Liu, Q.-F., Yu, H.-W., Sun, L.-L., You, L., Tao, G.-Z., Qu, B.-Z., 2015. Apelin-13 upregulates Egr-1 expression in rat vascular smooth muscle cells through the PI3K/Akt and PKC signaling pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 468, 617–621. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.10.171>
- Liu, X.-B., Murray, K.D., 2012. Neuronal excitability and calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II: location, location, location. *Epilepsia* 53 Suppl 1, 45–52. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2012.03474.x>
- Lončarević-Vasiljković, N., Pešić, V., Tanić, N., Milanović, D., Popić, J., Kanazir, S., Ruždijić, S., 2009. Changes in markers of neuronal and glial plasticity after cortical injury induced by food restriction. *Exp. Neurol.* 220, 198–206. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.08.024>
- Loncarevic-Vasiljkovic, N., Pesic, V., Todorovic, S., Popic, J., Smiljanic, K., Milanovic, D., Ruzdijic, S., Kanazir, S., 2012. Caloric restriction suppresses microglial activation and prevents neuroapoptosis following cortical injury in rats. *PloS One* 7, e37215. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037215>
- Luchsinger, J.A., Tang, M.-X., Shea, S., Mayeux, R., 2002. Caloric intake and the risk of Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 59, 1258–1263.
- Luong, T.N., Carlisle, H.J., Southwell, A., Patterson, P.H., 2011. Assessment of motor balance and coordination in mice using the balance beam. *J. Vis. Exp. JoVE.* <https://doi.org/10.3791/2376>
- Maisonpierre, P.C., Belluscio, L., Squinto, S., Ip, N.Y., Furth, M.E., Lindsay, R.M., Yancopoulos, G.D., 1990. Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science* 247, 1446–1451. <https://doi.org/10.1126/science.2321006>
- Maki, T., Maeda, M., Uemura, M., Lo, E.K., Terasaki, Y., Liang, A.C., Shindo, A., Choi, Y.K., Taguchi, A., Matsuyama, T., Takahashi, R., Ihara, M., Arai, K., 2015. Potential interactions between pericytes and oligodendrocyte precursor cells in perivascular regions of cerebral white matter. *Neurosci. Lett.* 597, 164–169. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.04.047>
- Makin, S., 2018. The amyloid hypothesis on trial. *Nature* 559, S4–S7. <https://doi.org/10.1038/d41586-018-05719-4>
- Maltais, M., de Souto Barreto, P., Hooper, C., Payoux, P., Rolland, Y., Vellas, B., MAPT/DSA Study Group, 2019. Association between brain  $\beta$ -amyloid and frailty in older adults. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* <https://doi.org/10.1093/gerona/glz009>
- Marchesi, V.T., 2011. Alzheimer's dementia begins as a disease of small blood vessels, damaged by oxidative-induced inflammation and dysregulated amyloid metabolism: implications for early detection and therapy. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 25, 5–13. <https://doi.org/10.1096/fj.11-0102ufm>
- Maritzen, T., Koo, S.J., Haucke, V., 2012. Turning CALM into excitement: AP180 and CALM in endocytosis and disease. *Biol. Cell* 104, 588–602. <https://doi.org/10.1111/boc.201200008>
- Martin, B., Mattson, M.P., Maudsley, S., 2006. Caloric restriction and intermittent fasting: Two potential diets for successful brain aging. *Ageing Res. Rev.* 5, 332–353. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2006.04.002>

- Martín-Rapun, R., De Matteis, L., Ambrosone, A., Garcia-Embid, S., Gutierrez, L., de la Fuente, J.M., 2017. Targeted Nanoparticles for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Curr. Pharm. Des.* 23, 1927–1952. <https://doi.org/10.2174/1381612822666161226151011>
- Mattson, M.P., Longo, V.D., Harvie, M., 2017. Impact of intermittent fasting on health and disease processes. *Ageing Res. Rev., Nutritional interventions modulating aging and age-associated diseases* 39, 46–58. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.10.005>
- McCay, C.M., 1947. Effect of Restricted Feeding Upon Aging and Chronic Diseases in Rats and Dogs. *Am. J. Public Health Nations Health* 37, 521–528.
- McKenzie, I.A., Ohayon, D., Li, H., de Faria, J.P., Emery, B., Tohyama, K., Richardson, W.D., 2014. Motor skill learning requires active central myelination. *Science* 346, 318–322. <https://doi.org/10.1126/science.1254960>
- Meldrum, B., Garthwaite, J., 1990. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 11, 379–387.
- Merlini, M., Rafalski, V.A., Rios Coronado, P.E., Gill, T.M., Ellisman, M., Muthukumar, G., Subramanian, K.S., Ryu, J.K., Syme, C.A., Davalos, D., Seeley, W.W., Mucke, L., Nelson, R.B., Akassoglou, K., 2019. Fibrinogen Induces Microglia-Mediated Spine Elimination and Cognitive Impairment in an Alzheimer's Disease Model. *Neuron* 101, 1099–1108.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.01.014>
- Merthan, L., Haller, A., Thal, D.R., von Einem, B., von Arnim, C.A.F., 2019. The role of PTB domain containing adaptor proteins on PICALM-mediated APP endocytosis and localization. *Biochem. J.* 476, 2093–2109. <https://doi.org/10.1042/BCJ20180840>
- Miller, S.G., Kennedy, M.B., 1985. Distinct forebrain and cerebellar isozymes of type II Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase associate differently with the postsynaptic density fraction. *J. Biol. Chem.* 260, 9039–9046.
- Milner, P.G., Li, Y.S., Hoffman, R.M., Kodner, C.M., Siegel, N.R., Deuel, T.F., 1989. A novel 17 kD heparin-binding growth factor (HBGF-8) in bovine uterus: purification and N-terminal amino acid sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165, 1096–1103. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(89\)92715-0](https://doi.org/10.1016/0006-291x(89)92715-0)
- Misko, A., Ferguson, T., Notterpek, L., 2002. Matrix metalloproteinase mediated degradation of basement membrane proteins in Trembler J neuropathy nerves. *J. Neurochem.* 83, 885–894. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.01200.x>
- Mladenovic Djordjevic, A., Perovic, M., Tesic, V., Tanic, N., Rakic, L., Ruzdijic, S., Kanazir, S., 2010. Long-term dietary restriction modulates the level of presynaptic proteins in the cortex and hippocampus of the aging rat. *Neurochem. Int.* 56, 250–255. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2009.10.008>
- Modern, F.S., Johnson, G.E., 1928. DIETETIC CONSIDERATIONS IN THE TREATMENT OF OBESITY. *Calif. West. Med.* 28, 660–666.
- Montagne, A., Barnes, S.R., Sweeney, M.D., Halliday, M.R., Sagare, A.P., Zhao, Z., Toga, A.W., Jacobs, R.E., Liu, C.Y., Amezcua, L., Harrington, M.G., Chui, H.C., Law, M., Zlokovic, B.V., 2015. Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus. *Neuron* 85, 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.032>

- Montagne, A., Nation, D.A., Pa, J., Sweeney, M.D., Toga, A.W., Zlokovic, B.V., 2016a. Brain imaging of neurovascular dysfunction in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 131, 687–707. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1570-0>
- Montagne, A., Nation, D.A., Pa, J., Sweeney, M.D., Toga, A.W., Zlokovic, B.V., 2016b. Brain imaging of neurovascular dysfunction in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 131, 687–707. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1570-0>
- Montagne, A., Nikolakopoulou, A.M., Zhao, Z., Sagare, A.P., Si, G., Lazic, D., Barnes, S.R., Daianu, M., Ramanathan, A., Go, A., Lawson, E.J., Wang, Y., Mack, W.J., Thompson, P.M., Schneider, J.A., Varkey, J., Langen, R., Mullins, E., Jacobs, R.E., Zlokovic, B.V., 2018. Pericyte degeneration causes white matter dysfunction in the mouse central nervous system. *Nat. Med.* 24, 326–337. <https://doi.org/10.1038/nm.4482>
- Montagne, A., Zhao, Z., Zlokovic, B.V., 2017. Alzheimer's disease: A matter of blood-brain barrier dysfunction? *J. Exp. Med.* 214, 3151–3169. <https://doi.org/10.1084/jem.20171406>
- Montine, T.J., Koroshetz, W.J., Babcock, D., Dickson, D.W., Galpern, W.R., Glymour, M.M., Greenberg, S.M., Hutton, M.L., Knopman, D.S., Kuzmichev, A.N., Manly, J.J., Marder, K.S., Miller, B.L., Phelps, C.H., Seeley, W.W., Sieber, B.-A., Silverberg, N.B., Sutherland, M., Torborg, C.L., Waddy, S.P., Zlokovic, B.V., Corriveau, R.A., ADRD 2013 Conference Organizing Committee, 2014. Recommendations of the Alzheimer's disease-related dementias conference. *Neurology* 83, 851–860. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000733>
- Moreau, K., Fleming, A., Imarisio, S., Lopez Ramirez, A., Mercer, J.L., Jimenez-Sanchez, M., Bento, C.F., Puri, C., Zavodszky, E., Siddiqi, F., Lavau, C.P., Betton, M., O'Kane, C.J., Wechsler, D.S., Rubinsztein, D.C., 2014. PICALM modulates autophagy activity and tau accumulation. *Nat. Commun.* 5, 4998. <https://doi.org/10.1038/ncomms5998>
- Morgen, K., Ramirez, A., Frölich, L., Tost, H., Plichta, M.M., Kölsch, H., Rakebrandt, F., Rienhoff, O., Jessen, F., Peters, O., Jahn, H., Luckhaus, C., Hüll, M., Gertz, H.-J., Schröder, J., Hampel, H., Teipel, S.J., Pantel, J., Heuser, I., Wiltfang, J., Rütger, E., Kornhuber, J., Maier, W., Meyer-Lindenberg, A., 2014. Genetic interaction of PICALM and APOE is associated with brain atrophy and cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 10, S269-276. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2013.11.001>
- Mosesson, M.W., 2005. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J. Thromb. Haemost.* JTH 3, 1894–1904. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01365.x>
- Mouton, P.R., Chachich, M.E., Quigley, C., Spangler, E., Ingram, D.K., 2009. Caloric restriction attenuates amyloid deposition in middle-aged dtg APP/PS1 mice. *Neurosci. Lett.* 464, 184–187. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.08.038>
- Mudshinge, S.R., Deore, A.B., Patil, S., Bhalgat, C.M., 2011. Nanoparticles: Emerging carriers for drug delivery. *Saudi Pharm. J. SPJ Off. Publ. Saudi Pharm. Soc.* 19, 129–141. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2011.04.001>
- Mullard, A., 2019. Anti-amyloid failures stack up as Alzheimer antibody flops. *Nat. Rev. Drug Discov.* <https://doi.org/10.1038/d41573-019-00064-1>

- Müller, S.M., Stolt, C.C., Terszowski, G., Blum, C., Amagai, T., Kessarlis, N., Iannarelli, P., Richardson, W.D., Wegner, M., Rodewald, H.-R., 2008. Neural crest origin of perivascular mesenchyme in the adult thymus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 180, 5344–5351. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.8.5344>
- Naj, A.C., Jun, G., Reitz, C., Kunkle, B.W., Perry, W., Park, Y.S., Beecham, G.W., Rajbhandary, R.A., Hamilton-Nelson, K.L., Wang, L.-S., Kauwe, J.S.K., Huentelman, M.J., Myers, A.J., Bird, T.D., Boeve, B.F., Baldwin, C.T., Jarvik, G.P., Crane, P.K., Rogaeva, E., Barmada, M.M., Demirci, F.Y., Cruchaga, C., Kramer, P.L., Ertekin-Taner, N., Hardy, J., Graff-Radford, N.R., Green, R.C., Larson, E.B., St George-Hyslop, P.H., Buxbaum, J.D., Evans, D.A., Schneider, J.A., Lunetta, K.L., Kamboh, M.I., Saykin, A.J., Reiman, E.M., De Jager, P.L., Bennett, D.A., Morris, J.C., Montine, T.J., Goate, A.M., Blacker, D., Tsuang, D.W., Hakonarson, H., Kukull, W.A., Foroud, T.M., Martin, E.R., Haines, J.L., Mayeux, R.P., Farrer, L.A., Schellenberg, G.D., Pericak-Vance, M.A., Alzheimer Disease Genetics Consortium, Albert, M.S., Albin, R.L., Apostolova, L.G., Arnold, S.E., Barber, R., Barnes, L.L., Beach, T.G., Becker, J.T., Beekly, D., Bigio, E.H., Bowen, J.D., Boxer, A., Burke, J.R., Cairns, N.J., Cantwell, L.B., Cao, C., Carlson, C.S., Carney, R.M., Carrasquillo, M.M., Carroll, S.L., Chui, H.C., Clark, D.G., Corneveaux, J., Cribbs, D.H., Crocco, E.A., DeCarli, C., DeKosky, S.T., Dick, M., Dickson, D.W., Duara, R., Faber, K.M., Fallon, K.B., Farlow, M.R., Ferris, S., Frosch, M.P., Galasko, D.R., Ganguli, M., Gearing, M., Geschwind, D.H., Ghetti, B., Gilbert, J.R., Glass, J.D., Growdon, J.H., Hamilton, R.L., Harrell, L.E., Head, E., Honig, L.S., Hulette, C.M., Hyman, B.T., Jicha, G.A., Jin, L.-W., Karydas, A., Kaye, J.A., Kim, R., Koo, E.H., Kowall, N.W., Kramer, J.H., LaFerla, F.M., Lah, J.J., Leverenz, J.B., Levey, A.I., Li, G., Lieberman, A.P., Lin, C.-F., Lopez, O.L., Lyketsos, C.G., Mack, W.J., Martiniuk, F., Mash, D.C., Masliah, E., McCormick, W.C., McCurry, S.M., McDavid, A.N., McKee, A.C., Mesulam, M., Miller, B.L., Miller, C.A., Miller, J.W., Murrell, J.R., Olichney, J.M., Pankratz, V.S., Parisi, J.E., Paulson, H.L., Peskind, E., Petersen, R.C., Pierce, A., Poon, W.W., Potter, H., Quinn, J.F., Raj, A., Raskind, M., Reisberg, B., Ringman, J.M., Roberson, E.D., Rosen, H.J., Rosenberg, R.N., Sano, M., Schneider, L.S., Seeley, W.W., Smith, A.G., Sonnen, J.A., Spina, S., Stern, R.A., Tanzi, R.E., Thornton-Wells, T.A., Trojanowski, J.Q., Troncoso, J.C., Valladares, O., Van Deerlin, V.M., Van Eldik, L.J., Vardarajan, B.N., Vinters, H.V., Vonsattel, J.P., Weintraub, S., Welsh-Bohmer, K.A., Williamson, J., Wishnek, S., Woltjer, R.L., Wright, C.B., Younkin, S.G., Yu, C.-E., Yu, L., 2014. Effects of multiple genetic loci on age at onset in late-onset Alzheimer disease: a genome-wide association study. *JAMA Neurol.* 71, 1394–1404. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2014.1491>
- Nation, D.A., Sweeney, M.D., Montagne, A., Sagare, A.P., D’Orazio, L.M., Pachicano, M., Sepelband, F., Nelson, A.R., Buennagel, D.P., Harrington, M.G., Benzinger, T.L.S., Fagan, A.M., Ringman, J.M., Schneider, L.S., Morris, J.C., Chui, H.C., Law, M., Toga, A.W., Zlokovic, B.V., 2019. Blood-brain barrier breakdown is an early biomarker of human cognitive dysfunction. *Nat. Med.* 25, 270–276. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0297-y>

- Ndountse, L.T., Chan, H.M., 2009. Role of N-methyl-D-aspartate receptors in polychlorinated biphenyl mediated neurotoxicity. *Toxicol. Lett.* 184, 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.10.013>
- Nelson, A.R., Sweeney, M.D., Sagare, A.P., Zlokovic, B.V., 2016. Neurovascular dysfunction and neurodegeneration in dementia and Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1862, 887–900. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.12.016>
- Ni, J., Ohta, H., Matsumoto, K., Watanabe, H., 1994. Progressive cognitive impairment following chronic cerebral hypoperfusion induced by permanent occlusion of bilateral carotid arteries in rats. *Brain Res.* 653, 231–236. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)90394-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)90394-8)
- Nikolakopoulou, A.M., Montagne, A., Kisler, K., Dai, Z., Wang, Y., Huuskonen, M.T., Sagare, A.P., Lazic, D., Sweeney, M.D., Kong, P., Wang, M., Owens, N.C., Lawson, E.J., Xie, X., Zhao, Z., Zlokovic, B.V., 2019. Pericyte loss leads to circulatory failure and pleiotrophin depletion causing neuron loss. *Nat. Neurosci.* 22, 1089–1098. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0434-z>
- Nikolakopoulou, A.M., Zhao, Z., Montagne, A., Zlokovic, B.V., 2017. Regional early and progressive loss of brain pericytes but not vascular smooth muscle cells in adult mice with disrupted platelet-derived growth factor receptor- $\beta$  signaling. *PloS One* 12, e0176225. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176225>
- Oakley, H., Cole, S.L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., Guillozet-Bongaarts, A., Ohno, M., Disterhoft, J., Van Eldik, L., Berry, R., Vassar, R., 2006. Intra-neuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 10129–10140. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1202-06.2006>
- Obermeier, B., Daneman, R., Ransohoff, R.M., 2013. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat. Med.* 19, 1584–1596. <https://doi.org/10.1038/nm.3407>
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y., LaFerla, F.M., 2003. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A $\beta$  and synaptic dysfunction. *Neuron* 39, 409–421.
- Pan, W., Kastin, A.J., 2014. Can sleep apnea cause Alzheimer's disease? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 47, 656–669. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.10.019>
- Panza, F., Lozupone, M., Logroscino, G., Imbimbo, B.P., 2019. A critical appraisal of amyloid- $\beta$ -targeting therapies for Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* 15, 73–88. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0116-6>
- Pardridge, W.M., 2012. Drug transport across the blood-brain barrier. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 32, 1959–1972. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.126>
- Parikh, I., Fardo, D.W., Estus, S., 2014. Genetics of PICALM expression and Alzheimer's disease. *PloS One* 9, e91242. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091242>
- Parinejad, N., Keshavarzi, S., Movahedin, M., Raza, M., 2009. Behavioral and histological assessment of the effect of intermittent feeding in the pilocarpine model of temporal

- lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 86, 54–65.  
<https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2009.05.003>
- Park, J.-C., Baik, S.H., Han, S.-H., Cho, H.J., Choi, Hyunjung, Kim, H.J., Choi, Heesun, Lee, W., Kim, D.K., Mook-Jung, I., 2017. Annexin A1 restores A $\beta$ 1-42 -induced blood-brain barrier disruption through the inhibition of RhoA-ROCK signaling pathway. *Aging Cell* 16, 149–161. <https://doi.org/10.1111/accel.12530>
- Patel, N.V., Gordon, M.N., Connor, K.E., Good, R.A., Engelman, R.W., Mason, J., Morgan, D.G., Morgan, T.E., Finch, C.E., 2005. Caloric restriction attenuates Abeta-deposition in Alzheimer transgenic models. *Neurobiol. Aging* 26, 995–1000. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2004.09.014>
- Paul, J., Strickland, S., Melchor, J.P., 2007. Fibrin deposition accelerates neurovascular damage and neuroinflammation in mouse models of Alzheimer’s disease. *J. Exp. Med.* 204, 1999–2008. <https://doi.org/10.1084/jem.20070304>
- Petersen, M.A., Ryu, J.K., Akassoglou, K., 2018. Fibrinogen in neurological diseases: mechanisms, imaging and therapeutics. *Nat. Rev. Neurosci.* 19, 283–301. <https://doi.org/10.1038/nrn.2018.13>
- Petralia, R.S., Wang, Y.-X., Indig, F.E., Bushlin, I., Wu, F., Mattson, M.P., Yao, P.J., 2013. Reduction of AP180 and CALM produces defects in synaptic vesicle size and density. *Neuromolecular Med.* 15, 49–60. <https://doi.org/10.1007/s12017-012-8194-x>
- Phillips, R.G., LeDoux, J.E., 1992. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav. Neurosci.* 106, 274–285.
- Pribiag, H., Stellwagen, D., 2013. TNF- $\alpha$  Downregulates Inhibitory Neurotransmission through Protein Phosphatase 1-Dependent Trafficking of GABAA Receptors. *J. Neurosci.* 33, 15879–15893. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0530-13.2013>
- Qin, W., Chachich, M., Lane, M., Roth, G., Bryant, M., de Cabo, R., Ottinger, M.A., Mattison, J., Ingram, D., Gandy, S., Pasinetti, G.M., 2006. Calorie restriction attenuates Alzheimer’s disease type brain amyloidosis in Squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *J. Alzheimers Dis. JAD* 10, 417–422.
- Rajantie, I., Ilmonen, M., Alminaitte, A., Ozerdem, U., Alitalo, K., Salven, P., 2004. Adult bone marrow-derived cells recruited during angiogenesis comprise precursors for periendothelial vascular mural cells. *Blood* 104, 2084–2086. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-01-0336>
- Ramanathan, A., Nelson, A.R., Sagare, A.P., Zlokovic, B.V., 2015. Impaired vascular-mediated clearance of brain amyloid beta in Alzheimer’s disease: the role, regulation and restoration of LRP1. *Front. Aging Neurosci.* 7, 136. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00136>
- Ramirez, L.M., Goukasian, N., Porat, S., Hwang, K.S., Eastman, J.A., Hurtz, S., Wang, B., Vang, N., Sears, R., Klein, E., Coppola, G., Apostolova, L.G., 2016. Common variants in ABCA7 and MS4A6A are associated with cortical and hippocampal atrophy. *Neurobiol. Aging* 39, 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.10.037>
- Ransohoff, R.M., Perry, V.H., 2009. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 119–145. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132528>

- Rapoport, S.I., 2000. Osmotic opening of the blood-brain barrier: principles, mechanism, and therapeutic applications. *Cell. Mol. Neurobiol.* 20, 217–230.
- Rauvala, H., 1989. An 18-kd heparin-binding protein of developing brain that is distinct from fibroblast growth factors. *EMBO J.* 8, 2933–2941.
- Robertson, R.T., Levine, S.T., Haynes, S.M., Gutierrez, P., Baratta, J.L., Tan, Z., Longmuir, K.J., 2015. Use of labeled tomato lectin for imaging vasculature structures. *Histochem. Cell Biol.* 143, 225–234. <https://doi.org/10.1007/s00418-014-1301-3>
- Rothstein, J.D., 1996. Excitotoxicity hypothesis. *Neurology* 47, S19-25; discussion S26. [https://doi.org/10.1212/wnl.47.4\\_suppl\\_2.19s](https://doi.org/10.1212/wnl.47.4_suppl_2.19s)
- Rudinskiy, N., Grishchuk, Y., Vaslin, A., Puyal, J., Delacourte, A., Hirling, H., Clarke, P.G.H., Luthi-Carter, R., 2009. Calpain hydrolysis of alpha- and beta2-adaptins decreases clathrin-dependent endocytosis and may promote neurodegeneration. *J. Biol. Chem.* 284, 12447–12458. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804740200>
- Ryu, J.K., Petersen, M.A., Murray, S.G., Baeten, K.M., Meyer-Franke, A., Chan, J.P., Vagena, E., Bedard, C., Machado, M.R., Rios Coronado, P.E., Prod'homme, T., Charo, I.F., Lassmann, H., Degen, J.L., Zamvil, S.S., Akassoglou, K., 2015. Blood coagulation protein fibrinogen promotes autoimmunity and demyelination via chemokine release and antigen presentation. *Nat. Commun.* 6, 8164. <https://doi.org/10.1038/ncomms9164>
- Sacher, 1977. Life table modification and life prolongation, in: Caleb Finch, Leonard Hayflick (Eds.), *Handbook of the Biology of Aging*. Van Nostrand Reinhold New York, pp. 582–638.
- Sadleir, K.R., Eimer, W.A., Cole, S.L., Vassar, R., 2015. A $\beta$  reduction in BACE1 heterozygous null 5XFAD mice is associated with transgenic APP level. *Mol. Neurodegener.* 10, 1. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-10-1>
- Sagare, A.P., Bell, R.D., Srivastava, A., Sengillo, J.D., Singh, I., Nishida, Y., Chow, N., Zlokovic, B.V., 2013a. A lipoprotein receptor cluster IV mutant preferentially binds amyloid- $\beta$  and regulates its clearance from the mouse brain. *J. Biol. Chem.* 288, 15154–15166. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.439570>
- Sagare, A.P., Bell, R.D., Zhao, Z., Ma, Q., Winkler, E.A., Ramanathan, A., Zlokovic, B.V., 2013b. Pericyte loss influences Alzheimer-like neurodegeneration in mice. *Nat. Commun.* 4, 2932. <https://doi.org/10.1038/ncomms3932>
- Sagare, A.P., Sweeney, M.D., Makshanoff, J., Zlokovic, B.V., 2015. Shedding of soluble platelet-derived growth factor receptor- $\beta$  from human brain pericytes. *Neurosci. Lett.* 607, 97–101. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.09.025>
- Saito, S., Ihara, M., 2016. Interaction between cerebrovascular disease and Alzheimer pathology. *Curr. Opin. Psychiatry* 29, 168–173. <https://doi.org/10.1097/YCO.0000000000000239>
- Sances, S., Ho, R., Vatine, G., West, D., Laperle, A., Meyer, A., Godoy, M., Kay, P.S., Mandefro, B., Hatata, S., Hinojosa, C., Wen, N., Sareen, D., Hamilton, G.A., Svendsen, C.N., 2018. Human iPSC-Derived Endothelial Cells and Microengineered Organ-Chip Enhance Neuronal Development. *Stem Cell Rep.* 10, 1222–1236. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.02.012>

- Saykin, A.J., Shen, L., Foroud, T.M., Potkin, S.G., Swaminathan, S., Kim, S., Risacher, S.L., Nho, K., Huentelman, M.J., Craig, D.W., Thompson, P.M., Stein, J.L., Moore, J.H., Farrer, L.A., Green, R.C., Bertram, L., Jack, C.R., Weiner, M.W., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, 2010. Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative biomarkers as quantitative phenotypes: Genetics core aims, progress, and plans. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 6, 265–273. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2010.03.013>
- Schachtrup, C., Lu, P., Jones, L.L., Lee, J.K., Lu, J., Sachs, B.D., Zheng, B., Akassoglou, K., 2007. Fibrinogen inhibits neurite outgrowth via beta 3 integrin-mediated phosphorylation of the EGF receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 11814–11819. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704045104>
- Schafer, M.J., Alldred, M.J., Lee, S.H., Calhoun, M.E., Petkova, E., Mathews, P.M., Ginsberg, S.D., 2015. Reduction of  $\beta$ -amyloid and  $\gamma$ -secretase by calorie restriction in female Tg2576 mice. *Neurobiol. Aging* 36, 1293–1302. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.10.043>
- Schallert, T., Upchurch, M., Lobaugh, N., Farrar, S.B., Spirduso, W.W., Gilliam, P., Vaughn, D., Wilcox, R.E., 1982. Tactile extinction: distinguishing between sensorimotor and motor asymmetries in rats with unilateral nigrostriatal damage. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 16, 455–462. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(82\)90452-x](https://doi.org/10.1016/0091-3057(82)90452-x)
- Schalomon, P.M., Wahlsten, D., 2002. Wheel running behavior is impaired by both surgical section and genetic absence of the mouse corpus callosum. *Brain Res. Bull.* 57, 27–33.
- Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T.D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., Larson, E., Levy-Lahad, E., Viitanen, M., Peskind, E., Poorkaj, P., Schellenberg, G., Tanzi, R., Wasco, W., Lannfelt, L., Selkoe, D., Younkin, S., 1996. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 2, 864–870.
- Schmidt, R., Kienbacher, E., Benke, T., Dal-Bianco, P., Delazer, M., Ladurner, G., Jellinger, K., Marksteiner, J., Ransmayr, G., Schmidt, H., Stögmann, E., Friedrich, J., Wehringer, C., 2008. [Sex differences in Alzheimer's disease]. *Neuropsychiatr. Klin. Diagn. Ther. Rehabil. Organ Ges. Osterreichischer Nervenarzte Psychiater* 22, 1–15.
- Scholz, J., Niibori, Y., W Frankland, P., P Lerch, J., 2015. Rotarod training in mice is associated with changes in brain structure observable with multimodal MRI. *NeuroImage* 107, 182–189. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.12.003>
- Seibenhener, M.L., Wooten, M.C., 2015. Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J. Vis. Exp. JoVE* e52434. <https://doi.org/10.3791/52434>
- Seki, M., Kasama, K., Imai, K., 2000. Effect of food restriction on hepatotoxicity of carbon tetrachloride in rats. *J. Toxicol. Sci.* 25, 33–40.
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M.P., Masliah, E., Hyman, B.T., 2011. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 1, a006189. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006189>

- Sharma, S., Kaur, G., 2005. Neuroprotective potential of dietary restriction against kainate-induced excitotoxicity in adult male Wistar rats. *Brain Res. Bull.* 67, 482–491. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2005.07.015>
- Shi, Y., Hung, S.-T., Rocha, G., Lin, S., Linares, G.R., Staats, K.A., Seah, C., Wang, Y., Chickering, M., Lai, J., Sugawara, T., Sagare, A.P., Zlokovic, B.V., Ichida, J.K., 2019. Identification and therapeutic rescue of autophagosome and glutamate receptor defects in C9ORF72 and sporadic ALS neurons. *JCI Insight* 5. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.127736>
- Shi, Y., Lin, S., Staats, K.A., Li, Y., Chang, W.-H., Hung, S.-T., Hendricks, E., Linares, G.R., Wang, Y., Son, E.Y., Wen, X., Kisler, K., Wilkinson, B., Menendez, L., Sugawara, T., Woolwine, P., Huang, M., Cowan, M.J., Ge, B., Koutsodendris, N., Sandor, K.P., Komberg, J., Vangoor, V.R., Senthilkumar, K., Hennes, V., Seah, C., Nelson, A.R., Cheng, T.-Y., Lee, S.-J.J., August, P.R., Chen, J.A., Wisniewski, N., Hanson-Smith, V., Belgard, T.G., Zhang, A., Coba, M., Grunseich, C., Ward, M.E., van den Berg, L.H., Pasterkamp, R.J., Trotti, D., Zlokovic, B.V., Ichida, J.K., 2018. Haploinsufficiency leads to neurodegeneration in C9ORF72 ALS/FTD human induced motor neurons. *Nat. Med.* 24, 313–325. <https://doi.org/10.1038/nm.4490>
- Shibata, M., Yamasaki, N., Miyakawa, T., Kalaria, R.N., Fujita, Y., Ohtani, R., Ihara, M., Takahashi, R., Tomimoto, H., 2007. Selective impairment of working memory in a mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke J. Cereb. Circ.* 38, 2826–2832. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.490151>
- Shojaie, M., Ghanbari, F., Shojaie, N., 2017. Intermittent fasting could ameliorate cognitive function against distress by regulation of inflammatory response pathway. *J. Adv. Res.* 8, 697–701. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.09.002>
- Singh, R., Lakhanpal, D., Kumar, S., Sharma, S., Kataria, H., Kaur, M., Kaur, G., 2012. Late-onset intermittent fasting dietary restriction as a potential intervention to retard age-associated brain function impairments in male rats. *Age Dordr. Neth.* 34, 917–933. <https://doi.org/10.1007/s11357-011-9289-2>
- Singh, R., Manchanda, S., Kaur, T., Kumar, S., Lakhanpal, D., Lakhman, S.S., Kaur, G., 2015. Middle age onset short-term intermittent fasting dietary restriction prevents brain function impairments in male Wistar rats. *Biogerontology* 16, 775–788. <https://doi.org/10.1007/s10522-015-9603-y>
- Smiljanic, K., Todorovic, S., Mladenovic Djordjevic, A., Vanmierlo, T., Lütjohann, D., Ivkovic, S., Kanazir, S., 2018. Limited daily feeding and intermittent feeding have different effects on regional brain energy homeostasis during aging. *Biogerontology* 19, 121–132. <https://doi.org/10.1007/s10522-018-9743-y>
- Smiljanic, K., Vanmierlo, T., Mladenovic Djordjevic, A., Perovic, M., Ivkovic, S., Lütjohann, D., Kanazir, S., 2014. Cholesterol metabolism changes under long-term dietary restrictions while the cholesterol homeostasis remains unaffected in the cortex and hippocampus of aging rats. *Age Dordr. Neth.* 36, 9654. <https://doi.org/10.1007/s11357-014-9654-z>
- Snyder, H.M., Corriveau, R.A., Craft, S., Faber, J.E., Greenberg, S.M., Knopman, D., Lamb, B.T., Montine, T.J., Nedergaard, M., Schaffer, C.B., Schneider, J.A., Wellington, C., Wilcock, D.M., Zipfel, G.J., Zlokovic, B., Bain, L.J., Bosetti, F., Galis, Z.S., Korshetz, W., Carrillo, M.C., 2015. Vascular contributions to cognitive

- impairment and dementia including Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 11, 710–717. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2014.10.008>
- Sohal, R.S., Ferguson, M., Sohal, B.H., Forster, M.J., 2009. Life Span Extension in Mice by Food Restriction Depends on an Energy Imbalance. *J. Nutr.* 139, 533–539. <https://doi.org/10.3945/jn.108.100313>
- Sohal, R.S., Forster, M.J., 2014. Caloric restriction and the aging process: a critique. *Free Radic. Biol. Med.* 73, 366–382. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.05.015>
- Song, A.J., Palmiter, R.D., 2018. Detecting and Avoiding Problems When Using the Cre-lox System. *Trends Genet. TIG* 34, 333–340. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.12.008>
- Spangenberg, E.E., Lee, R.J., Najafi, A.R., Rice, R.A., Elmore, M.R.P., Blurton-Jones, M., West, B.L., Green, K.N., 2016. Eliminating microglia in Alzheimer's mice prevents neuronal loss without modulating amyloid- $\beta$  pathology. *Brain J. Neurol.* 139, 1265–1281. <https://doi.org/10.1093/brain/aww016>
- Speakman, J.R., Mitchell, S.E., 2011. Caloric restriction. *Mol. Aspects Med.* 32, 159–221. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2011.07.001>
- Sperling, R.A., Aisen, P.S., Beckett, L.A., Bennett, D.A., Craft, S., Fagan, A.M., Iwatsubo, T., Jack, C.R., Kaye, J., Montine, T.J., Park, D.C., Reiman, E.M., Rowe, C.C., Siemers, E., Stern, Y., Yaffe, K., Carrillo, M.C., Thies, B., Morrison-Bogorad, M., Wagster, M.V., Phelps, C.H., 2011. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 7, 280–292. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.003>
- Spriggs, E.I., 1916. THE FASTING TREATMENT OF DIABETES. *Br. Med. J.* 1, 841–845. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.2894.841>
- Stellwagen, D., Beattie, E.C., Seo, J.Y., Malenka, R.C., 2005. Differential Regulation of AMPA Receptor and GABA Receptor Trafficking by Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ . *J. Neurosci.* 25, 3219–3228. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4486-04.2005>
- Stover, K.R., Campbell, M.A., Van Winssen, C.M., Brown, R.E., 2015. Early detection of cognitive deficits in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *Behav. Brain Res.* 289, 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.04.012>
- Strickland, S., 2018. Blood will out: vascular contributions to Alzheimer's disease. *J. Clin. Invest.* 128, 556–563. <https://doi.org/10.1172/JCI97509>
- Sun, D., Muthukumar, A.R., Lawrence, R.A., Fernandes, G., 2001. Effects of Calorie Restriction on Polymicrobial Peritonitis Induced by Cecum Ligation and Puncture in Young C57BL/6 Mice. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8, 1003–1011. <https://doi.org/10.1128/CDLI.8.5.1003-1011.2001>
- Sweeney, M.D., Ayyadurai, S., Zlokovic, B.V., 2016. Pericytes of the neurovascular unit: key functions and signaling pathways. *Nat. Neurosci.* 19, 771–783. <https://doi.org/10.1038/nn.4288>
- Sweeney, M.D., Sagare, A.P., Zlokovic, B.V., 2018. Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurol.* 14, 133–150. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.188>

- Sweeney, M.D., Sagare, A.P., Zlokovic, B.V., 2015. Cerebrospinal fluid biomarkers of neurovascular dysfunction in mild dementia and Alzheimer's disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 35, 1055–1068. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2015.76>
- Sweeney, M.D., Zhao, Z., Montagne, A., Nelson, A.R., Zlokovic, B.V., 2019. Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. *Physiol. Rev.* 99, 21–78. <https://doi.org/10.1152/physrev.00050.2017>
- Tallquist, M.D., French, W.J., Soriano, P., 2003. Additive effects of PDGF receptor beta signaling pathways in vascular smooth muscle cell development. *PLoS Biol.* 1, E52. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000052>
- Tanzi, R.E., 2012. The genetics of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006296>
- Terry, R.D., Masliah, E., Salmon, D.P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L.A., Katzman, R., 1991. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann. Neurol.* 30, 572–580. <https://doi.org/10.1002/ana.410300410>
- Thomas, M.N., Kufeldt, J., Kisser, U., Hornung, H.-M., Hoffmann, J., Andraschko, M., Werner, J., Rittler, P., 2016. Effects of malnutrition on complication rates, length of hospital stay, and revenue in elective surgical patients in the G-DRG-system. *Nutrition* 32, 249–254. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2015.08.021>
- Thomas, R.S., Henson, A., Gerrish, A., Jones, L., Williams, J., Kidd, E.J., 2016. Decreasing the expression of PICALM reduces endocytosis and the activity of  $\beta$ -secretase: implications for Alzheimer's disease. *BMC Neurosci.* 17, 50. <https://doi.org/10.1186/s12868-016-0288-1>
- Tian, Y., Chang, J.C., Fan, E.Y., Flajolet, M., Greengard, P., 2013. Adaptor complex AP2/PICALM, through interaction with LC3, targets Alzheimer's APP-CTF for terminal degradation via autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 17071–17076. <https://doi.org/10.1073/pnas.1315110110>
- Todorovic, S.T., Smiljanic, K.R., Ruzdijic, S.D., Djordjevic, A.N.M., Kanazir, S.D., 2018. Effects of Different Dietary Protocols on General Activity and Frailty of Male Wistar Rats During Aging. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 73, 1036–1044. <https://doi.org/10.1093/gerona/gly015>
- Toodayan, N., 2016. Professor Alois Alzheimer (1864-1915): Lest we forget. *J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas.* 31, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2015.12.032>
- Torres-Lista, V., López-Pousa, S., Giménez-Llort, L., 2015. Marble-burying is enhanced in 3xTg-AD mice, can be reversed by risperidone and it is modulable by handling. *Behav. Processes* 116, 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2015.05.001>
- Treusch, S., Hamamichi, S., Goodman, J.L., Matlack, K.E.S., Chung, C.Y., Baru, V., Shulman, J.M., Parrado, A., Bevis, B.J., Valastyan, J.S., Han, H., Lindhagen-Persson, M., Reiman, E.M., Evans, D.A., Bennett, D.A., Olofsson, A., DeJager, P.L., Tanzi, R.E., Caldwell, K.A., Caldwell, G.A., Lindquist, S., 2011. Functional links between A $\beta$  toxicity, endocytic trafficking, and Alzheimer's disease risk factors in yeast. *Science* 334, 1241–1245. <https://doi.org/10.1126/science.1213210>

- Trost, A., Lange, S., Schroedl, F., Bruckner, D., Motloch, K.A., Bogner, B., Kaser-Eichberger, A., Strohmaier, C., Runge, C., Aigner, L., Rivera, F.J., Reitsamer, H.A., 2016. Brain and Retinal Pericytes: Origin, Function and Role. *Front. Cell. Neurosci.* 10, 20. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00020>
- Van Cauwenberghe, C., Vandendriessche, C., Libert, C., Vandenbroucke, R.E., 2016. Caloric restriction: beneficial effects on brain aging and Alzheimer's disease. *Mamm. Genome Off. J. Int. Mamm. Genome Soc.* 27, 300–319. <https://doi.org/10.1007/s00335-016-9647-6>
- Van Damme, P., Bogaert, E., Dewil, M., Hersmus, N., Kiraly, D., Scheveneels, W., Bockx, I., Braeken, D., Verpoorten, N., Verhoeven, K., Timmerman, V., Herijgers, P., Callewaert, G., Carmeliet, P., Van Den Bosch, L., Robberecht, W., 2007. Astrocytes regulate GluR2 expression in motor neurons and their vulnerability to excitotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 14825–14830. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705046104>
- Vanlandewijck, M., He, L., Mäe, M.A., Andrae, J., Ando, K., Del Gaudio, F., Nahar, K., Lebouvier, T., Laviña, B., Gouveia, L., Sun, Y., Raschperger, E., Räsänen, M., Zarb, Y., Mochizuki, N., Keller, A., Lendahl, U., Betsholtz, C., 2018. A molecular atlas of cell types and zonation in the brain vasculature. *Nature* 554, 475–480. <https://doi.org/10.1038/nature25739>
- Vasconcelos, A.R., Yshii, L.M., Viel, T.A., Buck, H.S., Mattson, M.P., Scavone, C., Kawamoto, E.M., 2014. Intermittent fasting attenuates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and memory impairment. *J. Neuroinflammation* 11, 85. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-85>
- Waitzberg, D.L., Caiaffa, W.T., Correia, M.I.T.D., 2001. Hospital malnutrition: the Brazilian national survey (IBRANUTRI): a study of 4000 patients. *Nutrition* 17, 573–580. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(01\)00573-1](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(01)00573-1)
- Wallace, L., Theou, O., Rockwood, K., Andrew, M.K., 2018. Relationship between frailty and Alzheimer's disease biomarkers: A scoping review. *Alzheimers Dement. Amst. Neth.* 10, 394–401. <https://doi.org/10.1016/j.dadm.2018.05.002>
- Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Cullen, W.K., Anwyl, R., Wolfe, M.S., Rowan, M.J., Selkoe, D.J., 2002. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416, 535–539. <https://doi.org/10.1038/416535a>
- Wanaka, A., Carroll, S.L., Milbrandt, J., 1993. Developmentally regulated expression of pleiotrophin, a novel heparin binding growth factor, in the nervous system of the rat. *Dev. Brain Res.* 72, 133–144. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(93\)90166-8](https://doi.org/10.1016/0165-3806(93)90166-8)
- Wang, J., Ho, L., Qin, W., Rocher, A.B., Seror, I., Humala, N., Maniar, K., Dolios, G., Wang, R., Hof, P.R., Pasinetti, G.M., 2005. Caloric restriction attenuates beta-amyloid neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 19, 659–661. <https://doi.org/10.1096/fj.04-3182fje>
- Wang, X., Zhang, C., Szábo, G., Sun, Q.-Q., 2013. Distribution of CaMKII $\alpha$  expression in the brain in vivo, studied by CaMKII $\alpha$ -GFP mice. *Brain Res.* 1518, 9–25. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.04.042>

- Weindruch, R., Devens, B.H., Raff, H.V., Walford, R.L., 1983. Influence of dietary restriction and aging on natural killer cell activity in mice. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 130, 993–996.
- Winkler, E.A., Bell, R.D., Zlokovic, B.V., 2011. Central nervous system pericytes in health and disease. *Nat. Neurosci.* 14, 1398–1405. <https://doi.org/10.1038/nn.2946>
- Winkler, E.A., Nishida, Y., Sagare, A.P., Rege, S.V., Bell, R.D., Perlmutter, D., Sengillo, J.D., Hillman, S., Kong, P., Nelson, A.R., Sullivan, J.S., Zhao, Z., Meiselman, H.J., Wendy, R.B., Soto, J., Abel, E.D., Makshanoff, J., Zuniga, E., De Vivo, D.C., Zlokovic, B.V., 2015. GLUT1 reductions exacerbate Alzheimer’s disease vasculo-neuronal dysfunction and degeneration. *Nat. Neurosci.* 18, 521–530. <https://doi.org/10.1038/nn.3966>
- Winkler, E.A., Sagare, A.P., Zlokovic, B.V., 2014. The pericyte: a forgotten cell type with important implications for Alzheimer’s disease? *Brain Pathol. Zurich Switz.* 24, 371–386. <https://doi.org/10.1111/bpa.12152>
- Xiao, Q., Gil, S.-C., Yan, P., Wang, Y., Han, S., Gonzales, E., Perez, R., Cirrito, J.R., Lee, J.-M., 2012. Role of phosphatidylinositol clathrin assembly lymphoid-myeloid leukemia (PICALM) in intracellular amyloid precursor protein (APP) processing and amyloid plaque pathogenesis. *J. Biol. Chem.* 287, 21279–21289. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.338376>
- Xie, K., Neff, F., Markert, A., Rozman, J., Aguilar-Pimentel, J.A., Amarie, O.V., Becker, L., Brommage, R., Garrett, L., Henzel, K.S., Hölter, S.M., Janik, D., Lehmann, I., Moreth, K., Pearson, B.L., Racz, I., Rathkolb, B., Ryan, D.P., Schröder, S., Treise, I., Bekeredjian, R., Busch, D.H., Graw, J., Ehninger, G., Klingenspor, M., Klopstock, T., Ollert, M., Sandholzer, M., Schmidt-Weber, C., Weiergräber, M., Wolf, E., Wurst, W., Zimmer, A., Gailus-Durner, V., Fuchs, H., Hrabě de Angelis, M., Ehninger, D., 2017. Every-other-day feeding extends lifespan but fails to delay many symptoms of aging in mice. *Nat. Commun.* 8. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00178-3>
- Xu, W., Wang, H.-F., Tan, Lin, Tan, M.-S., Tan, C.-C., Zhu, X.-C., Miao, D., Yu, W.-J., Jiang, T., Tan, Lan, Yu, J.-T., Alzheimer’s Disease Neuroimaging Initiative Group, 2016. The impact of PICALM genetic variations on reserve capacity of posterior cingulate in AD continuum. *Sci. Rep.* 6, 24480. <https://doi.org/10.1038/srep24480>
- Yang, X., Li, J., Liu, B., Li, Y., Jiang, T., 2016. Impact of PICALM and CLU on hippocampal degeneration. *Hum. Brain Mapp.* 37, 2419–2430. <https://doi.org/10.1002/hbm.23183>
- Yassine, H.N., Braskie, M.N., Mack, W.J., Castor, K.J., Fonteh, A.N., Schneider, L.S., Harrington, M.G., Chui, H.C., 2017. Association of Docosahexaenoic Acid Supplementation With Alzheimer Disease Stage in Apolipoprotein E  $\epsilon$ 4 Carriers: A Review. *JAMA Neurol.* 74, 339–347. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2016.4899>
- Yuan, D., Liu, C., Wu, J., Hu, B., 2018. Nest-building activity as a reproducible and long-term stroke deficit test in a mouse model of stroke. *Brain Behav.* 8, e00993. <https://doi.org/10.1002/brb3.993>
- Zeisel, A., Hochgerner, H., Lönnerberg, P., Johnsson, A., Memic, F., van der Zwan, J., Häring, M., Braun, E., Borm, L.E., La Manno, G., Codeluppi, S., Furlan, A., Lee, K., Skene, N., Harris, K.D., Hjerling-Leffler, J., Arenas, E., Ernfors, P., Marklund,

- U., Linnarsson, S., 2018. Molecular Architecture of the Mouse Nervous System. *Cell* 174, 999-1014.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.021>
- Zenz, G., Jačan, A., Reichmann, F., Farzi, A., Holzer, P., 2019. Intermittent Fasting Exacerbates the Acute Immune and Behavioral Sickness Response to the Viral Mimic Poly(I:C) in Mice. *Front. Neurosci.* 13, 359. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00359>
- Zhang, J., Zhan, Z., Li, X., Xing, A., Jiang, C., Chen, Y., Shi, W., An, L., 2017. Intermittent Fasting Protects against Alzheimer's Disease Possible through Restoring Aquaporin-4 Polarity. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 395. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00395>
- Zhang, J.-C., Yao, W., Hashimoto, K., 2016. Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF)-TrkB Signaling in Inflammation-related Depression and Potential Therapeutic Targets. *Curr. Neuropharmacol.* 14, 721–731.
- Zhang, Y., Chen, K., Sloan, S.A., Bennett, M.L., Scholze, A.R., O'Keefe, S., Phatnani, H.P., Guarnieri, P., Caneda, C., Ruderisch, N., Deng, S., Liddel, S.A., Zhang, C., Daneman, R., Maniatis, T., Barres, B.A., Wu, J.Q., 2014. An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 34, 11929–11947. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1860-14.2014>
- Zhang, Y., Thompson, R., Zhang, H., Xu, H., 2011. APP processing in Alzheimer's disease. *Mol. Brain* 4, 3. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-4-3>
- Zhao, Z., Nelson, A.R., Betsholtz, C., Zlokovic, B.V., 2015a. Establishment and Dysfunction of the Blood-Brain Barrier. *Cell* 163, 1064–1078. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.067>
- Zhao, Z., Sagare, A.P., Ma, Q., Halliday, M.R., Kong, P., Kisler, K., Winkler, E.A., Ramanathan, A., Kanekiyo, T., Bu, G., Owens, N.C., Rege, S.V., Si, G., Ahuja, A., Zhu, D., Miller, C.A., Schneider, J.A., Maeda, M., Maeda, T., Sugawara, T., Ichida, J.K., Zlokovic, B.V., 2015b. Central role for PICALM in amyloid- $\beta$  blood-brain barrier transcytosis and clearance. *Nat. Neurosci.* 18, 978–987. <https://doi.org/10.1038/nn.4025>
- Zhong, Z., Deane, R., Ali, Z., Parisi, M., Shapovalov, Y., O'Banion, M.K., Stojanovic, K., Sagare, A., Boillee, S., Cleveland, D.W., Zlokovic, B.V., 2008. ALS-causing SOD1 mutants generate vascular changes prior to motor neuron degeneration. *Nat. Neurosci.* 11, 420–422. <https://doi.org/10.1038/nn2073>
- Zhuang, L., Liu, Xiaoyan, Shi, Y., Liu, Xiaoli, Luo, B., 2019. Genetic Variants of PICALM rs541458 Modulate Brain Spontaneous Activity in Older Adults With Amnesic Mild Cognitive Impairment. *Front. Neurol.* 10, 494. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00494>
- Ziegelhoeffer, T., Fernandez, B., Kostin, S., Heil, M., Voswinckel, R., Helisch, A., Schaper, W., 2004. Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. *Circ. Res.* 94, 230–238. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000110419.50982.1C>
- Zlokovic, B.V., 2011. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 723–738. <https://doi.org/10.1038/nrn3114>

- Zlokovic, B.V., 2008. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 57, 178–201. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.003>
- Zlokovic, B.V., 2005. Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 28, 202–208. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2005.02.001>
- Zlokovic, B.V., Zhang, C., Liu, D., Fernandez, J., Griffin, J.H., Chopp, M., 2005. Functional recovery after embolic stroke in rodents by activated protein C. *Ann. Neurol.* 58, 474–477. <https://doi.org/10.1002/ana.20602>

## BIOGRAFIJA

Divna Lazić je rođena 21. maja 1986. godine u Majdanpeku, Srbija. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 2005. godine (smer Molekularna biologija i fiziologija), a završila 2012. godine sa prosečnom ocenom 9,21. Diplomski rad pod naslovom „Uticaj dijetalne restrikcije na promenu ekspresije neurokana u mozgu pacova u animalnom modelu traumatske povrede mozga“ uradila je na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ (IBISS), na Odeljenju za neurobiologiju, u Laboratoriji za Molekularnu neurobiologiju, pod mentorstvom dr Selme Kanazir i neposrednim mentorstvom dr Nataše Lončarević-Vasiljković. Diplomski rad sa ocenom 10 je odbranila 27. januara 2012. godine i iste godine započela doktorske studije na Biološkom fakultetu, smer Biologija, modul Eksperimentalna neurobiologija - od gena do ponašanja. Zvanje istraživač saradnik je stekla januara 2015. godine. Od februara 2014. godine boravi u laboratoriji dr Berislava V. Zloković, na Zilka institutu za neurogenetiku, Univerziteta Južne Kalifornije (USC).

Eksperimentalni deo doktorske teze uradila je u Laboratoriji za Molekularnu neurobiologiju, Odeljenja za neurobiologiju, IBISS, u okviru projekta „*Plastičnost mozga tokom starenja: uticaj dijetalne restrikcije i anestezije*“ (#173056), koji finansira Ministarstvo za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, pod rukovodstvom dr Selme Kanazir, i na Zilka institutu za neurogenetiku, USC, u okviru Fogarty International Research Collaboration Award (FIRCA, #R03AG046216) „*Caloric restriction and Alzheimer's A $\beta$  clearance pathway*“ pod rukovodstvom dr Berislava V. Zloković i dr Selme Kanazir.

Divna Lazić je do sada objavila 7 radova u vrhunskim međunarodnim časopisima (kategorije M21a) od kojih je na jednom prvi autor i ima 26 saopštenja na međunarodnim i 4 na domaćim skupovima. Članica je Društva za neuronauke Srbije (DNS), Federacije evropskih društava za neuronauke (FENS) i Društva za neuronauke (SFN).