

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Svetlana S.Vučetić-Arsić

**UTICAJ ALUMINIJUMA NA STRUKTURNE
I BIOHEMIJSKE KARAKTERISTIKE
MOZGA PUSTINJSKIH MIŠEVA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2015.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Svetlana S. Vučetić-Arsić

**INFLUENCE OF ALUMINIUM ON THE
STRUCTURAL AND BIOCHEMICAL
CHARACTERISTICS OF MONGOLIAN
GERBIL BRAIN**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2015.

MENTOR:

Prof. dr Nataša Petronijević, vanredni profesor, Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

1. Prof. dr Ivanka Marković, vanredni profesor, Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Elka Stefanova, vanredni profesor, Klinike za neurologiju KCS, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Vesna Selaković-Mićunović, redovni profesor, Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije u Beogradu

Zahvaljujem se:

Prof. Nataši Petronijević, mom mentoru i prijatelju, na zalaganju, posvećenosti i podršci koje je obeležilo naš zajednički rad,

Prof. Dejanu Mičiću, na dugogodišnjoj edukaciji i saradnji u eksperimentalnom istraživanju,

Doc. Neveni Radonjić na svesrdnoj pomoći tokom izrade ove teze,

Mojim roditeljima na nesebičnoj investiciji u moje obrazovanje i mojoj ćerki na spremnosti da me podrži u mojim stremljenjima.

Rad posvećujem Prof. Bogomiru Mršulji koji mi je uveo u svet nauke koji me još uvek opčinjava...

UTICAJ ALUMINIJUMA NA STRUKTURNE I BIOHEMIJSKE KARAKTERISTIKE MOZGA PUSTINJSKIH MIŠEVA

Svetlana Vučetić – Arsić

Uvod: Aluminijum (Al) je metal prisutan pretežno u zemljinoj kori i čovekovom okruženju. Više studija je pokazalo da sa unosom Al u organizam raste individualni rizik od nastanka neurodegenerativnih oboljenja uključujući i Alchajmerovu bolest (AB), a da je sam etiopatogenetski mehanizam i dalje predmet izučavanja i pretpostavki (Campbell, 2002; Kawahara, 2005; Walton i Wang, 2009). U istraživanjima, koja su bazirana na uticaju Al u nastanku morfoloških i neurobiohemijskih promena karakterističnih za AB, korišćeni su različiti eksperimentalni animalni modeli (Kaltzo i sar., 1965; Walton, 2007) kao i *in vitro* studije (Kawahara i sar, 2001; Ricchelli i sar., 2005). U ovom radu je ispitivan uticaj akutne i subakutne intoksikacije aluminijumom na strukturne i biohemijske karakteristike pojedinih moždanih regiona pustinjskih miševa (*Mongolian gerbils*).

Ciljevi: (I) Ispitati dinamiku promena mitohondrijalnog metabolizama (aktivnost citohrom *c* oksidaze (COX) i kompleksa I), holinergičkog sistema (aktivnost acetiholinesteraze (AChE)) i pokazatelja oksidativnog stresa - sadržaj lipidnih peroksida izražen preko koncentracije malondialdehida (MDA), superoksid anjona (O_2^-) i sulfhidrilnih (SH) grupa, kao i aktivnost superoksid dizmutaze (SOD) i katalaze (CAT) u korteksu, hipokampusu, talamusu i *nc. caudatus*-u životinja u toku prva 24 sata od akutnog tretmana različitim dozama (LD_{25} i LD_{50}) aluminijuma hlorida ($AlCl_3$); (II) Odrediti aktivnost COX i kompleksa I, aktivnost AChE i pokazatelja oksidativnog stresa (sadržaj MDA, O_2^- i SH grupa, kao i aktivnost SOD i CAT) u korteksu, hipokampusu, talamusu i *nc. caudatus*-u džerbila nakon subakutnog tretmana sa $AlCl_3$ koji je aplikovan gavažom u dozi LD_{10} u toku tri nedelje; (III) Ispitati uticaj subakutnog davanja $AlCl_3$ (LD_{10}) na ekspresiju amiloida β , NADPH oksidaze (NOX) i pojedinih izoenzima superoksid dizmutaze (SOD_1 i SOD_2) u mozgu pustinjskih miševa, tehnikama imunohistohemije i *Western blota*.

Materijal i metode: Eksperimentalnim istraživanjem obahvaćeno je 130 odraslih mongolskih džerbila (*Meriones Unguiculatus*), oba pola, starosti 12 nedelja, tretiranih pod normalnim okolnostima. Akutnom trovanju izloženo je 60 životinja, podeljeno u dve grupe od po 30, koje su tretirane *per os* aluminijum hloridom u dozi od LD₂₅ i LD₅₀. Trideset životinja korišćeno je kao kontrolna grupa i tretirane su rastvorom natrijum hlorida gavažom. Kontrolne i eksperimentalne životinje anestetizirane su pentobarbital natrijumom i (Vetanarcol, Werfft-Chemie, Vienna) žrtvovane dekapitacijom 2, 6 i 24 časa nakon tretmana. Dvadeset džerbila je podvrgnuto subakutnom trovanju aluminijom hloridom u dozi od LD₁₀, gavažom, tokom 21 dan. Kao kontrolna grupa obuhvaćen je isti broj (n=20) životinja i po istovetnom protokolu tretirano natrijum hloridom i potom žrtvovano kao i životinje tretirane Al. U uzorcima neprečišćene sinaptosomalne frakcije korteksa, hipokampusa, talamus i *nc.caudatus*-a spektrofotometrijski je određivana aktivnost pojedinih enzimskih sistema (AChE, SOD, CAT, MDA, Kompleks I, sulfhidrilne grupe i supreoksid anjon), dok je aktivnost COX enzima određivana u mitohondrijalnoj frakciji.

Tehnikama *Western blota* ispitivana je ekspresija amiloida β , pojedinih subjedinica NADPH oksidaze (membranskih subjedinica p22^{phox} i gp91^{phox} i citosolnih subjedinica, p67^{phox} i p47^{phox}) kao i enzima SOD₁ i SOD₂ u mozgu pustinjskih miševa. Tehnikama imunohistohemije određivano je prisustvo amiloida β .

Rezultati:

Istraživanje je pokazalo da je aktivnost AChE signifikantno niža u svim ispitivanim moždanim strukturama životinja izloženih dejstvu ingestiranog aluminijuma u poredjenju sa kontrolama. U slučaju akutnog trovanja značajne promene nastaju rano, 2 h nakon aplikacije Al i održavaju se nakon 6 i 24 h. Pad aktivnosti AChE opserviran je i nakon subakutnog tretmana sa Al u svim ispitivanim moždanim strukturama.

Aktivnost SOD se značajno povećava u toku prvih 24 sata nakon akutne aplikacije obe doze Al, kao i posle subakutnog trovanja životinja. Promena koncentracije O₂⁻ prati izmene u aktivnosti enzima SOD.

Akutna administracija Al izaziva značajne, strukturno specifične promene u aktivnosti CAT u ispitivanim moždanim strukturama. Dva časa nakon akutnog trovanja, aktivnost ovog enzima je povećana u korteksu i hipokampusu i smanjena u talamusu i *nc. caudatus*-u u obe doze aplikovanog Al. Dvadeset i četiri časa nakon trovanja statistički značajan porast aktivnosti CAT prisutan je u korteksu i talamusu, a pad u hipokampusu i *nc. caudatus*-u. Nasuprot akutnom, subakutno trovanje sa Al u dozi od LD₁₀, provocira pad aktivnosti enzima CAT u svim ispitivanim moždanim strukturama izuzev hipokampusa.

Signifikantni porast MDA i prateći pad koncentracije SH grupa registruje se u svim ispitivanim strukturama već nakon dva časa po administraciji Al i to u obe aplikovane doze i prisutan je i nakon 6 i 24 h. Nakon subakutnog trovanja koncentracija MDA je i dalje povećana, dok se koncentracija SH grupa smanjuje.

Dva časa nakon trovanja, aktivnost COX opada u hipokampusu i talamusu ali se šest časova po ingestiji Al zapaža značajno povećanje aktivnost enzima u svim moždanim strukturama, osobito nakon aplikacije Al u dozi LD₂₅. Dvadeset i četiri časa po tretmanu Al, zapažaju se dozna i strukturno specifične promene. Tokom subakutnog trovanja Al aktivnost COX je značajno snižena u poredjenju sa kontrolom. Akutno i subakutno trovanje Al ne izaziva signifikantne promene u aktivnosti kompleksa I u poredjenju sa kontrolnom grupom životinja.

Rezultati dobijeni *Western blotom* pokazali su da postoji subjedinična i strukturna specifičnost u ekspresiji NADPH oksidaze nakon subakutnog trovanja eksperimentalnih životinja sa AlCl₃. Takodje, iz rezultata proizilazi da citosolna SOD₁ pokazuje statistički značajno povišenu ekspresiju u kortikalnim strukturama u poredjenju sa kontroloma. U hipokampusu ekspresija je niža u poredjenju sa kontrolnim vrednostima. Sa druge strane, mitohondrijalna SOD₂ u korteksu ne pokazuje značajno povišenu enzimsku ekspresiju u odnosu na kontrolne životinje, dok se u hipokampusu uočava statistički značajan porast.

Nakon subakutnog tretmana Al u kortikalnim strukturama uočava statistički značajno povećanja ekspresije p22^{phox} i gp91^{phox}, odnosno membranskih subjedinica NOX. U hipokampalnim strukturama ekspresija ovih subjedinica je snižena, što ukazuje na

izvesnu strukturnu specifičnost. Ekspresija citosolnih subjednica, p67^{phox} i p47^{phox}, u hipokampusu je snižena u poredjenju sa kontrolama dok se u korteksu se beleži statistički značajna povišena ekspresija p67^{phox}.

Imunohistohemijsko određivanje ekspresije ukupnog amiloda β u kortikalnim i hipokampalnim neuronima subakutno tretiranih životinja pokazuje povećano formiranje agregata β amiloidnog proteina u korteksu i hipokampusu mongolskih džerbila.

Zaključak: Navedeni rezultati ove doktorske disertacije potkrepljuju pretpostavku da se oksidativni stres i promene u aktivnosti enzima vezanih za holinergičku transmisiju, javljaju rano po ingestiji Al. Potom se, nakon šest časova po tretmanu, uočavaju promene u aktivnosti COX koje prati dalji porast oksidativnog disbalansa. Subakutni tretman sa AlCl₃ dovodi do smanjenja aktivnosti AChE, taoženja amiloida β i održavanja oksidativnog stresa koji nastaje kako zbog disfunkcionalnosti respiratornog lanca, tako i na nivou aktivirane NADPH oksidaze. Ovo ukazuje da bi NADPH oksidaza mogla biti terapijska meta u prevenciji i lečenju AB.

Dalje istraživanje neurobiohemijskih efekata trovanja Al može pomoći u razumevanju ranog patofiziološkog supstrata neurotoksičnosti kao i na moguće strategije u prevenciji i tretmanu Alchajmerove bolesti.

Ključne reči: : aluminijum, Alzheimerova bolest, oksidativni stres, NADPH oksidaza

Naučna oblast: neuronauke

Uža naučna oblast: neurobiohemija

INFLUENCE OF ALUMINIUM ON THE STRUCTURAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF MONGOLIAN GERBIL BRAIN

Svetlana Vučetić – Arsić

Objective: Aluminium is a metal predominantly present in the Earth's crust and is common in the human environment. Several studies suggest that aluminum (Al) intake might increase an individual's risk of developing Alzheimer disease (AD) but mechanism of etiopathogenesis is still the subject of studies and assumptions (Campbell, 2002; Kawahara, 2005; Walton and Wang, 2009). In studies based on the influence of Al on the occurrence of morphological and neurobiochemical changes that are characteristic for AB different experimental models (Kaltzo et al., 1965; Walton, 2007) and *in vitro* surveys (Kawahara et al., 2001; Ricchelli et al., 2005) were used. Animal model of *Mongolian gerbils* we used in order to investigate the influence of aluminum to the structural and biochemical characteristics of certain brain regions.

Aims: (I) to analyze the dynamic of changes of mitochondrial metabolism (activity of cytochrome c oxidase (COX) and Complex I), cholinergic system (activity of acetylcholinesterase (AChE)), oxidative stress parameters - levels of lipid peroxides malondialdehyde (MDA), superoxide anion (O^{2-}) production and thiol (SH) groups as well as superoxide dismutase (SOD) activity and catalase activity (CAT) in a brain structure - cortex, hippocampus, thalamus and *nc. caudatus* after aluminium chloride ($AlCl_3 \cdot 6H_2O$) treatment, initiated by two different doses of Al (LD_{25} i LD_{50}), given *per os* in a first 24 hours; (II) to observe and measure AChE activity, oxidative stress parameters including SOD and CAT activity, O^{2-} production, levels of MDA and SH groups as well as COX and Complex I activities, after subacute treatment with Al in doses LD_{10} during 21 days; (III) To analyze the effects of ingested Al on the dynamic of changes in NADPH oxidase (NOX_2) expression, amyloid β and superoxide dismutase SOD_1 and SOD_2 after subacute Al treatment by immunohistochemistry and Western blot technique.

Methodology: Experimental research included 130 adult *Mongolian gerbils* (*Meriones Unguiculatus*), both sexes, 12 week old, kept under normal conditions. Sixty gerbils, separated in two groups of animals, received aluminum chloride hexahydrate ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) by gavage in the dose LD_{25} or LD_{50} . Thirty animals were used as a control and they received the saline by gavage in the same volume as the Al treated animals. The control animals and the experimental animals that survived were anaesthetized with pentobarbital - Na (Vetanarcol, Werfft-Chemie, Vienna) and sacrificed by decapitation 2, 6 or 24 hours after treatment. Twenty gerbils were subacutely treated. They received aluminium chloride hexahydrate ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) in the dose LD_{10} by gavage during 21 days. Ten control animals have received the saline during 21 days in the same volume and protocol as subacutely Al treated animals. Activities of AChE, SOD and CAT, the level of MDA, Complex I activity, concentration of SH group and O_2^- were measured in the synaptosomal fraction, and the COX activity in the mitochondrial fraction of cortex, hippocampus, thalamus and *nc. caudatus*.

The activity of AChE, activity of enzymes of electric chain capacities - COX and Complex I along with early indicator of oxidative stress (level of MDA, O_2^- production, concentration of SH group, as well as, activity of CAT and SOD) were assayed by spectrophotometric methods. The expression of amyloid β , the individual subunits of the NADPH oxidase (membrane subunits p22^{phox} i gp91^{phox} and cytosolic subunits p67^{phox} i p47^{phox}) as well as enzymes SOD₁ and SOD₂ were investigated by Western blot techniques. The presence of amyloid β was detected by immunohistochemistry techniques.

Results: The result of our survey has shown the decrease of AChE activity in all of investigated brain structures comparing to control group after ingestion of Al. In the case of acute poisoning the prominent changes developed rapidly 2 hours after Al application, and were present after 6 and 24 hours. The decrease of AChE activity was also observed after subacute Al administration in all brain structures.

The SOD activity showed significant increase in a first 24 hours after acute Al treatment (in both doses) and increase of the total SOD activity was also seen in all brain

structures after subacute Al application. The changes in O_2^- production corresponds to the changes in SOD activity.

Acute application of aluminum caused significant, region specific changes in CAT activity in investigated brain structures. Two hours after poisoning the activity of this enzyme was increased in cortex and hippocampus but decreased in thalamus and *nc. caudatus* in the presence of both applied Al doses. Twenty-four hours after poisoning there was an increase of CAT activity in the cortex and thalamus but decrease in hippocampus and *nc. caudatus*. However, subacute poisoning with LD₁₀ caused a decrease of CAT activity in all brain structures except in hippocampus where it was unaffected.

Significant increase of the MDA and decrease of SH group levels were noticed already 2h after poisoning with both Al doses, and the levels were changed after 6 and 24h in all investigated brain structures. The MDA levels were also significantly increased and the levels of SH groups significantly decreased in all investigated brain structures after subacute poisoning with Al.

Two hours after poisoning the COX activity was not changed in cortex and *nc. caudatus* while in the hippocampus and thalamus the decrease was noticed but six hours after Al ingestion COX activity was increased in all investigated brain structures when LD₂₅ was applied. Twenty-four hours after Al poisoning were observed a dose-specific and structural changes. The subacute poisoning was followed by the decrease of COX activity comparing to control group. The acute and subacute treatment did not cause significant changes of this respiratory chain component.

The results of Western blot technique showed subunit and structure specific alterations of expression NADPH oxidase after subacute poisoning experimental animals with AlCl₃. In addition, an obvious significant increase of cytosol SOD₁ expression in cortex was present compared to controls. Significant decrease of activity was noticed compared to control animals in hippocampal structure.

On the other hand, there is no significant change of expression of mitochondrial SOD₂ in cortical structure in regard to controls, while subacute poisoning with LD₁₀ in hippocampus caused a significant increase of SOD₂ expression.

Following immunohistochemical method in cortical and hippocampal neurons of subacute treated animals, formation of β amyloid protein aggregates in cortex and hippocampus of mongolian gerbils were increased.

Conclusion: The results of this doctoral dissertation support the assumption that oxidative stress and changes of enzyme activity of the cholinergic neurons occurs early after Al ingestion. Subsequently, changes in COX activity were observed six hours after treatment, followed by an increase of oxidative disbalance. Subacute treatment with AlCl₃ leads to a decrease in activity of AChE, deposition of β amyloid protein aggregates and oxidative stress maintaining which happens as a result of respiratory chain dysfunction and high expression of most subunits NADH oxidase. These results indicate NADH oxidase as a therapeutic target in prevention and therapy of AD.

Further research of neurobiochemical effects due to Al poisoning could contribute to understanding of early pathophysiological substrate neurotoxicity as well as possible strategies in the prevention and treatment of Alzheimer's disease.

Key words: aluminum, Alzheimer disease, oxidative stress, NADPH oxidase

Research area: Neuroscience

Special topics: Neurobiochemistry

Sadržaj

1.UVOD	1
1.1.Aluminijum i njegova svojstva	2
1.2. Neurotoksičnosti aluminijuma i njegovi efekti na CNS.....	4
1.3. Alchajmerova bolest.....	7
1.4.Povezanost aluminijuma i Alchajmerove bolesti	12
1.5. Oksidativni stres i Al.....	13
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	21
3. MATERIJAL I METODE.....	23
3.1.Eksperimentalne životinje	24
3.2.Izolovane struktura za biohemijske analize	25
3.3. Biohemijske analize	26
3.3.1. Merenje sadržaja proteina	26
3.3.2. Aktivnost enzima acetilholinesteraze (AChE)	26
3.3.3. Koncentracija lipidnih peroksida (MDA).....	27
3.3.4 Koncentracija sulfhidrilnih grupa (SH grupa).....	27
3.3.5. Aktivnost enzima superoksid dizmutaze (SOD) i Kompleksa I.....	27
3.3.6. Aktivnost katalaze (CAT)	28
3.3.7. Aktivnost enzima citohrom <i>c</i> oksidaze (COX)	28

3.4. Određivanje ekspresije proteina tehnikom Western blot	28
3.5. Priprema uzoraka za imunohistohemiju (kriopreseći) i imunohistohemija.....	29
3.6. Statistička analiza.....	30
4. REZULTATI.....	31
4.1. Uticaj ingestije Al na aktivnost AChE	32
4.2. Uticaj ingestije Al na aktivnost SOD i produkciju O^{2-}	34
4.3. Uticaj ingestije Al na aktivnost CAT	38
4.4. Uticaj ingestije Al na vrednosti MDA i SH grupa	40
4.5. Uticaj ingestije Al na aktivnost COX i Kompleksa I.....	43
4.6 . Uticaj ingestije Al na ekspresiju amiloida.....	46
4.7. Uticaj ingestije Al na ekspresiju β amiloida u mozgu džerbila.....	47
4.7.1. Efekat subakutne primene Al na ekspresiju β amiloida u korteksu džerbila	47
4.7.2. Efekat subakutne primene Al na ekspresiju β amiloida u hipokampusu džerbila	48
4.8. Uticaj ingestije Al na ekspresiju enzima NADPH oksidaze (subjedinice: p22 ^{phox} , p91 ^{phox} , p47 ^{phox} i p67 ^{phox}).....	49
4.9. Uticaj ingestije Al na ekspresiju enzima SOD ₁ i SOD ₂	54
5. DISKUSIJA.....	57
6. ZAKLJUČCI.....	76
7. LITERATURA.....	80
SPISAK SKRAĆENICA	109

BIOGRAFIJA	112
PRILOZI	114
Izjava o autorstvu	Error! Bookmark not defined.
Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada ...	Error! Bookmark not defined.
Izjava o korišćenju	Error! Bookmark not defined.

1.UVOD

1.1. Aluminijum i njegova svojstva

Aluminijum je široko rasporstranjen element u litosferi, treći po redu, iza kiseonika i silicijuma. Njegova fizička i hemijska svojstva obezbedila su mu znatnu industrijsku primenu i prisustvo u brojnim proizvodima u ljudskom okruženju već više od jednog veka. Najnovija istraživanja pokazuju da je aktuelna globalna potražnja za ovim metalom takvog obima da iznosi u proseku 11 kg na svakog stanovniku planete (Cullen i Allwood, 2013). Njegov glavni izvor su rude koje predstavljaju oko 8 % mineralnih sadržaja zemljine kore u kojima je ovaj element prisutan u formi trivalentnog katjona (Al^{3+}) vezanog za silikate (Verstraeten i Aimo, 2008). S obzirom da je u nepreradjenoj formi nesolubilna, njegova bioraspoloživost je bitno smanjena, stoga primarno nije prisutan u živim organizmima već se unosi iz spoljne sredine. Kako se radi o neesencijalnom metalu najčešći načini humane ekspozicije su putem hrane (Sthal i sar., 2011), pića (uključujući čaj, kafu, sokove, vino, pivo), vode (Francisco i López, 2002; Saiyed i sar., 2005; Krewski i sar., 2007; Karbouj, 2007; Magnier i sar., 2014), vazduha (Polizzi i sar. 2007), kozmetičkih preparata (Darbre, 2005), lekova (Tomljenović i Shaw, 2011; Heydenreich i sar., 2014). Glavni putevi apsorpcije Al u organizmu su gastrointestinalni trakt (Ittel, 1993), koža (Exley, 1998; Exly, 2004), kao i olfaktivni i oralni epitel (Roberts, 1986).

Procenjuje se da humana ekspozicija aluminijumskim jedinjenjima u vazduhu dovodi do udisanja oko u 1.4 μ g Al na dan u neindustrijskim regionima (Goncharuk i sar., 2012), ali da te vrednosti mogu biti čak i do hiljadu puta veće u industrijskim zonama (Polizzi i sar., 2007). Opisane su znatno veće ekspozicije aluminijumskim jedinjenjima ukoliko su osobe pušači, konzumeti marihune, kokaina ili heroina (Exley i sar., 2006; Pechansky i sar., 2007; Exley i sar., 2007). U proseku, čovek unese u organizam hranom i pićima (isključujući vodu) oko 2,5 do 13 mg /dan, odnosno oko 0,14 mg/kg telesne težine, što varira u zavisnosti od konzumirane hrane, zemlje iz koje osoba potiče, uzrasta i pola

(WHO, 1997). Prema ustanovljenim standardima za regulaciju dozvoljenih elemenata u pijaćoj vodi i preporukama Svetske zdravstvena organizacije i Saveta Evrope, koncentracija Al u pijaćoj vodi ne bi trebalo da prelazi 0.2 mg/ na litar (WHO, 1997; Council of the European Union, 1998). Mada je primena Al u kozmetičkoj industriji veoma ekspanzivna, posebno u formi aluminijum hlorhidrata ($\text{Al}_2(\text{OH})_5\text{ClX}2\text{H}_2\text{O}$), koji jeste sastojak većine antiprespiranata, dezodoransa, pasta za zube, ruževa za usne, mali je broj do sada objavljenih studija dermalne apsorpcije aluminijuma. Studija Flarend i sar. (2001) je pokazala da nakon aplikacije aluminijum-hlorhidrata obeleženog izotopm Al_{26} transdermalna apsorpcija iznosi 0,012%, a nedavni rezultati Pineau i sar. (2012) potvrdili su neznatnu apsorpciju aluminijuma (<0.07% upotrebljenog Al) u formi aerosolnog, *roll-on* ili stik antiprespirantnog preparata kroz intaktnu kožu, nasuprot višim vrednostima u slučaju oštećene teksture kože. Nedavno je od strane Evropske Komisije, Naučnog odbora za bezbednost potrošača, objavljen dokument (2014) koji bliže reguliše upotrebu Al u kozmetičkim proizvodima.

Apsorbovani Al u krvi se vezuje većim delom za transferin, kao transportni mehanizam i citrate (Yokel i sar., 2002) i u tkiva dospeva u formi Al-transferin kompleksa koristeći isti endocitozni mehanizam kao i gvoždje, odnosno transferinski receptor (Verstraeten i Aimo, 2008). Al prolazi kroz krvno-moždanu barijeru (KMB) (Yokel, 2002) i akumulira se u glijalnim i neuralnim ćelijama centralnog nervnog sistema (CNS) (Levesque i sar., 2000; Aremu and Meshitsuka, 2005). Zanimljivo je da je Al u plazmi vezan za transferin čak 91%, a za citrate u 7-8%. Nasuprot tome, u cerebrospinalnoj tečnosti Al je većinski vezan za citrate u skoro 90 % dok je za transferin vezan svega oko 4 % (Yokel i McNamara, 2001). Ovako apsorbovani aluminijum se većim delom eliminiše iz organizma putem bubrežne ekskrecije u proseku 10 do 15 μg /dan (Kaehny i sar., 1977). Ranija istraživanja na bubrežnim bolesnicima na dijalizi, pokazala su značajan porast koncentracije Al u serumu, koštanom tkivu, jetri, slezini, mozgu i skeltenim mišićima što je bilo posledica korišćenja rastvora za dijalizu koji su sadržali aluminijumska jedinjenja (Marsden i sar., 1979). Smatra se da koncentracija Al u mozgu niža od 2 μg /g moždanog tkiva nije štetna po humani organizam (Andrasi i sar., 2005). Da bi se izbeglo

nagomilavanje metala u centralnom nervnom sistemu vrši se aktivni efluks Al preko monokaraboksilatnog transportera (Yokel i sar., 2001). Ipak, akumulacija Al jedinjenja najvećim delom se vrši u viscelarnim organima, pa zatim u mozgu o čemu svedoči studija Schetinger i sar. (1999).

1.2. Neurotoksičnosti aluminijuma i njegovi efekti na CNS

Uprkos rasprostranjenom mišljenju da je „bezbedan” za ljudski organizam o toksičnosti aluminijuma svedoče brojna dosadašnja istraživanja (Edwardson i Candy, 1990; Zatta i sar., 2003; Exley i House, 2011; Seneff i sar., 2012; Darbre i sar., 2013).

Dokazano je da su efekti aluminijuma na CNS mnogobrojni i ispoljavaju se na:

1. Ćelijsko jedro i alteraciju genske ekspresije

Poznato je, sa biohemijskog aspekta, da aluminijum u formi trovalentnog katjona ima visok afinitet za negativno naelektrisane ligande koji su nosioci kiseonika i stoga se on lako i snažno vezuje za organske fosfatne grupe dezoksiribonukleinske (DNK) i ribonukleinske kiseline (RNK). Stvaranjem snažnih interakcija Al ne utiče samo na anatomsku strukturu DNK (Bharathi i sar., 2003) već i na naknadnu ekspresiju različitih gena važnih za moždanu funkciju (Lukiw i sar., 1998) uključujući i promenu ekspresije β -APP sekretaze, enzima odgovornog za amiloidogenu sekvencijaciju prekursorskog proteina i nastanak amiloida β patognomoničnog substrata AB (Walton i Wang, 2009).

2. Brojne ćelijske funkcije

Dokazano je da Al posredno utiče na energetske metabolizam vezujući se adenozin trifosfat (ATP) i izazivajući mitohondrijnu disfunkciju i depleciju ATP-a (Kumar i sar., 2008). Pokazano je i da Al inhibira aktivnost protein fosfatze (Shetty i sar., 1992), pokreće fosforilaciju i akumulaciju neurofilamenata (Julka i Gill, 1996) i izaziva abnormalnu akumulaciju izvesnih proteina uključujući tau protein u eksperimentalnih životinja (Kihira i sar., 2002).

3. Neurotransmitterski fluks

Ranija istraživanja negativnog uticaja Al na sinaptičku transmisiju (Meiri i sar., 1993) podstakla su fokusiranje interesovanja i na tom polju. Pokazana je povišena aktivnost acetilholinesteraze *in vivo* i *in vitro* na animalnom modelu nakon tretmana aluminijum hloridom (Zatta i sar., 2002). Takodje je potvrđen inhibitorski uticaj jona Al na glutamatne N-metil-D-aspartat (NMDA) receptore hipokampalnih neurona (Nday i sar., 2010).

4. Lipidne membrane

Pokazano je da aluminijum ima uticaja kako na fluidnost i fizičke osobnosti ćelijske membrane (Verstraeten i Oteiza, 2002) tako i na porast lipidne peroksidacije lizozoma kao posledica oksidativnog stresa izazvanog Al (Kaneko i sar., 2007).

5. Apoptoza neurona i glije

Svi navedeni mehanizmi mogu pokrenuti proces degradacije nervnog tkiva i u krajnjem smrti ćelije, kao što je već navedeno do sada, ali je ustanovljeno i da jedinjenja aluminijuma, *per se*, mogu indukovati apoptozu na animalnom modelu (Ghirbi i sar., 2001). Nadalje, na eksperimentalnom modelu pacova Kawahara i sar. (2003) su dokazali protektivni uticaj „*brain-derived*” neurotrofnog faktora (BDNF) kao odgovor na

neurotoksičnost prethodno tretiranih hipokampalnih neurona jedinjenjem aluminijem maltolata.

U korpusu različitih epidemioloških studija, aluminijum, kao prominentni faktor spoljne sredine, bio je prepoznat kao kofaktor u etiologiji nekih neurodegenerativnih oboljenja uključujući i Alchajmerovu bolest (Solfrizzi i sar., 2006; Domingo i sar., 2011). Sa hronološkog aspekta, još u XIX veku publikovan je rad Döllkena (1897) kojim se po prvi put skreće pažnja na neurotoksičnost Al. Povezanost između trovanja aluminijumom i poremećaja pamćenja u ljudi, potom je, potvrđena početkom prošlog veka (Spofforth i sar., 1921), a zatim su usledila eksperimentalna istraživanja na životinjama koja su potkrepila neurotoksičnost ovog metala. Intracerebralnom administracijom Al indukovana je epilepsija (Chusid i sar., 1951). Takođe, u eksperimentalnoj studiji, nakon injekcione administracije Al soli novozelandskim belim zečevima, opisana je pojava neurofibrilarne degeneracije morfološki nalik neurofilamentoznim agregatima u bolesnika sa AB (Kaltzo i sar., 1965). Ovo istraživanje smatra se prekretnicom u shvatanju uloge aluminijuma u etiologiji neurodegenerativnih promena u CNS. Kako je aluminijum bio sastojak solucija za dijalizu dokazano je da je kao takav bio uzročnik različitih, od dijalize zavisnih oboljenja, poput osteomalacije, mikrocitne anemija β 2-mikroglobin udružene amiloidoze (Wills i Savory, 1989), ali i encefalopatije hemodijaliziranih pacijenta (Alfrey i sar., 1976; Harrington i sar., 1994).

Poslednjih par decenija, u stručnoj literaturi, dolazi do ekspanzije epidemioloških studija koje izučavaju udruženost ekspozicije Al i njegovo povišeno prisustvo u pijaćoj vodi u pojedinim regionima, na konsektivni porast incidence Alchajmerove bolesti u ispitivanom stanovništvu (Martyn i sar., 1989; Frecker, 1991; Neri i Hewitt, 1991). Ta istraživanja su pokazala da povišen dnevni unos Al, putem pijaće vode korelira sa povišenim rizikom za nastanak kognitivnog oštećenja ili demencije (Rondeau i sar., 2000) što sugeriše neurotoksični potencijal ovog metala.

1.3. Alchajmerova bolest

Alchajmerova bolest (AB) je najčešće primarno degenerativno oboljenja mozga u osoba iznad 65 godina koje obuhvata oko 0,5% globalne populacije (Abbott, 2011). Tipični sindrom senilne demencije čini progresivan gubitak pamćenja, teškoće u planiranju i rešavanju problema, deficit u sferi egzekutivnih i kognitivnih funkcija kao i bihevioralna deterioracija (Karantzoulis and Galvin, 2011). Danas se smatra da AB prethodi umeran kognitivni deficit, koji počinje znatno pre no što se ispoljavaju klinički simptomi i zapravo čini centralno mesto u definisanju klastera oboljenja koje će se docnije ispoljiti u formi ozbiljne demencije (Jack i sar. 2010).

Alchajmerova bolest, iako je poznata preko 100 godina kao entitet, tek u poslednjih 30-tak godina ulazi u fokus istraživača i kliničara. Naziv duguje Aloisu Alzheimeru, nemačkom psihologu i patologu, koji je prvi opisao specifične morfološke abnormalnosti mozga u pacijentkinje Auguste D., koja je болоvala od do tada, veoma neobične forme mentalnog oboljenja i preminula u svojoj 51. godini. Nakon autopsije u njenom mozgu Alzheimer je otkrio znatni gubitak neurona, neuronska vlakna koja formiraju klubad, plakove visokog denziteta i glijalnu proliferaciju (Alzheimer, 1907; Stelzmann, 1995). Četiri godine kasnije, Emil Kraepelin, jedan od rodonačelnika savremene psihijatrije, po prvi put će koristiti naziv Alchajmerova bolest za poseban entitet koji je uključen u VIII ediciju Psihijatrijskog priručnika (Kraepelin, 1910).

Značaj Alchajmerove bolesti u savremenoj medicini meri se njenom epidemiološkom stopom koja je 2013. godine iznosila 35 milona ljudi koje je obolelo (jedan na dvadeset stanovnika svetske populacije), sa procenama da će se taj broj udvostručiti već 2030. godine, a 2050. iznosiće oko 115,4 milona ljudi (WHO, 2013). Incidenca nastanka demencija u svetu iznosi 7,7 miliona godišnje odnosno jedan novotkriven slučaj svake 4 sekunde. Smatra se da je jedno od glavnih objašnjenja ove

rasprostranjenosti zapravo starenje populacije na našoj planeti (Prince i sar., 2013). S obzirom da većina pacijenta oboli nakon svoje 65 godine, rizik se povećava za svakih 6 godina eksponencijalno, na 50% verovatnoće obolevanja u populaciji preko 85 godina (Ziegler-Graham, 2008).

Dijagnostički kriterijumi za definisanje Alchajmerove bolesti prvi put su publikovani 1984. godine (Mckhann i sar., 1984). Zatim su naknadno revidirani 2011. godine od strane Nacionalnog Instituta za Starenje i Asocijacije za Alchajmer, u svetlu novih istraživanja koja su izučavala značajnost ranog ispoljavanja patološkog supstrata na sam tok AB (Mc Khann i sar., 2011). Identifikovana su tri stadijuma AB i uvrštena u preporuke dobre kliničke prakse: preklinička Alchajmerova bolest, blagi kognitivni poremećaj i razvijena demencija Alchajmerovog tipa (Hyman i sar., 2012).

U prvom, prekliničkom stadijumu su osobe koje još nemaju ispoljene kliničke simptome bolesti poput poremećaja pamćenja ali imaju dokazive morfološke promene u mozgu i /ili cerebrosposinalnoj tečnosti i /ili krvi biomarkere koji predstavljaju rane znake oboljevanja. Pretpostavlja se da se morfološke promene u mozgu mogu ispoljiti i više godina pre pojave kliničkih korelata, ali se u ovom stadijumu pacijenti retko eksplorišu jer nemaju tegobe (Jack i sar., 2009). Stoga je ovaj stadijum bolesti, ne retko, asimptomatski, „nem” u kliničkom smislu i bez jasno determinisanih dijagnostičkih kriterijuma. Nasuprot tome, ovaj stadijum bolesti je u istraživačkom smislu predmet brojnih studija koje potvrđuju sporu i protrahovanu pojavu A β depozita u vremenskom periodu koji doseže i do 20 godina unazad (Villemagne i sar., 2013).

Blagi kognitivni poremećaj (BKP) predstavlja stanje kada je prisutno kognitivno oštećenje, anamnestičko ili ne anamnestičko, uz očuvanu funkcionalnost u svakodnevnom životu i odsustvo kriterijuma za dijagnozu demencije (Pavlović i Stefanova, 2013). Sistematskom analizom incidence i prevalencije BKP na osnovu objavljenih populacionih studija u Engleskoj, iako inkoharentne po metodologiji, pokazano je da su procene

prevalence od 3%–42% za BKP, a u populaciji preko 65 godina života 10 do 20% osoba imaju ovaj preklinički stadijum AB (Ward i sar., 2012).

Razvijena forma demencije AB tipa ispoljava se grupom simptoma od kojih je najmarkantniji poremećaj pamćenja sa teškoćama u upamćivanju novih informacija i rekognicijom koja ozbiljno remeti svakodnevno funkcionisanje. Progresivna kognitivna deterioracija odlikuje se:

- (a) poteškoćama u planiranju ili rešavanju problema,
- (b) osujećenjem u obavljanju dnevnih aktivnosti,
- (c) povremenom vremenskom ili prostornom dezorijentacijom,
- (d) problemima u sferi govora ili pisanja,
- (e) otežanim rasudjivanjem i zamenom pojmova,
- (f) promenama u sferi afektiviteta uključujući apatiju i depresiju

(Alzheimer's Association, 2014).

Ustanovljenje novih kriterijuma za AB uvelo je u praksu i korišćenje dve kategorije biomarkera: biomarkere koji pokazuju nivo akumulacije beta amiloida u mozgu i biomarkere koji koreliraju sa oštećenjem ili aktuelnom degeneracijom neurona u mozgu (Galluzzi i sar., 2013; Roe i sar., 2013).

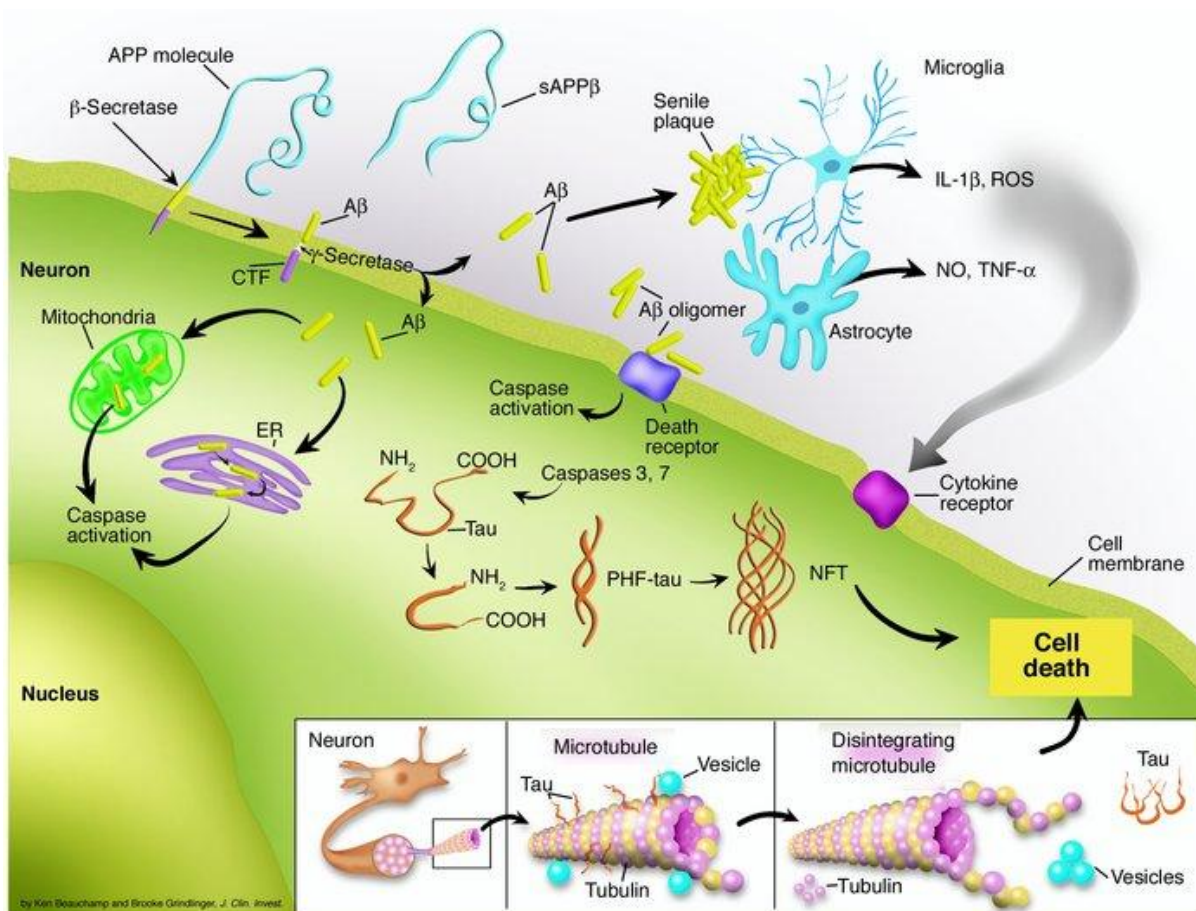
Neuropatološki, AB karakterišu tri glavna obeležja: amiloidni plakovi, neurofibrilarna klupka i gubitak sinapsi. Ekstracelularni amiloidni plakovi (*senile plaques*) izgrađeni su od beta amiloida (A β), distrofičnih promena na neuronima i reaktivne glije (Dickson, 1997), a intraneuronska neurofibrilarna klupka (*neurofibrillary tangles*) se sastoje od filamenata hiperfosforilisane forme mikrotubularnog Tau proteina (Grundke-Iqbal i sar., 1986). Gubitak sinapsi najvećim delom nastaje usled degeneracije holinergičkih

neurona u korteksu i hipokampusu a, smanjenje koncentracije acetilholina je karakteristično za mozak obolelih od AB (Bobba i sar., 2010).

Centralno mesto u patogenezi AB, danas se pripisuje poremećajima u procesu razgradnje amilodnog prekursorog proteina (APP) i prelasku sa normalnog na patološku diferencijaciju (tzv. amiloidna kaskada) (Savory i sar., 2006). Pod normalnim okolnostima, razgradnja ovog transmembranskog glikoproteina odvija se pod dejstvom α sekretaze koja oslobađa solubilni amiloid prekursorski protein alfa (sAPP α) značajan u normalnoj sinaptičkoj transmisiji i procesima sinaptičke plastičnosti. Usled alteracije u stanju Alchajmerove bolesti aktivira se „amiloidogeni put“ gde se sekvestracija APP vrši β -sekretazom (ili γ -sekretazom) i tako oslobađa ekstracelularni fragment - amiloid beta (A β 40/42) koji je neurotoksičan i sklon agregaciji (Chen i Yan, 2010).

Implicirano je da postoji izvesna genetska predodredjenost u patogenezi AB, s obzirom da su dokazane mutacije APP kao i enzima uključenih u produkciju A β (Tanzi i Bertram, 2001). A β je prvi put identifikovan od strane Masters i sar. (1985) kao protein koji ima sposobnost agregacije čiji depoziti čine srž amiloidnih plakova nadjenih u pacijenta obolelih od AB (Kawooya i sar., 2003). U svojoj monomernoj formi ovaj protein nema destruktivno dejstvo. A β protein sesatoji od 40 ili 42 amino kiseline definisane kao A β ₁₋₄₀ i A β ₁₋₄₂ koje predstavljaju glavne komponente amiloidnog plaka (Gursky i Aleshkov, 2000).

Za A β ₁₋₄₀ se pretpostavlja da implicira nastanak inicijalnih agregata, dok je A β ₁₋₄₂ solubilna i čini glavnu cirkulatornu formu pristnu u plazmi i cerebrospinalnoj tečnosti. Aktuelne naučne postavke spekulisu da su solubilni agregati A β odgovorni za nastanak neurodegenerativnih promena u mozgu obolelih od Alchajmerove demencije, pre no monomerni ili nesolubilni fibrili (Roychaudhuri i sar., 2009). Glavna događanja prema hipotezi amiloidne kaskade prikazana su na slici 1.



Slika 1. Preuzeto iz: Dickson, 2004

A β nastaje iz APP procesom proteolize pod dejstvom β -sekretaze, koja genereše karboksini terminalne fargmente (CTFs) i putem γ -sekretaze. A β formira agregate u ekstracelularnom prostoru u formi senilnih plakova kroz proces koji je zavistan od proteoglikana i apolipoproteina. Ekstracelularni A β oligomeri mogu aktivirati cistein aspartat proteazu (kaspazu) putem aktivacije na ćelijskoj površini smeštenog “death” receptora. Alternativno intarcelularni A β može aktivirati kaspazu kroz proces koji uključuje disfunkciju endoplazamtičnog retikuluma ili mitohondrija. Jedna od posledica aktiviranja kaspaze je cepanje tau koji favorizuje konformacijske promene karakteristične za uparene spiralne filamente. Progresivna akumulacija tau dovodi do oštećenja citoskeleta, slabijeg aksijalnog i dendritskog trasporta gubitka, ćelijske trofike i u krajnjem smrti ćelije.

Uprkos naporima brojnih istraživača da proniknu u etiopatogenezu AB, sa izuzetkom pojedinih naslednih formi, uzrok nastanka Alchajmorove bolesti i dalje je nepoznat (Alzheimer's Association, 2011).

1.4.Povezanost aluminijuma i Alchajmerove bolesti

Uloga Al kao patogenetskog faktora u AB sugerisana je mnogim dosadašnjim studijama (Kawahara i sar., 2001; Aremu i Meshitsuka, 2006; Shcherbatykh i Carpenter, 2007; Ferreira i sar., 2008). Ipak, neke studije nisu dokazale postojanje povezanosti (Graves i sar., 1998; Polizzi i sar., 2002).

Ustanovljeno je da koncentracije aluminijuma u humanom moždanom parenhimu rastu sa godinama (Yokel, 2000; Wu i sar, 2008). Ovaj metal je detektovan *post mortem* u neurofibrilarnim vlaknima (Meiri, 1993) i senilnim plakovima obolelih od AB (Good i Perl, 1993; Solomon, 2001). Novija istraživanja su, *in vivo*, korišćenjem transmisione elektronske mikroskopije, potvrdila ko-lokalizaciju Al i amiloid β peptida u središtu senilnih plakova lokalizovanih u hipokampalnom i temporalnom lobusu obolelih od AB (Yumoto i sar., 2009). Studija Rondeau i sar. (2009) pokazala je značajno veći kognitivni pad u subjekata sa većim dnevnim unosom Al^{+3} kroz pijaću vodu ($\geq 0,1$ mg/dnevno) kao i u osoba na geografskim područjima gde je veća ekspozicija prema aluminijumu. Stoga je sa razlogom pretpostavljeno da se aluminijum može smatrati važnim faktorom rizika za nastanak AB.

Studije na animalnim modelima, još pre 30 godina, su pokazale da unošenje aluminijum citrata oralnim putem japanskim zečevima izaziva neurofibrilarnu degeneraciju prednjih rogova kičmene moždine (Kihira, 1994). Pokazano je i da intracerebroventrikularna infuzija aluminijuma u belih zečeva dovodi do pojave neurofibrilarnih klupka (Savory i sar., 2006). Takodje je ustanovljeno, ranijim *in vivo*

istraživanjima, da administracija soli Al intracerebralno ili pereferno u mačaka (Crapper i sar. 1973), miševa (Games i sar., 1995), pacova (Brining i sar., 1996) i majmuna (Uno i sar., 1999) indukuje formaciju neurofibrilarnih vlakana.

Navedena istraživanja potkrepljena su proučavanjem Exley i sar. (1993) koja su po prvi put demonstrirala, cirkularno dihroiznom spektroskopijom (CD spektroskopija), konformacijske promene A β proteina (1–40) indukovane aluminijumom. Ustanovljeno je i toksično dejstvo različitih jedinjenja aluminijuma i *in vitro* na hipokampalne ćelije u kulturi (Platt i sar., 2007). Dokazano je da Al promovise fosforilaciju tau proteina dovodeći do smanjene solubilnosti i sklonosti ka agregaciji *in vivo* i *in vitro* (Shin i sar., 1994). Pokazano je da Al³⁺ indukuje amiloidnu agregaciju i fibrilogenezu i stvara komplekse sa A β , a nastali Al³⁺-A β kompleksi bitno menjaju strukturne karakteristike lipidnog dvosloja u lizozomima (Ricchelli i sar., 2005) i imaju neurotoksične efekte (Drago i sar., 2008). Rezultati Chen i sar. (2011) dokazali su da Al indukuje povećanu hidrofobnu ekspoziciju A β . Vezivanjem metala nastaju konformacijske promene A β i menja se stabilnost ovog jedinjenja, kao ključnog faktora u formiranju specifičnih agregata.

1.5. Oksidativni stres i Al

Većina aktuelnih studija je pokazala da ekspozicija Al³⁺ indukuje više različitih bioloških efekata koji mogu biti značajni za nastanak AB kao što su: holinergički deficit (Mičić i Petronijević, 2000), apoptoza (Guo i Liang, 2001; Dickson, 2004), promene u mitohondrijalnoj genskoj ekspresiji (Ghribi i sar. 2001) i inflamacija (Tsunoda i Sharma 1999).

Savremena istraživanja su pokazala da se u Alchajmerovoj bolesti disfunkcionalnost mitohondrijalnog metabolizma javlja rano, pogoršava sa kliničkom deterioracijom i

udružena je sa oštećenjem energetske homeostaze (Bobba i sar., 2010). Po Leuneru, (2007) mitohondrijalna disfunkcija je „prva domina u starenju centralnog nervnog sistema“ i Alchajmerovoj bolesti. Pratico i sar. (2002) su na modelu AB upotrebom transgenih miševa (Tg₂₅₇₆) sa povišenom amiloidnom ekspresijom, merenjem isoprostana (iPs), specifičnih *in vivo* markera lipidne peroksidacije, ukazali na mogući razvojni put amiloidnih tvorevina. Autori su dokazali da proces lipidne peroksidacije prethodi nastanku amiloidnih plakova. Tome u prilog idu i rezultati studija kojima je dokazana uloga izmenjenog mitohondrijalnog metabolizma kao važnog faktora u patogenzi AB (Sullivan i Brown, 2005; Readnower i sar., 2011).

Oksidativan stres je jedan od pretpostavljenih mehanizama aluminijumom indukovane neurotoksičnosti (Bondy i sar., 1998; Campbell i Bondy, 2000; Pratico i Delanty, 2000; Yuan i sar., 2012). Takodje, dosadašnja istraživanja pokazuju da je oksidativni disbalans krucijalni događaj u patogenezi AB (Hirai i sar., 2001; Perry i sar., 2002; Butterfield i sar., 2007). Spekuliše se da alteracija mitohondrijalnog metabolizma i posledični nastanak reaktivnih kiseoničnih radikala (ROS) imaju posredničku ulogu u nastanku AB (Ohta i Ohsawa 2006; Parihar i Brewer, 2007). Dokazano je da aktivnost enzima citohrom c oksidaze (enzimski kompleks IV mitohondrijalnog lanca) snižena u frontalnom i temporalnom korteksu pacijenta obolelih od AB (Kish, 1999) što ukazuje na postojanje deficita u funkcionisanju respiratornog lanca, produkciji ATP-a i alteraciji mitohondrijalnih struktura neurona u Alchajmerovoj bolesti (Manacuso i sar., 2007).

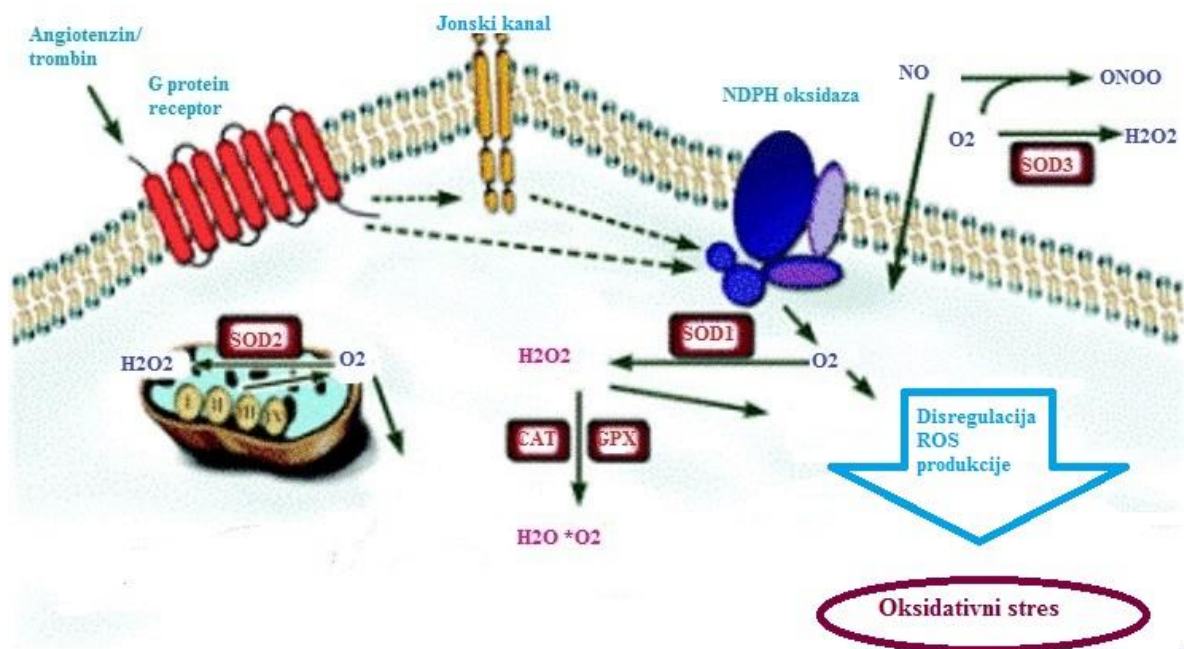
Oksidativni stres nastaje kao posledica disbalansa između produkcije reaktivnih kiseoničnih radikala i sposobnosti njihovog kupiranja antioksidantnim enzimskim sistemima. Produkcija ROS je zapravo destruktivni aspekt oksidativnog stresa koji nastaje u slučajevima hiperprodukcije ili poremećaja uklanjanja kiseoničnih radikala. Hiperprodukcija ROS dovodi do oštećenja i destrukcije ćelijske arhitektonike i njenih komponenti uključujući gradivne lipide, proteine pa i samu DNK (Imlay, 2003). Najefikasniji ćelijski antioksidantni sistemi obuhvataju enzime - superoksid dizmutazu, katalazu i glutation peroksidazu, dok su manje poznati ali, takodje veoma značajni,

antioksidansi perioksiredoksini i sulfiredoksin. Također, među enzimima koji imaju antioksidatntno dejstvo, iako ono nije primarno, izdvajaju se paraoksonaza, glutation- S-transferaza i aldehyd dehidrogenaza (Ceron i sar., 2014).

Superoxid dizmutaza (SOD) je metaloenzim, prisutan u svim eukariotskim ćelijama, koji aktivno učestvuje u eliminaciji superoksid anjona. SOD atlernativno katalizuje dizmutaciju superoksidnog radikala (O_2^-) u običan molekul kisenika (O_2) i vodonik peroksid (H_2O_2). Postoje tri izoenzimske forme: Cu,Zn zavisna SOD (SOD_1), Mn zavisna SOD (SOD_2) i ekstracelularna SOD (SOD_3).

Katalaza je ezim koji katalizuje razlaganju vodonik peroksida na kiseonik i vodu. Po svojoj strukturi je tetramer sa četiri polipeptidna lanca koja u svom središtu sadrže porfirinski hem.

Glutation peroksidaza je familija više različitih izoezima (GPx_{1-8}) čija glavna uloga u ćelijama je protektivna u odnosu na oksidativni stres. Ovaj seleno protein u svom aktivnom centru umesto normalnog cisteina, sadrži selenocistein. Peroksidaze koji sadrže selen sačinjavaju familiju enzima kojoj pripadaju najmanje četiri tipa enzima. „Klasična“ glutation peroksidaza (cGPx) deluje na H_2O_2 i hidroperokside masnih kiselina i holesterola, ali ne i na esterifikovane lipide kao što su oni prisutni u lipoproteinima. Fosfolipidna hidroperoksidna glutation peroksidaza (PHGPx) je jedini enzim za koji se zna da redukuje lipidne hidroperokside iz lipoproteina. Ova izoforma je vezana za membranu, i kao i cGPx se ne nalazi u ekstracelularnim tečnostima (Miljak, 2009). Zapravo, osnovna biološka funkcija GPX je da redukuje lipidne hidroperokside u odgovarajuće alkohole, a slobodan vodonik peroksid u molekule vode (slika 2).



Slika 2. Preuzeto i korigovano iz: Mendez i sar. 2005.

Šematski prikaz funkcionisanja antioksidativnih enzima. Superoksidizmutaze - SOD₁, SOD₂ i SOD₃ i njihova uloga u kupiranju slobodnih radikala. Citosolni mitohondrijalni i ekstracelularni O₂⁻ se pretvaraju u H₂O₂ posredstvom sve tri izoforme SOD enzima. Katalaza (CAT) i glutation peroksidaza (GPX) vrše dalju medijaciju konvertujući H₂O₂ u vodu i molekul kiseonika

Dosadašnja postavka da se amiloid β akumulira isključivo ekstracelularno, pobijena je citološkim i biohemijским studijama na modelu AB u pacova (Chen i Yan, 2006; Reddy, 2009) kojima je dokazana stimulacija ulaska A β peptida u mitohondrije kortikalnih neurona, putem specifičnog transportera (translokaze) i taloženje unutar mitohondrijalnih krista. Sličan distribucioni obrazac dokazan je i na biopsijskom humanom materijalu korteksa imunoelektronskom mikroskopijom (Hansson Petersen i sar., 2008). Nadalje, Ansari i Scheff, (2010) su pokazali da na *postmortem* materijalu obolelih od AB u različitim fazama ispoljavanja oboljenja (umereno, razvijeno, terminalno), postoji pozitivna korelacija između stepena razvoja bolesti verifikovana Mini Mental Testom (MMT) i pada aktivnosti antioksidativnih enzima (superoksid dizmutaza, katalaza, glutation peroksidaza) u sinaptosomalnoj frakciji korteksa. Takođe je sinhrono zabeležen porast lipidnih peroksida već u fazi umerenog kognitivnog deficita.

Prethodna istraživanja na modelu džerbila (Mičić i sar., 1999) pokazala su da serumska koncentracija Al raste nakon 24 h od ingestije AlCl₃ u dozi od LD₅₀, da se u istom vremenskom intervalu beleži značajan pad aktivnosti mitohondrijalne citohrom *c* oxidaze u moždanim strukturama. Ovakva redukcija enzimske aktivnosti dovodi do kompromitacije transporta slobodnih elektrona unutar mitohondrija i konsekventnog nagomilavanja kiseoničnih slobodnih radikala. Nadalje, istraživanja su dokazala (Mičić i sar., 2003) da se kao posledica nagomilavanja ROS beleži porast ukupne aktivnosti SOD 24 časa nakon *per os* administracije Al u dozi LD₅₀.

Stvaranje ROS u mitohondrijama se do nedavno smatralo glavnim uzrokom oksidativnog stresa. Međutim, novijim istraživanjima se sve više ukazuje na ulogu nikotinamid adenozn dinukleotid fosfat oksidaze (NADPH oksidaze) u nastanku oksidativnog disbalansa.

Familija NADPH oksidaza (NOX) se sastoji od najmanje sedam do sada otkrivenih izoformi - NOX1 do 5 i DUOX1 i 2, koje imaju jedinstvenu distribuciju u organizmu i mogu se detektovati u raznim tkivima i centralnom nervnom sistemu (CNS) (Sorace i

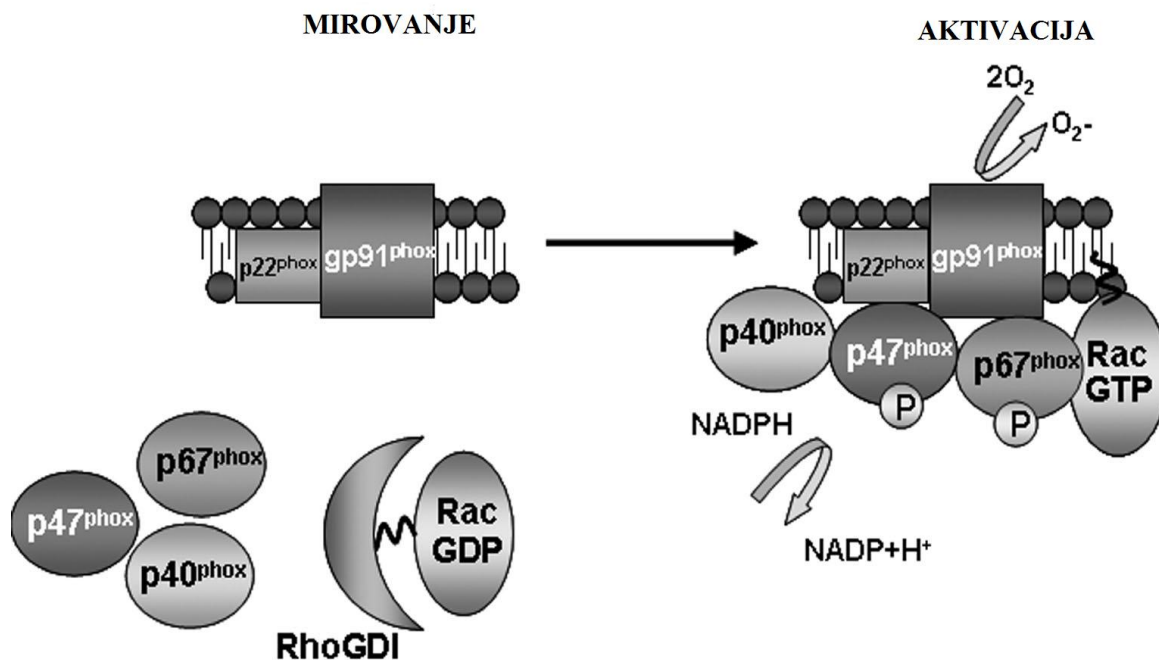
Krause, 2009). NOX enzimi su široko rasprostranjeni u CNS gde, kako se smatra, imaju značajnu ulogu kako u fiziološkom funkcionisanju tako i u nastanku pojedinih oboljenja mozga.

Ekspresija izoformi NOX₁₋₃ pokazana je u neuronima, mikrogliji i astrocitima (Sorace i Krause, 2009).

NOX₁ pojačava osetljivost neurona na inflamatorni bol, dok deficijencija ovog enzima snižava toplotnu i mehaničku hiperalgeziju tokom inflamacije ali ne utiče na nocioceptivni odgovor na toplotu ili mehanički stimulans (Ibi i sar., 2008).

NOX₂ protein je heterodimer sa većom subjedinicom gp91^{phox} i transmembranskom subjedinicom p22^{phox} dok je je kompleks subjedinica: p47, p67 i p40 citosolan i učestvuje u procesu aktivacije fagocita (Babior, 2004). NOX se aktivira kada se citosolna subjedinica fosforiliše zajedno sa Rac1 proteinom rezultirajući translokacijom na membranu, povezivanjem sa transmembranskim subjedinicama i nastankom aktivne formacije kompleksa NADPH oksidaze. Krajnji produkt je nastanak superoksida (Lambeth, 2004; Bedard and Krause, 2007; William, 2008) (slika 3).

Najbolje dokumentovano humano oboljenje vezano za gubitak funkcije NOX enzima je hronično granulomatozno oboljenje. U pitanju je imunodeficijencija izazvana mutacijom jednog od gena koji vrše ekspresiju NOX₂ kompleksa (Stasia i Li, 2008).



Slika 3. Preuzeto iz : Wilkinson i Landreth, 2006

Aktivacija makrofagnog NADPH oksidaza kompleksa. Stimulacija mikroglije indukuje aktivaciju citoplazmatskih komponenti. Tokom aktivacije dolazi do prelaska Rac1 u aktivnu formu, posredovanu guanozin trifosfatom (GDP) i fosforilacije subjedinica p47^{phox} i p67^{phox}. Ove subjedinice se translociraju na membranu gde reaguju sa p22^{phox} i p91^{phox} (NOX₂) izazivajući produkciju reaktivnih kiseoničnih radikala.

Amiloid β je proinflamatorni okidač za aktivaciju mikroglije, indukuje NOX₂ aktivaciju kako u mikrogliji tako i u neuronima direktno (Shelat i sar., 2008). Mikroglijalna funkcija je monitorna, mandatna i benefitna za CNS. Nadgleda i prva reaguje na događanja u moždanim strukturama. Aktivacija mikroglije i astrocita tzv „reaktivna mikroglijoza” nastaje kao odgovor na proinflamatorne okidače: agregaciju ili oligomerizaciju amiloida β .

Pokazano je da do aktivacije NOX₂ enzima dolazi u moždanim strukturama pacijenta obolelih od AB i da NADPH oksidaza aktiviranjem mikroglije dovodi do produkcije ROS koji pokazuju potencijalnu toksičnost za okolne neurone obolelih pacijenta (Shimohama i sar., 2000). Takođe je pokazano i da NOX₂ inhibitorni peptid gp91ds-tat, redukuje oksidativni stres i nastanak patološkog amiloida β na eksperimentalnom modelu miševa (Park i sar., 2008).

Ove opservacije sugerišu da se NOX inhibitori mogu kvalifikovati kao protektori u ranim fazama bolesti i mogući kandidati u terapiji Alchajmerove bolesti (Wang i sar., 2008; Block, 2008).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

CILJEVI ISTRAŽIVANJA

(I) Ispitati dinamiku promena holinergičkog sistema (aktivnost acetiholinesteraze), pokazatelja oksidativnog stresa (sadržaj lipidnih peroksida, koncentracija superoksid anjona, koncentracija sulfhidrilnih grupa, aktivnost superoksid dizmutaze i katalaze) i enzima respiratornog lanca (aktivnost citohrom *c* oksidaze i kompleksa I) u korteksu, hipokampusu, talamusu i *nc. caudatus*-u životinja u toku prva 24 sata od akutnog tretmana različitim dozama (LD_{25} i LD_{50}) aluminijuma hlorida ($AlCl_3 \cdot 6H_2O$).

(II) Odrediti aktivnost citohrom *c* oksidaze i kompleksa I, aktivnost acetiholinesteraze i pokazatelje oksidativnog stresa (sadržaj lipidnih peroksida, koncentracija superoksid anjona, koncentracija sulfhidrilnih grupa, kao i aktivnost superoksid dizmutaze i katalaze) u korteksu, hipokampusu, talamusu i *nc. caudatus*-u džerbila nakon subakutnog tretmana $AlCl_3$ koji je aplikovan gavažom u dozi LD_{10} u toku tri nedelje.

(III) Ispitati uticaj subakutnog davanja $AlCl_3$ (LD_{10}) na ekspresiju amiloida β , NADPH oksidaze (NOX), pojedinih izoenzima superoksid dizmutaze (SOD_1 i SOD_2) u mozgu pustinjskih miševa, tehnikama imunohistohemije i *Western* blota.

3. MATERIJI I METODE

3.1. Eksperimentalne životinje

Eksperimentalni rad je obavljen na Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta u Beogradu. Eksperimenti su sprovedeni na pustinjskim miševima (*Meriones Unguiculatus*, eng. *Mongolian gerbils*, džerbili) oba pola, starosti 12 nedelja. Životinje su dobijene iz uzgajališta vivarijuma Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Mongolski džerbili, ukupno 130, prosečne težine oko 60 g, čuvani su u kavezima sa kontaktnom prostirkom, pod normalnim uslovima: temperatura 22 ± 1 °C, relativna vlažnost vazduha 50%, sa 12-časovnim ciklusom svetlo-mrak, sa svetlom uključenim u 9 h. Hrana i voda su im bili dostupni *ad libitum*, a 6 h pre početka oglada bila im je uskraćena hrana i 2 h pre početka oglada i voda, s obzirom na unošenje Al tehnikom lavaže želudca. Smeštajni prostor – kavezi životinja koje su tretirane 21 dan bile su oplemenjene penjaliciama i koturima od plastike.

Sve eksperimentalne procedure su bile odobrene od strane Etičke komisije za zaštitu dobrobiti oglednih životinja Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (dozvola broj 4839/2).

Šestdeset životinja je akutno tretirano, gastričnom sondom (gavažom) sa $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ i to po trideset u dozi LD_{25} (1,85 g/kg telesne težine) i LD_{50} (3,7 g/kg telesne težine) (Merck Index, 1968). Grupa kontrolnih životinja, ukupno trideset, tretirana je ekvivalentnom zapreminom fiziološkim rastvorom (0,9% NaCl), takođe gavažom. Životinje su anestetizirane sa pentobarbital-Na (Vetanarcol, Werfft-Chemie, Vienna) i žrtvovane dekapitacijom u grupama od po deset 2, 6 i 24 sata nakon tretmana.

Dvadeset Mongolskih džerbila podvrgnuto je subaktnom tretmanu “per os” sa $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ u dozi LD_{10} (0.74g/kg telesne težine) i to po protokolu 5 dana tretman, dva dana pauza. Ove životinje žrtvovane su 21 dan posle početka tretmana. Kontrolna grupa

životinja (n=20) je u istim terminima dobijala fiziološki rastvor i žrtvovana, takođe, nakon 21 dan od početka tretmana.

3.2. Izolovane struktura za biohemijske analize

Glave Mongolskih džerbila žrtvovanih posle 2, 6 i 24 časa od akutnog tretmana sa AlCl_3 ili NaCl (po 10 životinja iz svake grupe) kao i glave životinja koje su žrtvovane nakon 21 dan od početka subakutnog tretmana sa AlCl_3 ili NaCl (takođe po 10 životinja iz svake grupe), su trenutno zamrzavane u tečnom azotu a, zatim čuvane na -85°C . Moždane strukture (korteks, hipokampus, talamus i *nc.caudatus*) preparisane su na hladno i homogenizovane u hladnom puferisanom saharoznom medijumu (0,25 M/L saharoze, 10 mmol/ K/NaPO_4 pufer pH 7.0 i 1 mmol/L EDTA). Za određivanje enzimske aktivnosti u sinaptosomalnoj i mitohondrijalnoj frakciji specifičnih moždanih regiona, primenjena je metoda po Whittakeru i Barkeru (1972). Homogenizacijom je usitnjeno tkivo i potom centrifugirano na 1000G 15 minuta. Supernatanti su centrifugirani 30 minuta na 20000G. Ovako dobijeni supernatant predstavlja neprečišćenu sinaptosomalnu frakciju koja sadrži membranske vezikule (mikrozome) nastale od glatkog i granulisanog endoplazmatičnog retikuluma, Goldžijevog aparata i plazma membrane kao i sve solubilne komponente citoplazme. Talog je resuspendovan u dejonizovanoj vodi i ostavljen 60 minuta na $+4^\circ\text{C}$ uz povremeno mešanje. Ovako resuspendovan talog je zatim centrifugiran na 1700G 15 minuta. Dobijeni supernatant predstavlja neprečišćenu mitohondrijalnu frakciju i sadrži mitohondrije, lizosome i peroksizome.

Neprečišćena sinaptosomalna i mitohondrijalna frakcija su čuvane na -80°C .

3.3. Biohemijske analize

U uzorcima neprečišćene sinaptozomalne frakcije korteksa, hipokampusa, talamus i *nc.caudatus*-a spektrofotometrijski je određivana aktivnost pojedinih enzimskih sistema (AChE, SOD, CAT, MDA, Kompleks I, sulfhidrilne grupe i supreoksid anjon), dok je aktivnost COX enzima određivana u mitohondrijalnoj frakciji.

3.3.1. Merenje sadržaja proteina

Koncentracija proteina u uzorcima je određivana spektrofotometrijski po metodi Lowry i sar. (1951). Kao standard je korišćen katalizovan serumski albumin govečeta BSA (*Sigma*). Količina proteina je određivana u supranatantu za određivanje enzimske aktivnosti neposredno po ekstrakciji. Razblaživanjem sa saharoznim medijumom koncentracija proteina je u svim uzorcima svedena na približno 1mg/ml.

3.3.2. Aktivnost enzima acetilholinesteraze (AChE)

Aktivnost acetilholinesteraze je određivana po metodi Ellman i sar. (1961). Princip reakcije je da acetilholinesteraza razlaže acetiltioholin jodid čiji se produkt razlaganja vezuje za DTNB (5,5'-ditiobis-2 nitro benzojeva kiselina). Kao rezultat reakcije nastaje žuto obojeni kompleks. Količina nastalog kompleksa merena je spektrofotometrijski i predstavlja indeks aktivnosti acetilholinesteraze. U uzorak je dodavan tetraizopropilpirofosfoamin (isoompa) koji je inhibitor pseudoholinesteraze. Epruvete su inkubirane na 37°C u trajanju od 30 min. Smeša je zatim hladena pod mlazom vode, i nakon toga je dodata reakciona smeša koja je sadržala DTNB i natrijum bikarbonat u 0,1 M fosfatnom puferu (pH=7,2). Nakon 5 min (radi stabilizacije temperature) dodavan je acetiltioholin jodid i praćena je promena ekstinkcije spektrofotometrijski na 412 nm u toku 3 min. Aktivnost acetilholinesteraze određivana je po formuli:

$AChE = \Delta A / (1,36 \times 10^4 \times 1020 / 25 \times 1 / \text{conc proteina})$, gde je ΔA – promena apsorbance u toku 1 minuta, $1,36 \times 10^4$ – molarni apsorbcioni koeficijent žutog aniona, 25 – zapremina uzorka u μl , 1020 – ukupna zapremina u kiveti u μl . Sve korišćene hemikalije i reagensi su analitičkog stepena čistoće, proizvođača *Merck* i *Sigma*.

3.3.3. Koncentracija lipidnih peroksida (MDA)

Stepen lipidne peroksidacije određivan je na osnovu sadržaja MDA u sinaptosomalnoj frakciji korteksa i hipokampusu po metodi Rehnrona i sar. (1980). Malonildialdehid (MDA) nastao iz polinezasićenih masnih kiselina u procesu lipidne peroksidacije reaguje sa tiobarbituratna kiselinom (TBA) stvarajući obojeni kompleks. Količina stvorenog MDA+TBA merna je spektrofotometrijski na 533nm i predstavlja indeks lipidne peroksidacije.

3.3.4 Koncentracija sulfhidrilnih grupa (SH grupa)

Određivanje koncentracije sulfhidrilnih grupa vršeno je spektrofotometrijskom metodom korišćenjem Ellman ovog reagensa (5,5' ditiobis- (2-nitrobenzoična kiselina)(DTNB) po metodi Sedlak i Lindsay (1968). DTNB se redukuje u prisustvu SH grupa u nitromerkaptobenzoični kiseli anjon žute boje. Determinisanje totalnih sulfhidrilnih grupa određivano je putem merenja absorbance na 412nm.

3.3.5. Aktivnost enzima superoksid dizmutaze (SOD) i Kompleksa I

Aktivnost SOD određivana je kao procenat inhibicije autooksidacije adrenalina u baznoj sredini po metodi Sun and Zigman (1978). Step en inhibicije srazmeran je aktivnosti enzima. Aktivnost ukupne SOD određivana je kinetički, kao promena ekstinkcije u vremenu (10 minuta) na talasnoj dužini od 480nm. Koncentracija superoksid anjona je određivan redukcijom nitro plavog tetrazoliuma (NBT) po metodi Spitz i Oberley (1989). Redukcija NBT je određivana spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 560 nm.

3.3.6. Aktivnost katalaze (CAT)

Aktivnost katalaze je poroporcionalna količini utrošenog vodonik peroksida u jedinici vremena i izračunava se iz razlike u sadržaju H_2O_2 u inkubacionoj mešavini pre i posle dodavanja enzima. Koncentracija H_2O_2 je određivana spektrofotometrijski pomoću amonijum molibdata, sa kojim gradi žuto obojeno kompleksno jedinje sa maksimalnom apsorbancom na talasnoj dužini od 405nm (Goth i sar.,1991).

3.3.7. Aktivnost enzima citohrom *c* oksidaze (COX)

Aktivnost citochrom *c* oksidaze, poslednje komponente u mitohondrijalnom respiratornom lancu, određivana je na osnovu pada absorbance tokom oksidacije citohrom C-fero oksida u citohrom C-feri oksid. Kinetika je praćena u kalijumfosfatnom puferu (0.05 M, pH = 7.1) tokom 3-5 minuta spektrofotometrijskom metodom sa maksimalnom apsorbancom na 550 nm, po metodi Hess i Pope (1960).

3.4. Određivanje ekspresije proteina tehnikom Western blot

Ekspresija β amiloida, enzima NADPH oksidaze, kao i pojedinih izoenzima superoksid dizmutaze (SOD_1 i SOD_2) određivana je tehnikom *Western blot*. Po pet životinja iz eksperimentalne i kontrolne grupe, koje se u toku tri nedelje subakutno tretirane sa $AlCl_3$ ili NaCl, žrtvovano je cervikalnom dislokacijom i dekapitacijom, nakon čega su moždane strukture preparisane na hladno, a potom izolovani ukupni proteini u RIPA puferu (300 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7.5, 0.2%SDS, 2% Na-deoksiholat, 2% Triton X-100).

Zatim je izvršena elektroforeza proteina u denaturišućem SDS poliakrilamidnom gelu, nakon čega je izvršen transfer proteina sa gela na membranu. Membrane su potom nespecifično blokirane 1h (sa 5% nemasnim mlekom u prahu), nakon čega su inkubirane sa primarnim antitelom preko noći i potom sa sekundarnim antitelom (1h). U foto-komori, rendgen film je bio izložen membrani koja je tretirana sa *Enhanced Chemiluminescence System* (ECS) i razvijen. Blotovi su skenirani i semikvantitativna denzitometrijska analiza vršena je korišćenjem programa *ImageQuant 5.2*.

3.5. Priprema uzoraka za imunohistohemiju (kriopreseci) i imunohistohemija

Za imunohistohemijska ispitivanja žrtvovano je po 5 životinja iz subakutno tretirane eksperimentalne i kontrolne grupe. Životinje su najpre anestetizirane hloral hidratom (i.p.) i zatim perfundovane sveže pripremljenim 4% paraformaldehidom (4°C). Izvađeni mozgovi su, zatim, ostavljeni 24h u 4% paraformaldehidu nakon čega su prebačeni u rastući gradijent saharoze (10%, 20%, 30%) u 0.1M fosfatnom puferu pH=7.4 (krioprezervacija). Mозgovi su trenutno zamrzavani na -80°C uranjanjem u 2-metilbutan. Zamrznuti mozgovi sečeni su kriokatom (*Leica*) na -25°C, a debljina isečaka je iznosila 25µm. Isečeni uzorci stavljeni su na superfrost histološke pločice i čuvani na -20 °C. Za imunohistohemijske studije, prvo je izvršeno demaskiranje antigena u citratnom puferu, pH=9 (30 min na 80°C). Nakon toga, je načinjeno nespecifično blokiranje u normalnom kozijem serumu (1h na sobnoj temperaturi), a potom su uzorci inkubirani (24-48h na +4°C) sa primarnim antitelima prema β amiloidu (zečije poliklonalno anti - β amiloid antitelo, *Abcam, UK*), a zatim sa odgovarajućim sekundarnim antitelom (1h na sobnoj temeperaturi). Poliklonsko kozije anti SOD₁ i poliklonsko kozije anti SOD₂ antitelo su nabavljeni od *Santa Cruz Biotechnology, Inc, Kalifornija, SAD*. Za vizuelizaciju je korišćen *En Vision Dual Link*

System-HRP (DAKO) koji sadrži sekundarna antitela (prema primarnim mišjim i zečijim antitelima) konjugovana sa peroksidazom rena (*horseradish peroxidase*, HRP). Nakon reakcije sa sekundarnim antitelima sledila je inkubacija (10 minuta) sa 3,3'-diaminobenzidinom (DAB) koji je hromogeni supstrat za peroksidazu, što dovodi do pojave precipitata braon boje na mestu prisustva antigena. Obojeni isecci su analizirani svetlosnom mikroskopijom uz pomoć softvera *ImageJ*.

3.6. Statistička analiza

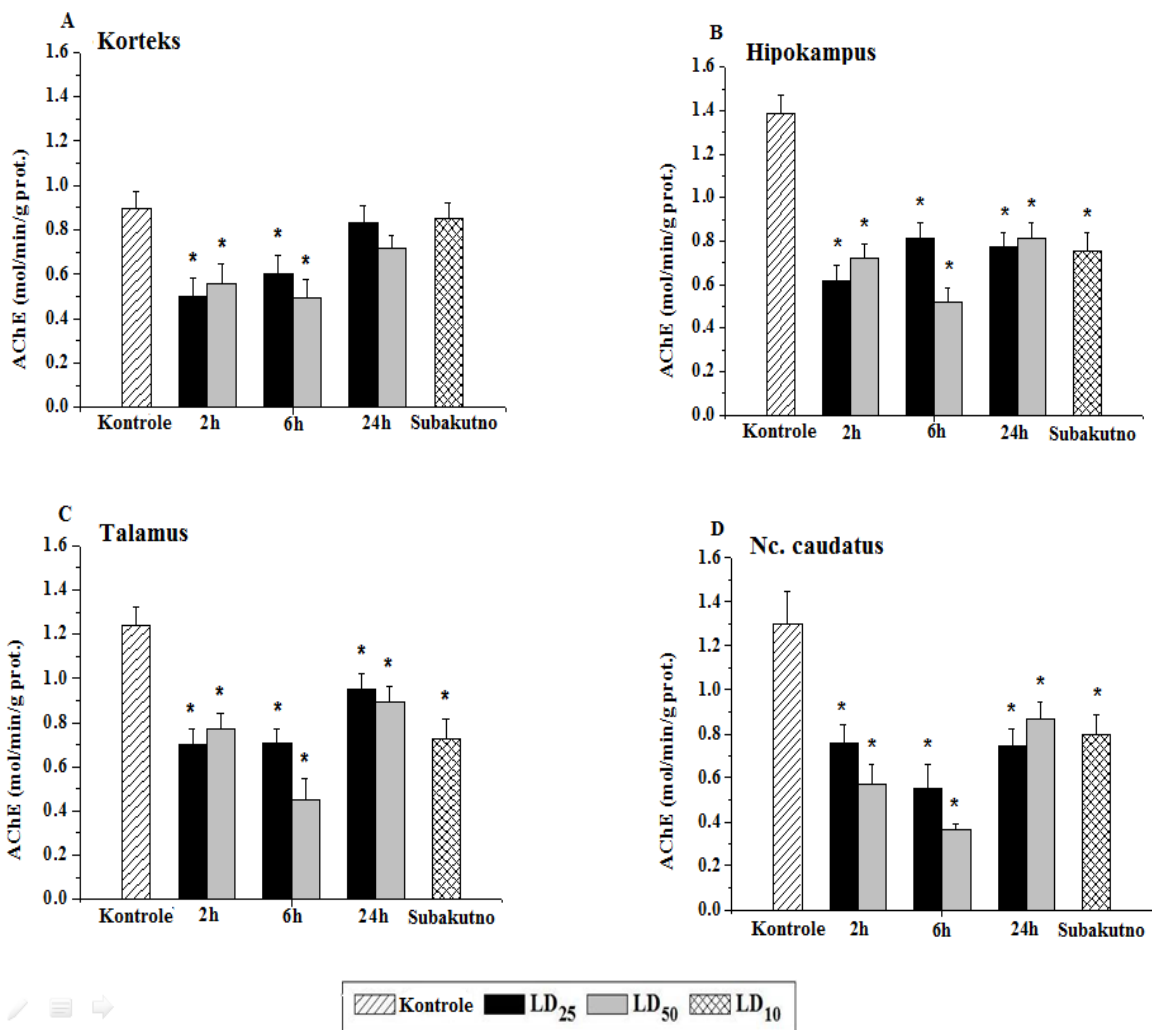
Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška. Poređenje dobijenih rezultata između kontrolne i pojedinih eksperimentalnih rezultata vršeno je pomoću programa *Statistica StatSoft*, odgovarajućim statističkim testovima, pre svega jednofaktorskom analizom varijanse - univarijantna analiza ispitivanja uticaja odabranog prediktora za zavisnu varijablu – ANOVA praćenom *Bonfferini* testom. Podaci za pojedine parametre su podvrgnuti T testu za dva nezavisna uzorka. Grafički prikaz je urađen u programu *OriginPro8*. Statistička značajnost definisana je na nivou verovatnoće nulte hipoteze od $p \leq 0.05$.

4. REZULTATI

Tokom laboratorijskog istraživanja 10 od 30 džerbila tretiranih dozom LD₅₀, 4 od 30 životinja tretiranih dozom LD₂₅, kao i 2 od 10 životinja tretiranih subakutno dozom od LD₁₀ je egzitalo. Letalni ishod u eksperimentalnih životinja je bio u skladu sa primenjenom dozom Al. Aktivnost AChE, SOD i CAT, kao i nivo lipidnih peroksida (MDA) određivani su u sinaptosomalnoj frakciji, dok je COX aktivnost merena u mitohondrijalnoj frakciji. S obzirom da statističkom analizom nisu uočene signifikantno značajne razlike između pojedinačnih kontrolnih grupa životinja, u rezultatima su dobijene vrednosti prikazane kao srednja vrednost ± standardna greška (SEM) za četrdeset kontrolnih životinja.

4.1.Uticaj ingestije Al na aktivnost AChE

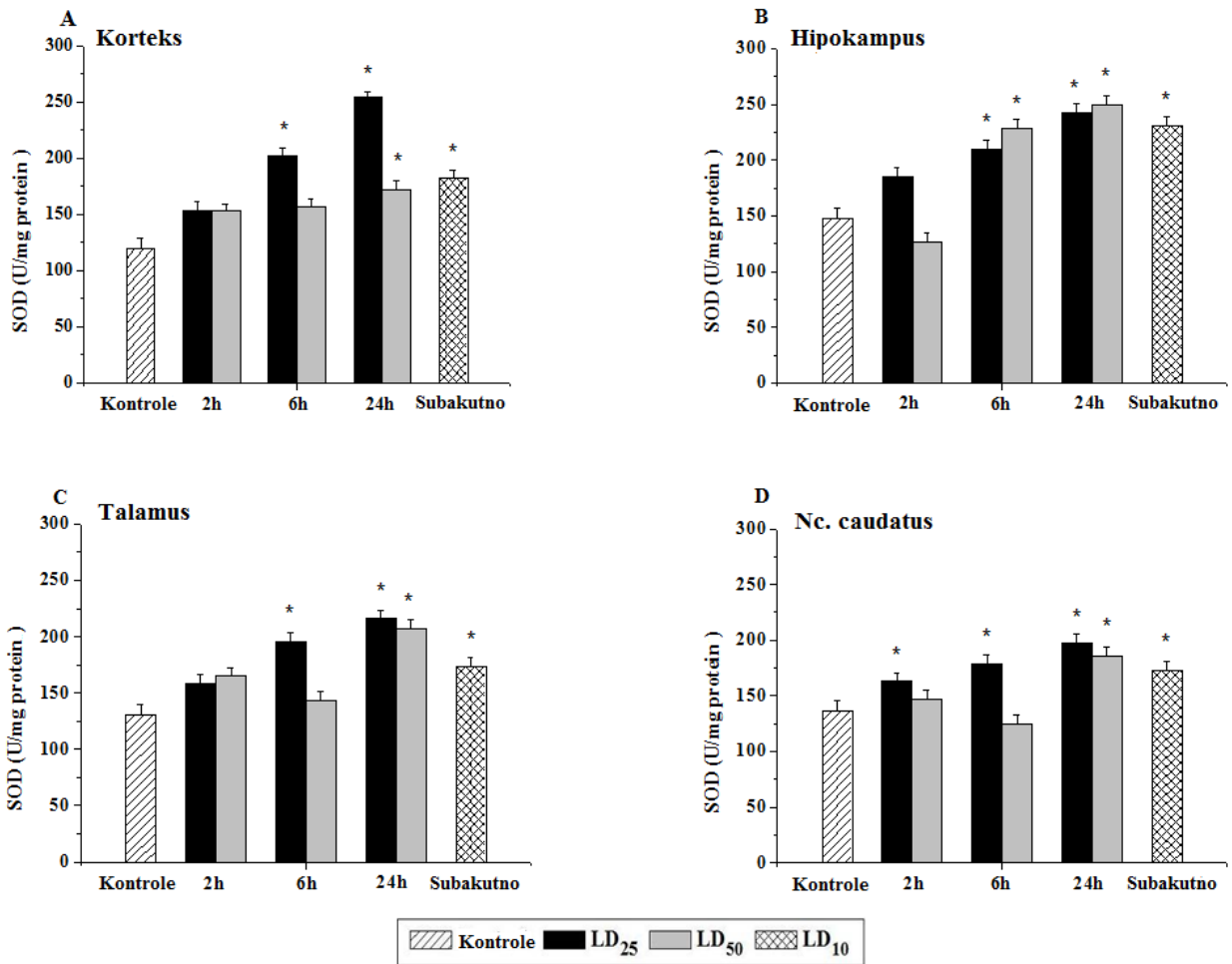
Promene aktivnosti AChE nakon akutne ili subakutne ingestije Al u ispitivanim moždanim strukturama džerbila prikazane su na Grafikonu 1. Istraživanje je pokazalo da je aktivnost AChE signifikantno niža u svim ispitivanim moždanim strukturama životinja izloženih dejstvu ingestiranog aluminijuma u poredjenju sa kontrolama. U slučaju akutnog trovanja značajne promene nastaju rano, 2 h nakon aplikacije Al i održavaju se nakon 6 i 24 h. U periodu od 24 h časa po administraciji Al, izmerena aktivnost AChE je bila nešto viša u odnosu na 6h ali i dalje signifikantno niža u komparaciji sa kontrolnom grupom u svim izučavanim strukturama mozga osim u korteksu. Tokom ukupnog perioda praćenja promene enzimske aktivnosti nisu zavisile od administrirane doze Al. Pad aktivnosti AChE opserviran je i nakon subakutnog tretiranja Al u svim ispitivanim moždanim strukturama (Grafik 1).



Grafik 1. Acetilholinesterazna (AChE) aktivnost u neprečišćenoj sinaptosomalnoj frakciji korteksa, hipokampusa, talamusa i *nc. caudatus*-a u kontrolnoj grupi i u grupama eksperimentalnih životinja tretiranih sa $\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (LD_{25} , LD_{50} i LD_{10}), 2, 6, 24 časa nakon akutnog trovanja i 21 dan nakon subakutnog trovanja. Vrednosti su reprezentovane u formi srednja vrednost \pm S.E.M za metodološki definsani broj životinja. * $P < 0.05$ vs. kontrole

4.2. Uticaj ingestije Al na aktivnost SOD i produkciju O²⁻

Promene aktivnosti ukupne SOD nakon akutne ili subakutne ingestije Al u ispitivanim moždanim strukturama džerbila prikazane su na Grafikonu 2. Dva časa nakon akutnog trovanja Al, uočavaju se statistički značajne promene aktivnosti enzima u poredjenju sa kontrolnom grupom samo u strukturama *nc. caudatus-a* nakon ingestije doze od LD₂₅. Šest časova po akutnom tretmanu, aktivnost ukupne SOD pokazuje signifikantni porast u svim moždanim strukturama životinja tretiranih dozom Al LD₂₅ u poredjenju sa kontrolama. Sličan obrazac aktivnosti enzima pokazuje u slučaju trovanja dozom LD₅₀ samo u hipokampalnim strukturama. Najizrazitiji porast aktivnosti SOD uočava se 24 h nakon akutnog tretiranja životinja Al. Sličan obrazac značajno povišene enzimске aktivnosti prisutan je u svim ispitivanim moždanim strukturama tretiranih životinja i nakon subakutnog trovanja Al (Grafik 2).



Grafik 2. Superoksid dismutazana (SOD) aktivnost u neprečišćenoj sinaptosomalnoj frakciji korteksa, hipokampusa, talamusa i *nc. caudatus*-a u kontrolnoj grupi i u grupama eksperimentalnih životinja tretiranih sa $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (LD₂₅, LD₅₀ i LD₁₀), 2, 6, 24 časa nakon akutnog trovanja i 21 dan nakon subakutnog trovanja. Vrednosti su reprezentovane u formi srednja vrednost \pm S.E.M za metodološki definsani broj životinja. *P<0.05 vs. kontrole

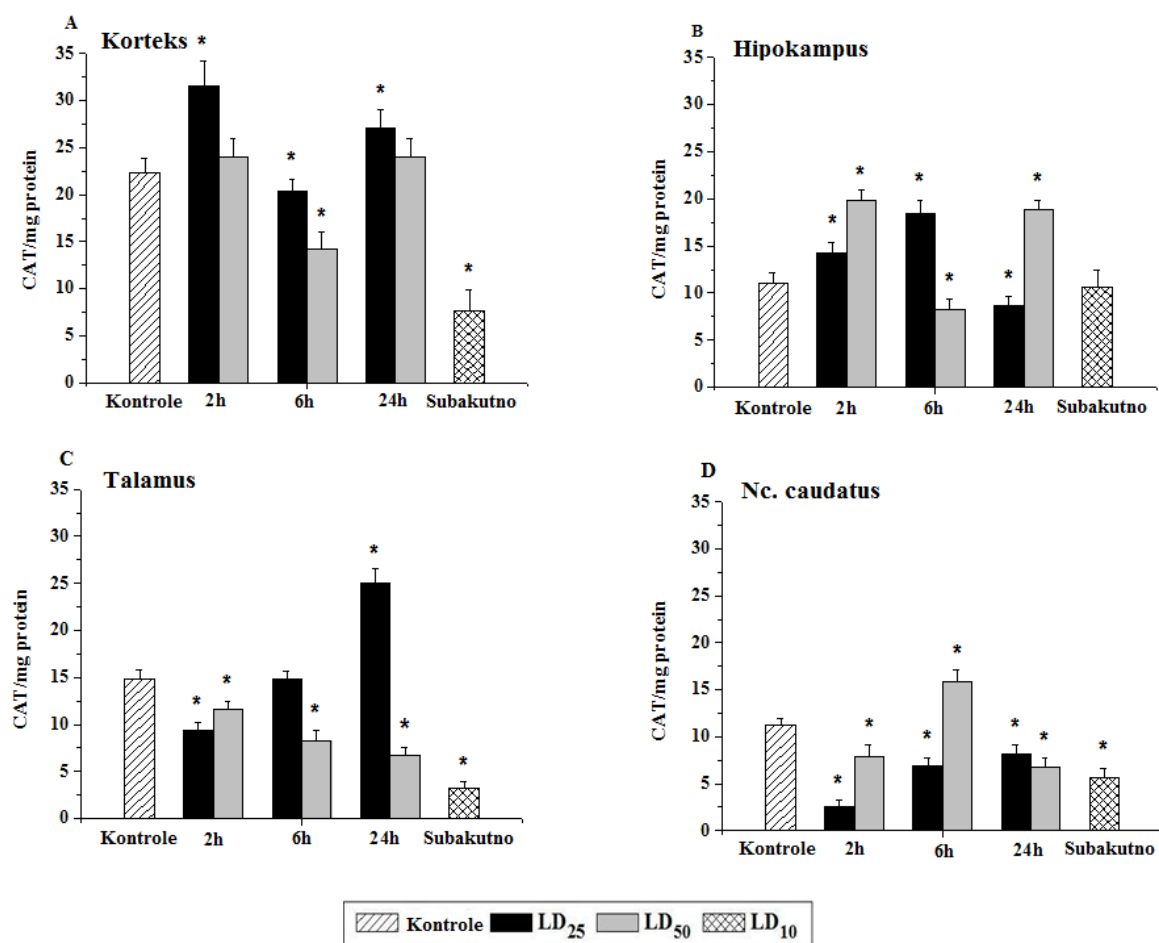
Promene u produkciji O_2^- (tabela 1) korespondiraju sa promenama u aktivnosti ukupne SOD. Porast produkcije superaniona udružen je sa sledstvenim porastom enzimske aktivnosti u neprečišćenoj sinaptosomalnoj frakciji ispitivanih moždanih struktura tretiranih Al. Nakon aplikacije Al u dozi od LD_{25} beleži se porast O_2^- u prvih 2 h i održava se i u narednih 6 h. U narednih 24 h vrednosti superoksidnog aniona su bliske normalnim vrednostima kada se upravo registruje maksimalna aktivnost ukupne SOD. Sličan sled događanja prisutan je i u slučaju administracije Al u dozi LD_{50} . Primećuje se signifikantno značajan porast O_2^- koji se uočava već po isteku 2 h u korteksu i nakon 6 časova u drugim ispitivanim strukturama u poredjenu sa kontrolnom grupom životinja. Po subakutnom trovanju nivoi O_2^- rastu u svim analiziranim moždanim strukturama.

Tabela 1. Koncentracija O_2^- u neprečišćenoj sinaptozomalnoj frakciji korteksa, hipokampusa, talamusa i *nc. caudatus*-a u kontrolnoj grupi i u grupama eksperimentalnih životinja tretiranih sa $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ (LD_{25} , LD_{50} i LD_{10}), 2, 6, 24 časa nakon akutnog trovanja i 21 dan nakon subakutnog trovanja. Vrednosti su reprezentovane u formi srednja vrednost \pm S.E.M za metodološki definsani broj životinja. * $P < 0.05$ vs. kontrole.

	Koncentracija superoksidnog anjona (μ mol NBT/mg proteina)				
	N	Korteks	Hipokampus	Talamus	Nc. Caudatus
Kontrole	40	16.9 \pm 1.3	19.5 \pm 1.6	17.1 \pm 1.6	19.4 \pm 0.8
LD_{25} 2h	9	25.5 \pm 1.8 *	28.8 \pm 2.5 *	21.9 \pm 1.3 *	23.1 \pm 1.4 *
LD_{25} 6h	9	24.8 \pm 1.9 *	25.1 \pm 1.0 *	22.5 \pm 1.6 *	23.8 \pm 1.5 *
LD_{25} 24h	8	19.4 \pm 2.5	17.9 \pm 1.0	16.9 \pm 1.6	16.7 \pm 1.1
LD_{50} 2h	7	22.5 \pm 1.2 *	16.5 \pm 0.7	16.6 \pm 2.4	18.0 \pm 1.7
LD_{50} 6h	7	15.1 \pm 1.1	27.1 \pm 2.1 *	25.3 \pm 3.4 *	23.1 \pm 1.5 *
LD_{50} 24h	6	16.5 \pm 1.5	18.3 \pm 1.1	16.6 \pm 1.2	19.9 \pm 1.7
LD_{10}	8	24.7 \pm 2.2 *	25.1 \pm 1.2 *	23.7 \pm 1.9 *	25.6 \pm 1.4 *

4.3.Uticaj ingestije Al na aktivnost CAT

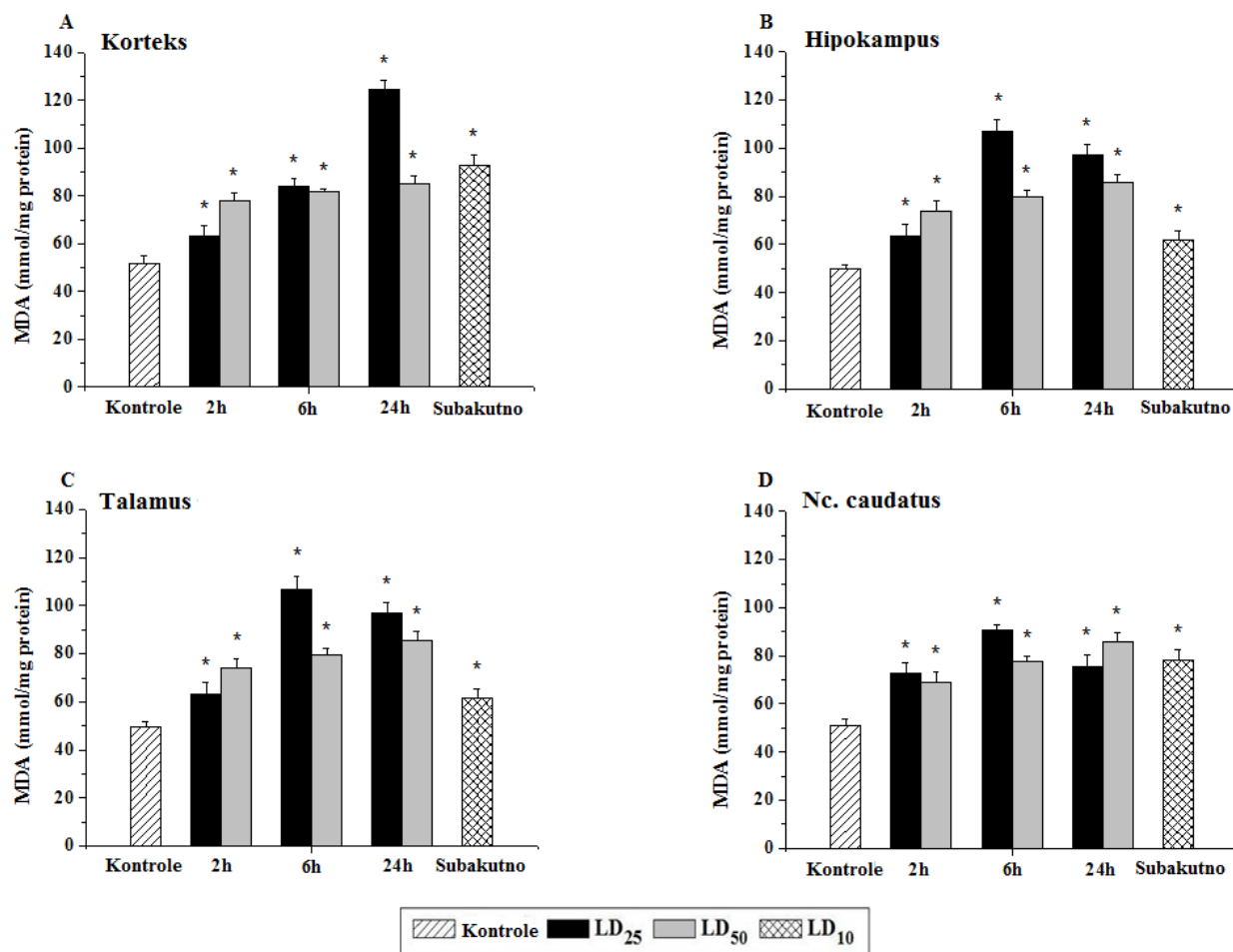
Uticaj ingestiranog Al na promene aktivnosti enzima CAT prezentovane su na Grafikonu 3. Akutna administracija Al izaziva značajne, strukturno specifične promene u aktivnosti CAT u ispitivanim moždanim strukturama. Dva časa nakon akutnog trovanja aktivnost ovog enzima beleži porast u korektksu i hipokampusu, nasuprot tome u talamusu i *nc. caudatus*-u registruje se pad aktivnosti u obe doze aplikovanog Al. Šest časova po ingestiji Al aktivnost CAT opada u svim strukturama, izuzev u hipokampusu u dozi LD₂₅ gde je i dalje prisutna povišena enzimaska aktivnost. Promene su izraženije nakon administracije Al u dozi od LD₅₀. Dvadeset i četiri časa nakon trovanja statistički značajan porast CAT aktivnosti prisutan je u korteksu i talamusu, a pad u hipokampusu i *nc. caudatus*-u nakon davanja doze od LD₂₅. U istom vremenskom intervalu, 24 h po aplikaciji Al u dozi od LD₅₀ CAT aktivnost je nepromenjena u korteksu, beleži porast u hipokampusu i pad u talamusu i *nc. caudatus*-u. Nasuprot strukturno specifičnim promenama aktivnosti enzima u akutnom trovanju, subakutno trovanje sa Al u dozi od LD₁₀ provocira pad aktivnosti enzima CAT u svim ispitivanim moždanim strukturama izuzev hipokampusa, gde vrednost ostaje nepromenjena u poredjenju sa kontrolnom (Grafik 3).



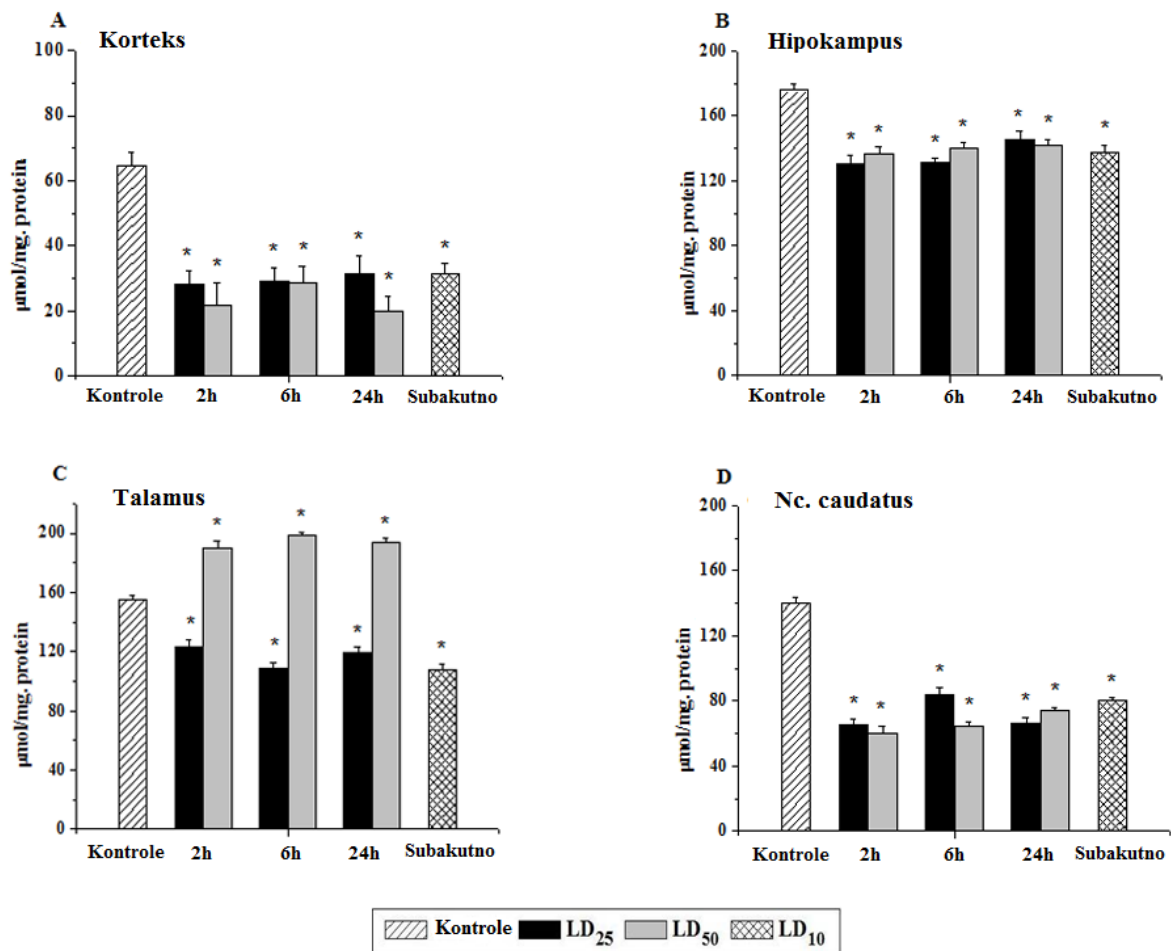
Grafik 3. Katalazna (CAT) aktivnost u neprečišćenju sinaptosomalnoj frakciji korteksa, hipokampusa, talamusa i *nc. caudatus*-a u kontrolnoj grupi i u grupama eksperimentalnih životinja tretiranih sa $\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (LD_{25} , LD_{50} i LD_{10}), 2, 6, 24 časa nakon akutnog trovanja i 21 dan nakon subakutnog trovanja. Vrednosti su reprezentovane u formi srednja vrednost \pm S.E.M za metodološki definsani broj životinja. * $P < 0.05$ vs. kontrole

4.4. Uticaj ingestije Al na vrednosti MDA i SH grupa

Obim lipidne peroksidacije nakon akutnog trovanja $AlCl_3$, predstavljen je vrednošću nivoa MDA i prikazan na Grafiku 4, dok je obim proteinske oksidacije meren vrednostima nivoa SH grupa i prikazan na Grafiku 5. Signifikantno značajan porast MDA i prateći pad koncentracije SH grupa registruje se u korteksu, hipokampusu, talamusu i *nc. caudatus*-u već nakon dva časa po administraciji Al i to u obe aplikovane doze. Vrednosti, na dalje, rastu nakon 6 i 24 h i statistički značajno povećanje je prisutno u svim ispitivanim moždanim strukturama u poredjenju sa kontrolama. Vrednosti nivoa MDA pokazuju, takodje, signifikantan porast nakon subakutnog trovanja u svim tretiranim moždanim strukturama, dok se za vrednosti SH grupa uočava značajan pad u poredjenju sa kontrolama (Grafik 4 i 5).



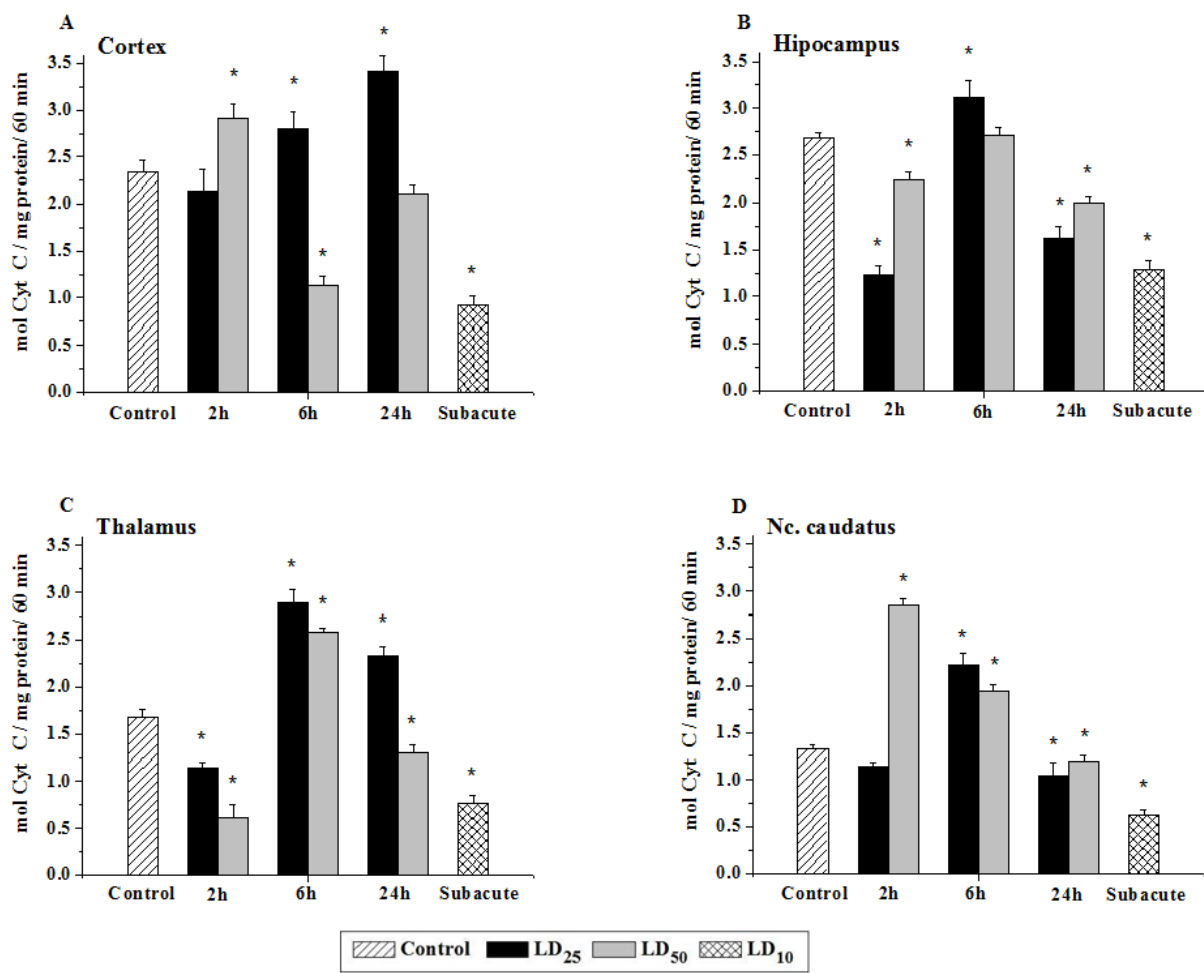
Grafik 4. Nivo lipidnih peroksida (MDA) u neprečišćenju sinaptosomalnoj frakciji korteksa, hipokampusa, talamusa i *nc. caudatus*-a u kontrolnoj grupi i u grupama eksperimentalnih životinja tretiranih sa $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (LD_{25} , LD_{50} i LD_{10}), 2, 6, 24 časa nakon akutnog trovanja i 21 dan nakon subakutnog trovanja. Vrednosti su reprezentovane u formi srednja vrednost \pm S.E.M za metodološki definisani broj životinja. * $P < 0.05$ vs. kontrole



Grafik 5. Koncentracija SH grupa u neprečišćenoj sinaptosomalnoj frakciji korteksa, hipokampusa, talamusa i *nc. caudatus*-a u kontrolnoj grupi i u grupama eksperimentalnih životinja tretiranih sa $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ (LD₂₅, LD₅₀ i LD₁₀), 2, 6, 24 časa nakon akutnog trovanja i 21 dan nakon subakutnog trovanja. Vrednosti su reprezentovane u formi srednja vrednost \pm S.E.M za metodološki definsani broj životinja. *P<0.05 vs. kontrole

4.5. Uticaj ingestije Al na aktivnost COX i Kompleksa I

COX aktivnost u različitim moždanim strukturama džerbila izloženih akutnom i subakutnom trovanju Al prezentovana je na grafiku 6. Dva časa nakon trovanja COX aktivnost u korteksu i *nc. caudatus*-u se ne registruju promene u enzimskoj aktivnosti dok se u hipokampusu i talamusu uočava pad. Šest časova nakon ingestije Al, aktivnost enzima COX pokazuje porast vrednosti u svim moždanim strukturama nakon aplikacije Al u dozi LD₂₅. Nakon administracije Al u dozi LD₅₀ primetan je porast enzimske aktivnosti u talamusu i *nc. caudatus*-u, a pad u korteksu. Dvadeset i četiri časa po tretmanu Al u dozi od LD₂₅ opservira se i dalje porast COX aktivnosti u korteksu i talamusu u poredjenju sa kontrolama, a pad u hipokampusu and *nc. caudatus*-u. Medjutim, u istoj vremenskoj odrednici nakon aplikacije doze Al LD₅₀ zabeležen je pad COX aktivnosti u svim moždanim strukturama izuzev korteksu u kom se ne uočavaju promene. Tokom subakutnog trovanja Al opservira se deplecija u aktivnosti COX enzima u poredjenju sa kontrolama u svim ispitivanim moždanim strukturama.



Grafik 6. Citohrom C oksidazna (COX) aktivnost u neprečišćenoj mitohondrijalnoj frakciji korteksa, hipokampusa, talamusa i *nc. caudatus*-a u kontrolnoj grupi i u grupama eksperimentalnih životinja tretiranih sa $\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (LD₂₅, LD₅₀ i LD₁₀), 2, 6, 24 časa nakon akutnog trovanja i 21 dan nakon subakutnog trovanja. Vrednosti su reprezentovane u formi srednja vrednost \pm S.E.M za metodološki definsani broj životinja. * $P < 0.05$ vs. kontrole.

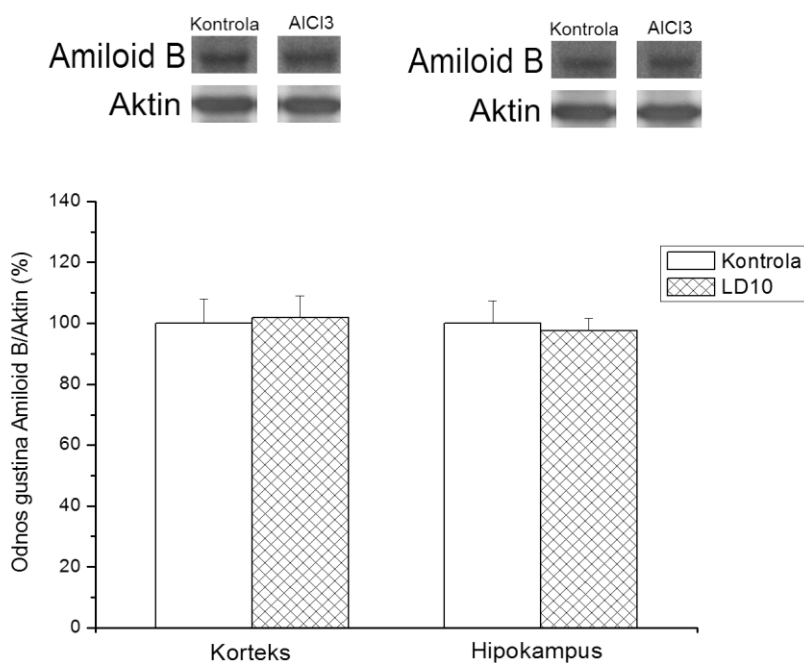
Aktivnost Kompleksa I prezentovana je u Tabeli 2. Akutno i subakutno trovanje Al ne uzrokuje signifikantne promene u aktivnosti ovog segmenta respiratornog lanca u poredjenju sa kontrolnom grupom životinja.

Tabela 2. Aktivnost Kompleksa I u mitohondrijalnoj frakciji različitih moždanih regiona. Rezultaiti su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM

	N	Aktivnost Kompleksa I			
		U/mg			
		Korteks	Hipokampus	Talamus	Nc. Caudatus
Kontrole	40	37.9 \pm 1.5	23.3 \pm 2.1	23.5 \pm 1.5	23.0 \pm 2.0
LD₂₅ 2h	9	32.7 \pm 2.0	24.6 \pm 2.2	26.1 \pm 1.7	28.5 \pm 2.4
LD₂₅ 6h	9	38.0 \pm 4.9	25.3 \pm 2.8	24.3 \pm 1.9	21.7 \pm 3.0
LD₂₅ 24h	8	35.0 \pm 2.9	27.7 \pm 1.9	24.3 \pm 1.9	20.7 \pm 0.7
LD₅₀ 2h	7	31.6 \pm 1.0	29.4 \pm 2.3	18.8 \pm 1.4	28.5 \pm 2.6
LD₅₀ 6h	7	34.6 \pm 3.0	28.3 \pm 3.2	24.5 \pm 2.5	21.6 \pm 2.7
LD₅₀ 24h	6	32.8 \pm 2.5	25.6 \pm 4.1	21.6 \pm 3.2	26.5 \pm 2.3
LD₁₀	8	33.0 \pm 1.2	25.2 \pm 2.6	25.0 \pm 2.9	27.4 \pm 3.1

4.6 . Uticaj ingestije Al na ekspresiju amiloida

Tehnikom *Western* blota određivana je ekspesije ukupnog amiloda β u kortikalanim i hipokampalnim neuronima subakutno tretiranih životinja $AlCl_3$ u dozi od LD_{10} . Rezultati su pokazali su da ne postoji statistički značajana razlika u poredjenju sa kontrolama.

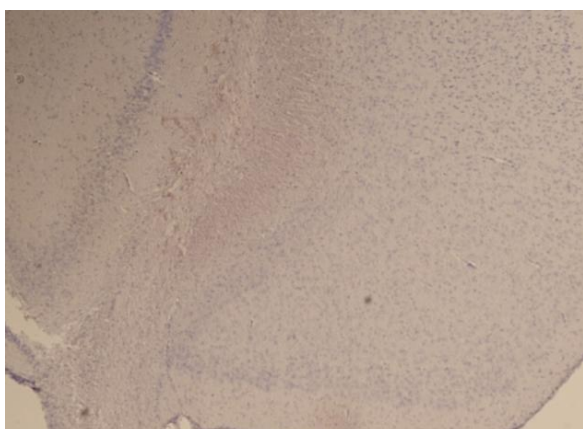


Grafik 7. Ekspresija amiloida u korteksu i hipokampusu u kontrolnoj grupi i u grupi eksperimentalnih životinja tretiranih sa $AlCl_3 \times 6H_2O$ u dozi od LD_{10} nakon subakutnog trovanja 21 dan. Prikazan je reprezentativni imunoblot i odgovarajući grafik dobijen analizom gela. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost $\pm SD$. * $p < 0,05$

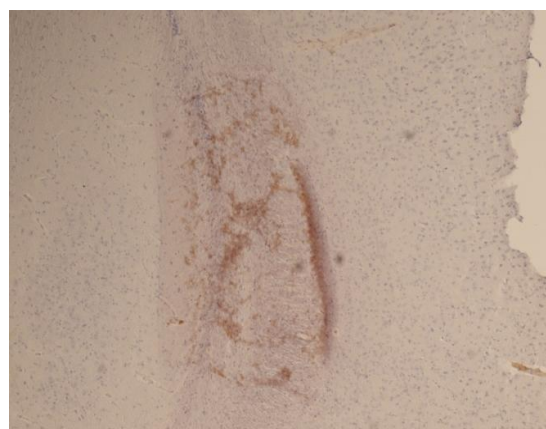
4.7. Uticaj ingestije Al na ekspresiju β amiloida u mozgu džerbila

4.7.1. Efekat subakutne primene Al na ekspresiju β amiloida u korteksu džerbila

Imunohistohemijski preparati korteksa džerbila prikazani su na slici 4. Na slici 4(a) je preparat korteksa džerbila kontrolne grupe tretirane natrijum hloridom (n=5), gde se ne primećuju agregati β amiloida. Na slici 4(b) je preparat korteksa džerbila tretiranih aluminijumom (n=5), gde se uočavaju agregati β amiloida.



(a) kontrola



(b) AlCl₃

Slika 4. Efekat subakutne primene Al₃ na ekspresiju β amiloida u korteksu džerbila

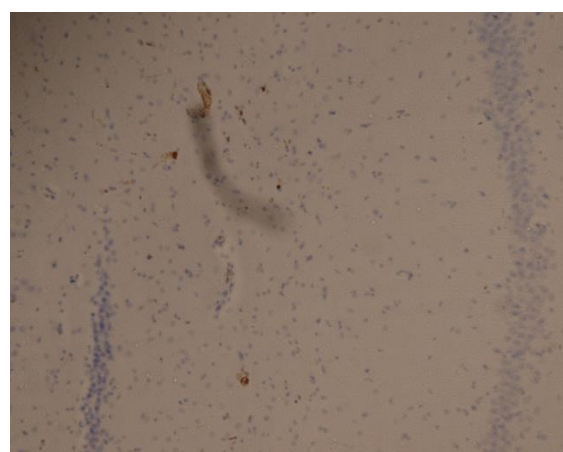
Imunohistohemijsko bojenje korteksa džerbila tretiranih (a) NaCl i (b) AlCl₃x6H₂O u dozi od LD₁₀ nakon subakutnog trovanja 21 dan. Korišćeno anti- β amiloid antitelo (zečje, poliklonalno anti- β amiloid antitelo, *Abcam, UK*)

4.7.2. Efekat subakutne primene Al na ekspresiju β amiloida u hipokampusu džerbila

Imunohistohemijski preparati hipokampusa džerbila prikazani su na slici 5. Na slici 5(a) je preparat hipokampusa džerbila kontrolne grupe tretirane natrijum hloridom ($n=5$), gde se ne primećuju agregati β amiloida. Na slici 5(b) je preparat tkiva korteksa džerbila tretiranih aluminijumom ($n=5$) na kome se uočava prisustvo agregata β amiloida.



(a) kontrola



(b) $AlCl_3$

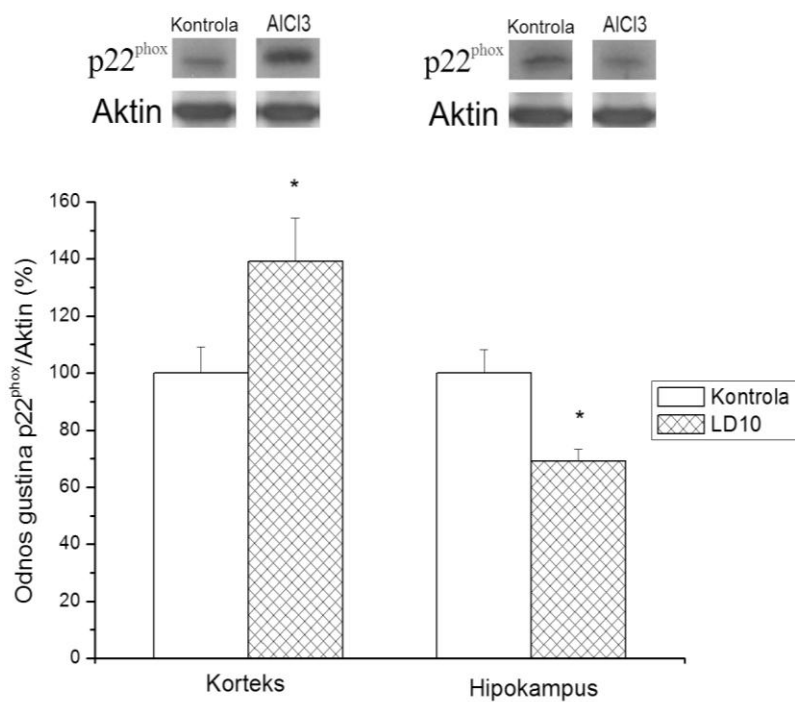
Slika 5. Efekat subakutne primene Al na ekspresiju β amiloida u hipokampusu džerbila

Imunohistohemijsko bojenje hipokampusa džerbila tretiranih (a) NaCl i (b) $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ u dozi od LD_{10} nakon subakutnog trovanja 21 dan. Korišćeno anti- β amiloid antitelo (zečje, poliklonalno anti- β amiloid antitelo, *Abcam, UK*)

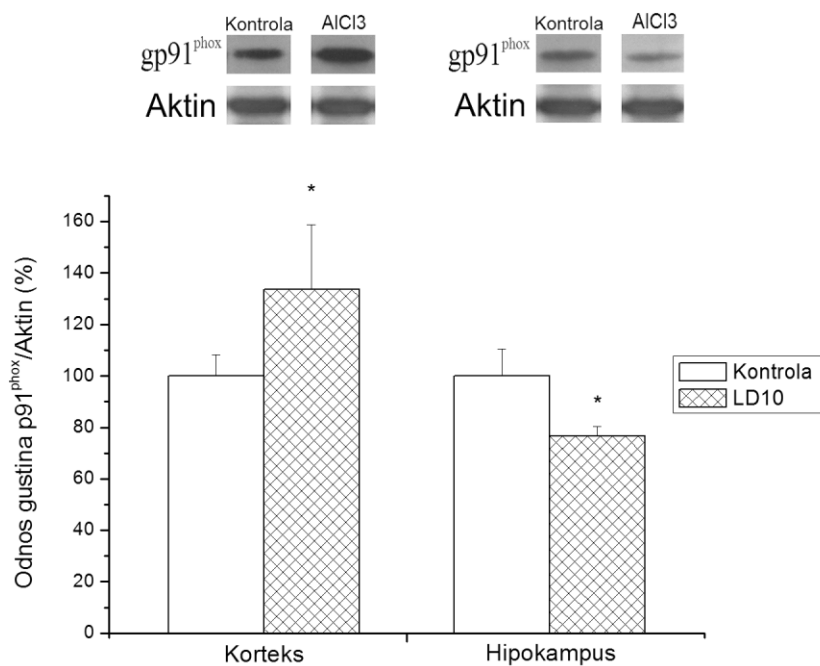
4.8. Uticaj ingestije Al na ekspresiju enzima NADPH oksidaze

(subjedinice: p22^{phox}, p91^{phox}, p47^{phox} i p67^{phox})

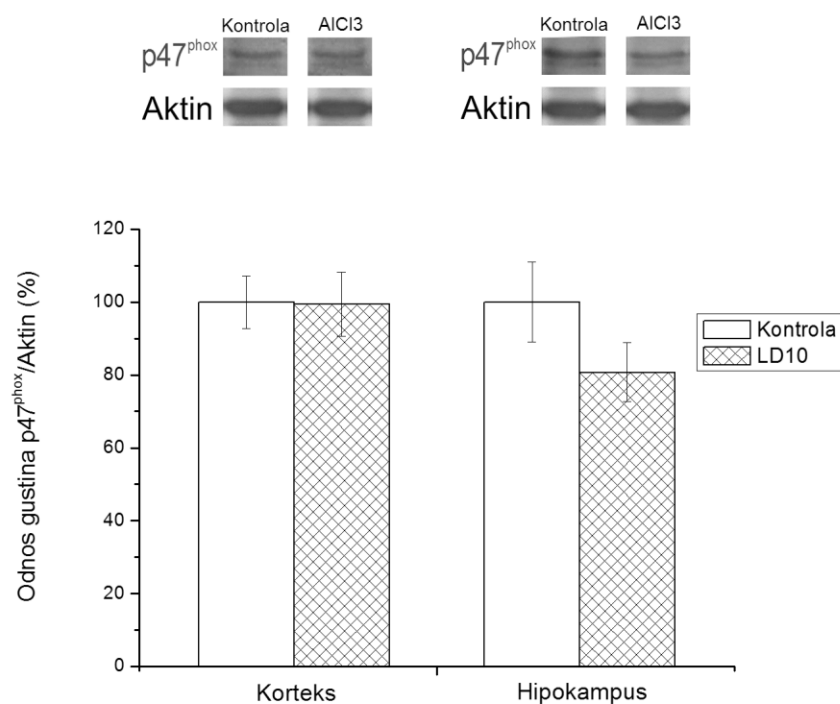
Tehnikom *Western blot-a* određivana je ekspresija pojedinih subjedinica NADPH oksidaze nakon subakutnog tretmana eksperimentalnih životinja AlCl₃ u dozi od LD₁₀, tokom 21 dan. Rezultati pokazuju na subjedinične i strukturalne specifičnosti. Nakon subakutnog tretmana sa Al, u kortikalnim strukturama uočava se statistički značajno povećanja ekspresije membranskih subjedinica NOX₂ odnosno, p22^{phox} i gp91^{phox} subjedinice (Grafik 8 i 9). U hipokampalnim strukturama ekspresija ovih subjedinica je snižena, što ukazuje na izvesnu strukturalnu specifičnost. Ekspresija citosolnih subjedinica, p67^{phox} i p47^{phox}, u hipokampusu je snižena u poredjenju sa kontrolnom grupom (Grafik 10 i 11). U korteksu se beleži statistički značajna povišena ekspresija za p67^{phox}.



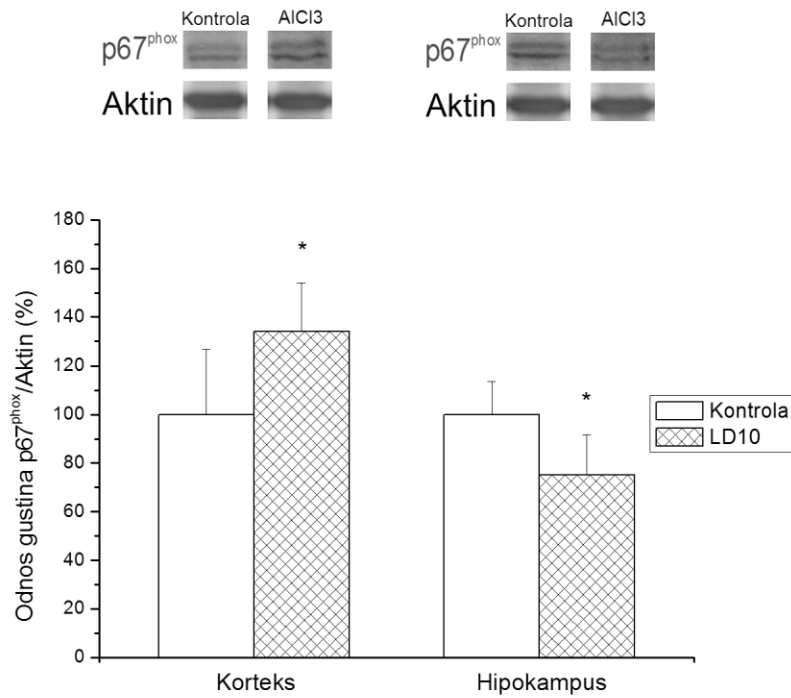
Grafik 8. Ekspresija NOX subjedinice p22^{phox} u korteksu i hipokampusu u kontrolnoj grupi i u grupi eksperimentalnih životinja tretiranih sa AlCl₃×6H₂O u dozi od LD₁₀ nakon subakutnog trovanja 21 dan. Prikazan je reprezentativni imunoblot i odgovarajući grafik dobijen analizom gela. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ±SD. *p<0,05



Grafik 9. Ekspresija NOX subjedinice p91^{phox} u korteksu i hipokampusu u kontrolnoj grupi i u grupi eksperimentalnih životinja tretiranih sa AlCl₃·6H₂O u dozi od LD₁₀ nakon subakutnog trovanja 21 dan. Prikazan je reprezentativni imunoblot i odgovarajući grafik dobijen analizom gela. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ±SD. *p<0,05



Grafik 10. Ekspresija NOX subjedinice p47^{phox} u korteksu i hipokampusu u kontrolnoj grupi i u grupi eksperimentalnih životinja tretiranih sa AlCl₃·6H₂O u dozi od LD₁₀ nakon subakutnog trovanja 21 dan. Prikazan je reprezentativni imunoblot i odgovarajući grafik dobijen analizom gela. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ±SD. *p<0,05

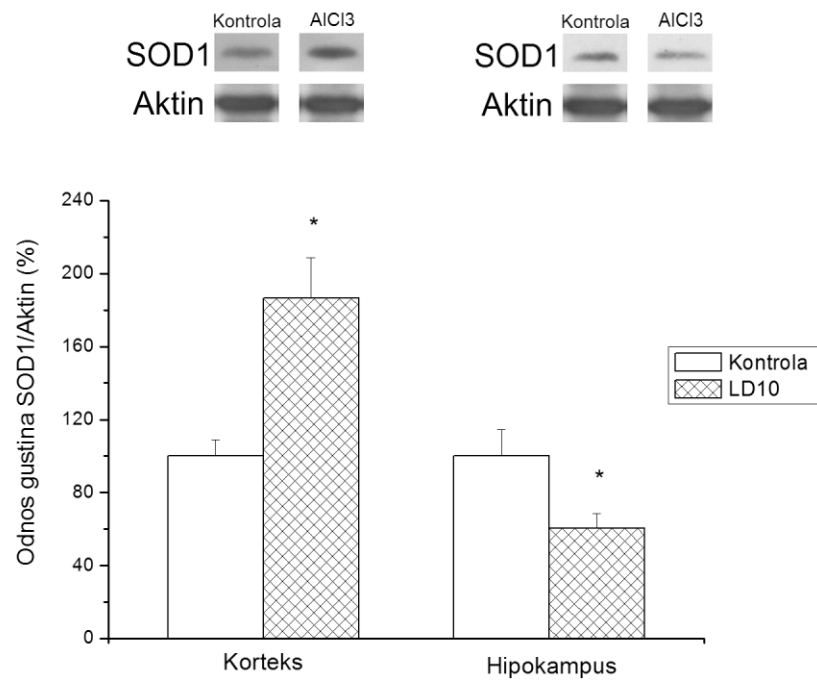


Grafik 11. Ekspresija NOX subjedinice p67^{phox} u korteksu i hipokampusu u kontrolnoj grupi i u grupi eksperimentalnih životinja tretiranih sa AlCl₃·6H₂O u dozi od LD₁₀ nakon subakutnog trovanja 21 dan. Prikazan je reprezentativni imunoblot i odgovarajući grafik dobijen analizom gela. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ±SD. *p<0,05

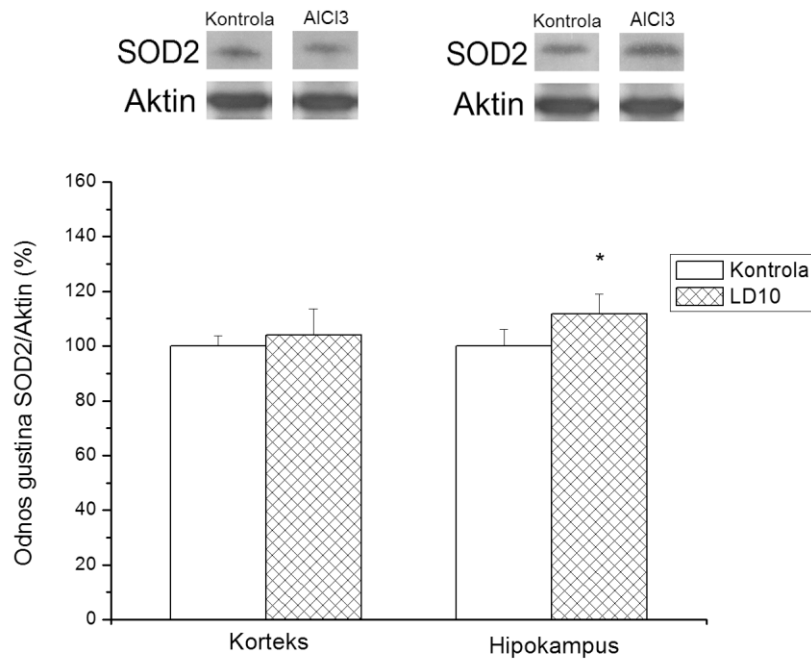
4.9. Uticaj ingestije Al na ekspresiju enzima SOD₁ i SOD₂

Tehnikom *Western blot-a* određivana je ekspresija enzima SOD₁ i SOD₂ nakon subakutnog tretmana eksperimentalnih životinja AlCl₃ u dozi od LD₁₀, tokom 21 dan. Rezultati ukazuju na prisustvo izoenzim i strukturno specifičnih promena. Citosolna SOD₁ manifestuje statistički značajno povišenu ekspresiju u kortikalnim strukturama u poredjenju sa kontrolnim vrednostima. U hipokampusu ekspresija SOD₁ je snižena u poredjenju sa kontrolnim vrednostima (Grafik 12).

Nasuprot tome, mitohondrijalna SOD₂ u korteksu ne pokazuje značajno povišenu ekspresiju u odnosu na kontrolne životinje, dok se u hipokampalnoj strukturi uočava statistički značajna povećanje ekspresije (Grafik 13).



Grafik 12. Ekspresija enzima SOD₁ u korteksu i hipokampusu u kontrolnoj grupi i u grupi eksperimentalnih životinja tretiranih sa AlCl₃·6H₂O u dozi od LD₁₀ nakon subakutnog trovanja 21 dan. Prikazan je reprezentativni imunoblot i odgovarajući grafik dobijen analizom gela. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ±SD. *p<0,05



Grafik 13. Ekspresija enzima SOD₂ u korteksu i hipokampusu u kontrolnoj grupi i u grupi eksperimentalnih životinja tretiranih sa AlCl₃·6H₂O u dozi od LD₁₀ nakon subakutnog trovanja 21 dan. Prikazan je reprezentativni imunoblot i odgovarajući grafik dobijen analizom gela. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ±SD. *p<0,05

5. DISKUSIJA

Alchajmerova bolest je progresivno neurodegenerativno oboljenje i ujedno, najčešći uzročnik demencija u humanoj populaciji. Kliničke karakteristike, koje determinišu ovu bolest, jesu kompromitacija pamćenja, kognitivna i bihevioralna deterioracija koji dovode do poteškoća u kvalitetu života obolelih i diskonforta njihovih porodica. Osnovna varijabla u determinaciji AB je starenje populacije, stoga se procenjuje, da će 2050. godine, broj obolelih biti četvorostručen (Brookmeyer i sar., 2007).

Senilni plakovi i neurofibrilarna klubad (NFT) su predominantne morfološke karakteristike AB. Kao najvulnerabilnije moždane strukture obolelih od AB označeni su entorinalni korteks i neokorteks, hipokampus, *basal forebrain*, amigdala (Alud i sar., 2002). Poznato je da postoji izvestan hijerarhijski obrazac akumulacije NFT u vulnerabilnim neuronima. Najpre se ove promene zapažaju u medijalnom temporalnom lobusu, preciznije II sloju hipokamusa i entorinalnom korteksu, a potom se šire na limbički sistem i asocijativna područja temporalnog, parijatelnog i frontalnog korteksa (Frost i sar., 2009). Savremena shvatanja patofizioloških promena u AB sugerišu da postoji povezanost između A β koji može uticati na formiranje tau proteina i *vice versa*, tau može posredovati u toksičnosti A β (Duan i sar., 2012). Ovu pretpostavku potkrepljuje i studija koje je prezentovala sinergističko dejstvo A β i tau proteina na disbalans mitohondrijalnog metabolizma na modelu Alchajmerove bolesti sa tripl-transgenim miševima (Rhein i sar., 2009).

Neuropatološke karakteristike AB uključuju niz patognomoničnih događaja u CNS kao što su: kortikalna i subkortikalna atrofija, formiranje intraneuroalnih fibrilarnih klubadi, depozicija amiloid beta peptida i neuronskih plakova, gubitak sinaptičke transmisije, oksidativni stres i apoptozu, koji dovode do smrti ćelije (Gupta et al., 2005; Hirata-Fukae et al., 2008). Ove promene mahom su opisane u kortikalnim i hipokampalnim regionima obolelih od AB. Takođe je ustanovljeno, na osnovu brojnih epidemioloških istraživanja, da je upravo centralni nervni sistem ciljni organ za neurotoksične efekte aluminijuma za koji se predpostavlja da može igrati važnu ulogu u patogenezi AB (Kawahara, 2005; Shcherbatykh i Carpenter, 2007).

U saglasnosti sa podacima iz literature je koncipirano naše istraživanje u kom su ciljane morfološke strukture CNS-a, bile upravo korteks, hipokampus, talamus i *nc. caudatus*. U ovim strukturama je praćena promena enzimske aktivnosti i ekspresija amiloida i pojedinih enzima, nakon peroralne administracije Al, na modelu mongolskog džerbila.

Brojna, do sada sprovedena istraživanja, nedvosmisleno su potvrdila da su jedinjenja aluminijuma neurotoksićna i da mogu indukovati neurodegenartivne promene u eksperimentalnim uslovima, iako je sam patofiziološki mehanizam ostao do kraja nerasvetljen (Griffioen i sar., 2004; Bharathi i sar., 2008). Dokazano je da Al ima sposobnost da promoviše formiranje i akumulaciju β amiloida i hiperfosforilaciju tau proteina (Yumoto i sar., 2009). Nadalje, pokazano je da Al ima destabilišuću ulogu na ćelijsku membranu uključujući enzimske sisteme sa kojima ulazi u inerakciju i fosfolipidne proteine sa kojima reaguje, menjajući na taj naćin fluidnost ćelijskog omotaća (Jovanović i sar., 2006).

U prethodnim istraživanjima uloga Al ispitivana je sa razlićitih aspekata i proućavana je kauzalna povezanost sa Alchajmerovom bolešću. Hronićna aplikacija Al izaziva akumulaciju $A\beta$ proteina u kulturi kortikalnih neurona pacova (Kawahara i sar., 2001) i u ćelijima neuroblastoma (Campbell i sar., 2000). Dokazano je da Al facilitira $A\beta$ fluks kroz krvno-moždanu barijeru (Yokel i Florence, 2006), pospešuje precipitaciju β -polimera (Exley, 2006), indukuje granulovakuolarnu degeneraciju (Walton, 2007) i formiranje i rast neurofibrilarne klubadi (Walton, 2010). Takodje je dokazana uloga Al u regulaciji genske ekspresije amiloid β prekursorskog proteina. (A β PP) (Walton i Wang, 2009) i alteraciji hidrofobne ekspozicije koja dovodi do destabilizacije inicijalne $A\beta$ konformacije (Chen et al., 2011). Ova istraživanja sugerišu direktnu toksićnost Al u pojedinim intracelularnim događanjima (Kaneko i sar., 2007).

Uloga enzima AChE je da katalizuje degradaciju acetil-holina (ACh) i sama po sebi predstavlja pogodan marker za ispitivanje funkcionisanja holinergičkog sistema u istraživanjima (Zatta et al., 2002). Holinesteraze čine familiju enzimskih proteina koje su široko rasprostranjene u neuralnim završecima, ali i van njih, u drugim tkivima. Već je napomenuto da je *in vivo* i epidemiološkim studijama dokazana izvesna povezanost između akumulacije aluminijuma u mozgu i Alchajmerove bolesti. U razvoju patološkog supstrata, u okviru ove demencije, pretpostavljeno je da Al utiče na različite biohemijske procese uključujući metabolizam acetilholina. Rezultati Zatta i sar. (2002) na modelu miševa *in vivo*, su pokazali da se nakon *per os* tretmana aluminijum laktatom i aluminijum hloridom tokom tri meseca, registruje povišena aktivnost AChE u moždanom homogenatu tretiranih životinja. Sličan efekat primećen je pri ispitivanju *in vitro*, kada su aluminijova jedinjenja dodavana direktno u moždane homogenate eksperimentalnih životinja (Zatta i sar., 2002).

Studija bazirana na pozitronskoj emisionoj tomografiji (PET Scan) kortiklane AChE aktivnosti, pokazala je *in vivo* redukciju enzimske aktivnosti u manifestnoj formi AB kao i u nekoliko slučajeva umerenog kognitivnog poremećaja (Herholz, 2008). U našim prethodnim istraživanjima značajna redukcija AChE zabeležena je u moždanim strukturama džerbila tretiranih gavažom sa $AlCl_3$ (LD_{50}) u periodu praćenja od 24 do 96 časova nakon akutnog trovanja (Mičić and Petronijević, 2000).

U ovom istraživanju pokazali smo i nastanak brzih promena u aktivnosti AChE već dva časa nakon administracije Al. Opservirane promene perzistirale su tokom čitavog perioda praćenja nezavisno od administrirane doze Al. Dokazani porast aktivnosti AChE bio je prisutan nakon subakutnog izlaganja laboratorijskih životinja Al u svim ispitivanim moždanim strukturama. U aktuelnom istraživanju, naši rezultati ukazuju da je u periodu od 24 h časa po administraciji Al, aktivnost enzima AChE u ispitivanim strukturama globalno snižena u komparaciji sa kontrolnom grupom i tokom celokupnog perioda praćenja promena enzimska aktivnost nije zavisila od administrirane doze Al.

U saglasju sa našim rezultatima su i rezultati istraživanja u kome je dokazan signifikantan pad AChE aktivnosti u korteksu i strijatumu Wistar pacova nakon intrahipokampalnog tretmana AlCl_3 (Stevanović et al., 2009). Na dalje, slični rezultati dobijeni su u studiji Kajzera i saradnika (2008) kojom je dokazan značajan pad aktivnosti AChE nakon dugotrajne ekspozicije miševa tretiranih gavažom AlCl_3 u dozi od 50mg/kg, u homogenatu cerebeluma, hipokampusa i cerebralnog korteksa. Nedavna istraživanja o protektivnoj ulozi zelenog čaja, na neurotoksične promene izazvane injektiranjem AlCl_3 u hipokampalni CA_1 region pacova, pokazale su da se aktivnost AChE signifikntno menja. Nakon prvobitnog pada aktivnosti enzima, tretman eksperimentalnih životinja ekstraktom zelenog čaja dovodi do oporavljanja aktivnosti AChE kao i poboljšanja u biheviorlnom smislu pri vršenju određenih zadataka (Jelenković i sar., 2014).

Skorašnja istraživanja aplikacije Al u hipokampalni region CA_1 pacova dokazala su kognitivnu disfunkciju u eksperimentalnih životinja, koja je bila praćena značajnim padom aktivnosti enzima AChE i glukoza-6 fosfat dehidrogenaze (G6PDH), u regionima frontobazilarnog korteksa, hipokampusa i *bazal forbrain*-a obostrano (Jovanović i sar. 2014).

Dosadašnja istraživanja potkrepila su pretpostavke, da se promene u AChE aktivnosti vidjene nakon ekspozicije Al, posledica moguće alosteričke interakcije između katjona i perifernog anjonskog mesta enzima (Gulya i sar., 1990) ili su vezane za izvesne modifikacije lipidne membrane (Kaizer i sar., 2005).

Uloga SOD u patogenezi AB očigledno je predmet dugih kontraverzi u naučnim istraživanjima. Neke ranije studije su pokazale pad aktivnosti SOD u pacijenta obolelih od Alchajmerove bolesti (Richardson, 1993), dok su druge pokazale umereni porast aktivnosti u *nc. caudatus*-u AB pacijenta (Marklund i sar., 1985).

Superoksid dizmutaza (SOD) je familija metaloenzima koji aktivno učestvuje u eliminaciji superoksid anjona. Determinisane su tri različite forme SOD u zavisnosti od vezujućeg metalnog kofaktora: (1) Cu,Zn-SOD, (2) Fe,Mn-SOD i (3) Ni-SOD. Cu,Zn-

SOD, je mahom citoplazmatski enzim, ali se u malim količinama može naći i u ćelijskoj membrani, jedru i intermembranskom prostoru mitohondrija i ekstracelularnom prostoru. Prisutna je u u svih eukariota i u svim humanim tkivima, a posebno visoku aktivnost pokazuje u mozgu, nadbubrežnim žlezdama, jetri, srcu i bubrezima. Katalitička aktivnost enzima vezana je za bakar, dok cink stabilizuje prostornu konfiguraciju enzima. Enzim je dimer, osetljiv je na delovanje cijanida, a mehanizam inaktivacije je zasnovan na vezivanju i odstranjenju bakra iz aktivnog centra. U humanom organizmu ali i u sisara označava se i kao SOD₁ i kao takva lokalizovana je isključivo u citoplazmi. Kao SOD₃ obeležava se ekstracelularna forma ovog enzima. Ekstracelularna SOD₃ je prisutna u međućelijskom prostoru i ekstracelularnoj tečnosti. To je sekretorni enzim, tetramer čiji aktivni centar čine joni bakra. Po strukturi je glikoprotein.

Mn zavisna SOD je lokalizovana je isključivo u matriksu mitohondrija. Prisutna je u mnogim ćelijama čovečijeg organizma. Čini skoro 60% ukupne ćelijske SOD, što je uzrokovano dvostuko većom koncentracijom $\cdot\text{O}_2^-$ u mitohondrijama u odnosu na citoplazmu. Ova jedinstvena subcelularna distribucija SOD obezbedjuje adekvatnu zaštitu od $\cdot\text{O}_2^-$ pod fiziološkim uslovima. Obeležava se i kao SOD₂. Ni-SOD je prokariotski enzim.

Superoksid dizmutaza konvertuje $\cdot\text{O}_2^-$ (u prisustvu supstrata koji obezbedjuju proton) u H₂O₂. Veruje se da su hidrosilni radikali jedni od pokretača oksidativnog oštećenja. Sa druge strane, superoksidni radikali su takodje biološki toksični produkti. Stoga se enzim SOD, sa opravdanim razlogom, smatra jednim od najpotentnijih antioksidantnih sistema i pogodnim markerom u ispitivanju promena koje prate oksidativni stres.

Ranija istraživanja su potvrdila povšene vrednosti aktivnosti SOD u pacijenta koji boluju u demencije (de Lustig i sar., 1993). Rezultati naših prethodnih istraživanja (Mičić i sar., 2003) su pokazali signifikantni bifazni porast aktivnosti SOD u moždanim strukturama mongolskih džerbila 24 i 96 časova nakon LD₅₀ administracije soli aluminijum hlorida. U

ovom istraživanju, dva časa nakon akutne ingestije Al, registruju se najpre diskretne promne u aktivnosti SOD i to samo u *nc. caudatus*-u. U narednom periodu u dozi od LD₂₅, enzimaska SOD aktivnost pokazuje signifikantan porast u odnosu na kontrole, koji je osobito izražen 24 h po ingestiji. Porast aktivnosti SOD verifikovan je u svim ispitivanim moždanim strukturama i po subakutnom trovanju aluminijumom.

Naši rezultati koreliraju sa istraživanjem Resendea i sar. (2008) koji su u svoj studiji objavili značajan porast aktivnosti SOD i glutathion peroksidaze (GPx) kao i vrednosti lipidnih peroksida u mozgu trostruko-transgenih miševa korišćenih kao model za AB. U svom radu autori su opisali proces alteracije tokom A β oligomerizacijskog perioda, koja prethodi pojavi A β plakova i neurofibrilarnih klubadi (Resende i sar., 2008). Nadalje, autori Ansari i Scheff (2010) publikovali su istraživanje u kom su dokazali korelaciju izmedju postignuća na kognitivnom testu Mini Mental Status (MMS) i značajnog pada antioksidanasa, poput enzima ukupne SOD u humanom materijalu. Istraživanje je obuhvatilo pacijente sa umerenom ili razvijenom formom AB koji su skorovani MMS dok je biohemijsko istraživanje obuhvatilo određivanje nivoa enzima u *postmortem* u prefrontalnom korteksu. Pretpostavlja se da bi porast aktivnosti SOD mogao biti rani pokazatelj AB nakon čega sledi konsektivni pad u aktivnosti enzima kako proces demencije napreduje ka razvijenijoj formi.

Rezultati nedavno objavljene studije o uticaju ekstrakta zelenog čaja kao protektora CNS ukazuju da se kinetika SOD u cerebelumu, korteksu i bazalnim ganglijama pacova prethodno tretiranih AlCl₃ znatno oporavlja nakon prvobitne deplecije enzimaska aktivnosti (Jelenković i sar., 2014). Ovi rezultati sugerišu ranije pretpostavljen benefit u konzumiranju zelenog čaja na mogući razvoj Alchajmerove bolesti. Dokazano je da gen s2070424 koji determiniše SOD₁ i njegov polimorfizam pretstavlja riziko faktor u pojedinim populacijama stanovništva za nastanak AB (Spisak i sar., 2014).

Rezultati našeg istraživanja potvrdili su da se već nakon 2 časa po akutnom trovanju Al, uočavaju prominenetne i statistički značajne promene aktivnosti enzima u poredjenju sa kontrolnom grupom, a nakon 6 časova SOD prisutan je signifikantni porast u svim moždanim strukturama životinja tretiranih LD₂₅ u poredjenju sa kontrolnom grupom životinja. Porast produkcije anjona O₂⁻ korespondira sa promenama vezanim za aktivnost ukupne SOD.

U ovom radu proučavanje ekspresije aktivnosti enzima SOD₁ i SOD₂ nakon subakutnog tretmana pokazuju na izoenzim specifične i strukturalne osobenosti. Citosolna SOD₁ pokazuje statistički značajno povišenu ekspresiju u kortikalnim strukturama u poredjenju sa kontroloma. Nasuprot tome, mitohondrijalna SOD₂ u korteksu ne pokazuje značajno povišenu enzimsku aktivnost u odnosu na kontrolne životinje, dok se u hipokampusu ekspresija enzima uočava u statistički značajnom porsatu.

Izvesne studije su prezentovale specifičnosti u značaju Mn-SOD u AB. Istraživanja vršena na transgenom AB modelu miševa ukršetnih sa SOD₂^{+/-} rezultirala su iniciranjem bihejvioralnog deficita ili senilnih plakova u eksperimentalnih životinja (Esposito i sar., 2006; Li i sar., 2004). Istraživanja Murakamija i Takahikoa (2012) prezentovala su uticaj SOD₁ u progresiji AB. Superoksidni radikali u citoplazmi indukuju oligomerizaciju Aβ i rani kognitivni deficit u transgenih miševa Tg₂₅₇₆. Ova istraživanja su u saglasju sa našim aktuelnim rezultatima koji pokazuju porast SOD₁ ekspresije u kortikalnim strukturama džerbila tretiranih tokom subakutnog trovanja 21 dan. Naša istraživanja nisu u kontradikciji ni sa implikacijama da se oksidativni stres moguće javlja primarno u citoplazmi pre no što mitohondrije budu zahvaćene (Marlatt i sar., 2004).

Neke studije su implicirale prisustvo oksidativnog stresa u etipatologiji Alchajmerove bolesti kao primarni sled događanja nakon kojih dolazi do pojave amiloidnih plakova (Pratico i sar., 2001; Pratico i sar., 2002).

Enzim katalaza ima ulogu katalizatora u reakciji razlaganja H_2O_2 na vodu i kiseonik. Katalaza se smatra jednim najoperativnijih enzimskih sistema u ljudskom organizmu jer jedan molekul ovog enzima može da konvertuje milione molekula hidrogen peroksida u sekundi. Ova velika efikasnost je izuzetno značajna za detoksikaciju H_2O_2 i sprečavanje stvaranja mehurića ugljen-dioksida u krvi. Aktivnost antioksidativnog enzima katalaze pokazuje specifičan obrazac promena u ispitivanim moždanim strukturama.

Naši rezultati na osnovu ovog istraživanja ukazuju na rani porast enzimske aktivnosti CAT (2 časa nakon administracije Al) zabeležen u korteksu i hipokampusu, dok je u istom vremenskom intervalu, opisan pad aktivnosti u talamusu i *nc. caudatus*-u. Uz izvesne oscilacije, obrazac aktivnosti CAT i prateće promene zabeležene su tokom čitavog perioda istraživanja. Ipak, u slučaju subakutnog tretiranja Al katalazna aktivnost pada u odnosu na kontrole, u svim ispitivanim moždanim strukturama izuzev u hipokampusu gde nisu zabeležene promene.

Suštinski gledano, bazična uloga katalaze je da limitira toksični efekat hidrogen peroksida (H_2O_2) razlažući ga do produkata vode i kiseonika u svim aerobnim ćelijama (Mates, 2000). Kako su pokazali naši rezultati, SOD aktivnost raste nakon Al ingestije, a primetno je odsustvo promena ili pad CAT aktivnosti, stoga je očekivano nedovoljno uklanjanje H_2O_2 . Uticaj Al na aktivnost CAT može se objasniti konformacijskim promenama na molekulu enzima CAT stvaranjem formacije CAT- Al^{3+} kompleks (Di i sar., 2006).

Promene svih enzimskih parametara u našoj studiji primetne su u svim ispitivanim strukturama. Mi se nismo bavili determinisanjem koncentracije aluminijuma u ispitivanim tkivima, ali je poznato da se Al mahom u moždanom tkivu prenosi putem transferinskog kompleksa (Roskamas i Connor, 1990). Istraživanja distribucije aluminijuma u različitim regionima mozga muških albino pacova tretiranih subakutno i hronično pokazuju da se ovaj metal raspoređuje u svim regionima mozga sa maksimumom koncentracije u hipokampalnim područjima (Julka and Gill, 1996). Ovi autori su u svojoj studiji pokazali

da postoji gotovo 24 puta veća akumulacija Al u hipokampusu nakon hronične ekspozicije i oko 80 puta veća nakon subakutne ekspozicije u komparaciji sa kontrolama. Strukturna specifičnost i alteracija nekih antioksidativnih enzima je nadjena u mozgu mladunaca pacova tretiranih 14 dana $AlCl_3$ u dozi od LD_{50} u hipokampusu, diencefalonu i cerebelumu. U navednim strukturama opisana je statistički značajan porast vrednosti aluminijuma i lipidnih peroksida u poredjenu sa kontrolama (Yuan i sar., 2012). U narednim istraživanjima bilo bi zanimljivo dati pojašnjenje šta je uzrok ovakve enzimske raznolikosti i strukturne specifičnosti.

Ovo istraživanje registrovalo je porast nivoa lipidnih peroksida ubrzo, već dva časa nakon akutne ingestije Al (u obe ispitivane doze LD_{25} i LD_{50}) kao rani signal nastalog oksidativnog stresa u ispitivanim moždanim strukturama. U tom vremenskom periodu zabeležena je signifikantno izmenjena i strukturalno specifična aktivnost CAT dok su vrednosti SOD aktivnosti nepromenjen. Potencirana lipidna peroksidacija opisana je u moždanom tkivu i telesnim tečnostima obolelih od AB (Butterfield i sar., 2002; Bassett i Montine, 2003; Keller i sar., 2005) dok su pojedine studije prezentovale stimulaciju lipidne peroksidacije dejstvom Al *in vitro* (Gutteridge i sar., 1985; Ohnishi et al., 1998; Verstraeten i sar., 2008).

Moždano tkivo je veoma osetljivo na poremećaj oksidacije svakako zato i što na njega otpada oko 20% ukupne oksigenacije organizma, kao i činjenice da su ćelijske membrane neurona sastavljene od polusaharizovanih masnih kiselina, zbog prisustva visokog sadržaja gvoždja i niske antioksidativne enzimske aktivnosti (Youdim, 1988). Nasuprot tome, aluminijum je mineral relativno niskog redox potencijala ali može indukovati oksidativno oštećenje putem različitih mehanizama. Moguće je njegovo vezivanje za negativno naelektrisane fosfolipide u ćelijskim membranama neurona i na taj način lako nastaje produkcija slobodnih radikala (O_2^- , H_2O_2 , OH^\cdot i OH^-) (Verstraeten i sar., 1997). Aluminijum takodje, može ući u interakciju sa gvoždjem u stimulisanoj lipidnoj peroksidaciji u Fenton reakciju, koja izaziva produkciju slobodnih radikala i nastanak Fe^{3+}

formacije. Superoksid ($O_2^{\cdot -}$) se neutrališe sa Al^{3+} u formu $Al-O_2^{\cdot -}$ kompleksa, koji podiže oksidativni kapacitet $O_2^{\cdot -}$ (Exley, 2004).

Lipidna peroksidacija je jedan od centralnih događaja u oksidativnom stresu i može se verifikovati različitim esejima uključujući kvantifikaciju peroksida i njegovih produkata. Malondialdehid (MDA) je jedan od krajnjih produkata lipidne peroksidacije i stoga pogodan parametar za praćenja stepena oštećenja. Brojne studije su pokazale porast lipidne peroksidacije u mozgu pacijenta obolelih od AB u komparaciji sa kontrolama. Casado i sar. (2008) su prezentovali rezultate u kojima potvrđuju statistički značajnu razliku u vrednosti nivoa MDA u pacijenta sa Alchajmerovom demencijom i vakuolarnom demencijom u poredjenju sa kontrolama. Slična zapažanja nalazimo i u studiji koja potvrđuje porast nivoa MDA sa starenjem u španskoj populaciji (Gil i sar., 2002), dok je u studiji Zafrilla i sar., (2006) predočeno da je stepen lipidne peroksidacije u korelaciji sa stepenom progresije AB u pacijenta u komparaciji sa kontrolnom grupom.

Stoga, je i u našem istraživanju, obim lipidne peroksidacije nakon trovanja Al, praćen merenjem nivoa MDA, dok je obim proteinske oksidacije meren vrednostima SH grupa. Rezultati su pokazali signifikantan porast MDA, u svim moždanim strukturama nakon akutne ingestije Al u obe ispitivane doze već u prvih dva časa po ingestiji. Vrednosti na dalje rastu nakon tokom narednih 24h i prisutne su u svim ispitivanim moždanim strukturama, sttistički značajno više u poredjenju sa kontrolama. Rezultati su pokazali da postoji signifikantan porast vrednosti MDA nakon subakutnog trovanja u svim tretiranim moždanim strukturama. Na osnovu dobijenih rezultata može se pretpostaviti da se lipidna peroksidacija javlja kao rani pokazatelj akutnog trovanja Al i perzistira tokom subakutnog tretmana.

Obim oksidacije proteina praćen kroz vrednosti SH grupa pokazuje značajan pad u poredjenju sa kontrolama nakon akutnog tretmana džerbila Al u obe ispitivane doze. Isti trend opadajuće aktivnosti zapažen je i nakon subakutnog trovanja u narednih 21 dan. Naši rezultati koreliraju sa istraživanjem na novozelendaskim zečevima koji su tretirani takodje

AlCl_3 i u kojih je zapažen pad aktivnosti SH grupa i glutation transferaze (GST) u krvi tokom 16 nedelja tretmana (Yousef, 2004).

Jedna od čestih postavki dosadašnjih istraživanja je hipoteza da je mitohondrijalna kompromitacija važan mehanizam u ranim fazama AB obzirom da je energetska deplecija karakteristična u mozgu obolelih od Alchajmerove demencije (Manczak i sar., 2004). Mitohondrijalni disbalans je jedan od pretpostavljenih mehanizama koji dovode do patofizioloških promena u ranim stadijumima AB.

Mitohondrijalna disfunkcija i osobito poremećaj aktivnosti COX, terminalnog enzima u elektronskom transportnom lancu mitohondrija, čini se da predstavlja vodeći generator u nastanku oksidativnog disbalansa. Enzim citohrom *c* oksidaza, odnosno Kompleks IV, je značajan transmembranski proteinski kompleks koji je poslednji enzimski sistem u respiratornom lancu inkorporiran u mitohondrijalnoj membrani ćelija. Njegova uloga je transport elektrona sa sva četiri citohrom *c* molekula i njihov prenos na molekul kiseonika pretvarajući ih u dva molekula vode.

Naši, nedavno objavljeni, rezultati ukazali su da oksidativni stres i promene u aktivnosti AChE nastaju vrlo brzo po akutnom izlaganju Al, a prate ih promene u COX aktivnosti koje se uočavaju nakon 6h (Vučetić i sar., 2013). U saglasnosti sa tim su i rezultati obuhvaćeni ovom studijom koja je potvrdila nastanak oksidativnog stresa u svim moždanim strukturama ubrzo nakon akutnog izlaganja Al. Uočeno je strukturno specifična aktivnost enzima COX prvih 2 h, što ukazuje da je enzimska aktivnost stabilna ubrzo nakon ingestije Al. Nadalje, promena enzimске aktivnosti se uočava u svim moždanim strukturama nakon aplikacije Al u dozi LD_{25} i isti trend povišene aktivnosti nastavlja se tokom prvog dana. Subakutno trovanje Al korelira sa padom u aktivnosti COX enzima u poredjenju sa kontrolama u svim ispitivanim moždanim strukturama. Ovi rezultati uklazuju na mogućnost da se enzimska aktivnost potencira nakon 6-24 h po akutnom tertiranju Al, ali se iscrpljuje nakon hronične ingestije Al toksina. Ovakvi rezultati ukazuju na mogući upliv drugog uzročnika nastanka slobodnih radikala u ispitivanim moždanim strukturama.

U saglasnosti sa našim rezultatima su i istraživanja koja su pokazala pad aktivnosti COX enzima u mozgu i trombocitima obolelih od AB (Cardoso i sar., 2004; Blass i sar., 2000). Eksperimentalne studije na modelu trostruko transgenih miševa za AB(3xTg-AB) su potvrdile sniženu ekspresiju COX u poredjenu sa kontrolama za uzrast od 9 meseci (Yao i sar., 2009). Prethodno objavljenja eksperimentalna istraživanja, na Wistar pacovima, su potvrdila pad COX aktivnosti po trodnevnom interhipokampalnom tretmanu $AlCl_3$ u ispitivanim moždanim strukturama: korteksu hipokampusu i *basal forbrain*-u (Stevnović i sar., 2013).

Aktuelna istraživanja potenciraju ulogu NADPH oxidase (NOX) u generisanju reaktivnih kiseoničnih radikala, tzv. slobodnih kiseoničnih radikala (eng. reactive oxygen species) (ROS) (Sorice i Krause, 2009). NOX-zavisna ROS produkcija otkrivena je mikrogliji, astrocitima i neuronima. ROS se generišu mahom u kaskadnoj reakciji koja započinje produkcijom superoksida. Reaktivni slobodni radikali nastaju u lančanoj reakciji imaju duži poluživot i veći potencijal za oštećenje ćelija. Kiseonični slobodni radikali sadrže kiseonik i imaju sposobnost da oduzmu elektron iz mnoštva organskih i neorganskih molekula i atoma. U kiseonične radikale spadaju: superoksidni anjon (O_2^-), perihidroksi radikal (HO_2^-), vodonik peroksid (H_2O_2), hidroksilni radikal (OH^\cdot), alkoksi radikal (RO^\cdot), peroksi radikal (ROO^\cdot), organski hidroperoksid ($ROOH$), singlet kiseonik i ekscitirani karbonil.

Ekspresija NOX enzima u regionima CNS je veoma složena i predmet je mnogobrojnih istraživanja. Dokazano je, na humanom i eksperimentalnom materijalu, da je NOX_2 prisutna u gotovo svim relevantnim strukturama mozga: u adultnom korteksu (Kim i sar., 2005; Infanger i sar., 2006; Ma i Zhou, 2006), *corpus calosumu* i kičmenoj moždini (Green i sar., 2001), hipokampusu (Park i Jin, 2008) moždanom stablu i cerebelumu (Tejada-Simon i sar., 2005), amigdalama, strijatumu i talamusu (Serrano i sar., 2003; Ma i Zhou, 2006), hipotalamusu i *Locus coeruleus* (Ye i sar., 2006). NOX_2 enzimski kompleks

lokalizovan je intracelularno i plazma membranski i katalizator je produkcije superoksida iz kiseoničnih radikala.

Uloga NOX-a u procesu razvoja CNS-a i pri normalnoj ekspresiji obuhvata niz događanja uključujući pre svega celularnu diferencijaciju, procese apoptoze, neuralnu signalizaciju, plastičnost moždanih struktura upliv u procese memorisanja i učenja (Quinn i Klann, 2005). Pri preteranoj ekspresiji, usled inflamacije ili povećanja aktivnosti, sa posledičnim porastom oksidativnog stresa, dolazi do disbalansa u produkciji superoksidnih radikala što je uočeno i u neurodegenerativnim oboljenjima poput Alchajmerove bolesti (Wilkinson i Landreth, 2006).

Poznato je da makrofagna fagocitna NOX₂ kompleks i sastoji se od dva tipa subjedinica. Membranske integralne subjedinice i citosolne subjedinice. Membranski proteini, p22^{phox} i gp91^{phox}, se vezuju za katalitičku subjedinicu kompleksa, heterodimerni flavoprotein poznat i kao citochrome b558. Citosolne komponente (p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} i Rac1) distribuirane su u citoplazmi. Dokazano je da se stimulacijom ove citosolne komponente aktivira signalni obrazac, koji inicira translokaciju membranskih subjedinica i formiranje aktivnog kompleksa (Bedard and Krause, 2007).

U AB senilni plakovi su okruženi aktiviranom mikrogljom koja reaguje proinflamatorno u odnosu na njih. Potvrdu hipoteze da je u AB prisutna pojačana aktivnost mikroglje potkrepljena je analizama mozga *postmortem*, koji jasno pokazuju udruženost izrazito aktivirane mikroglje i amiloidnih plakova i neurofibrilarne klubadi (Sasaki i sar., 1997). Zapravo, istraživanja su potkrepila ove postavke procenivši da je mikrogljalna aktivacija rani marker u razvoju AB, pre oštećenje neurofibrila, što mikrogljalne ćelije čini važnim učesnikom u razvoju demencije kojoj doprinose (Cagnin i sar., 2001).

Mikrogljalne ćelije su glavni nosioci imunog odgovora u centralnom nervnom sistemu i kao takve odgovorne su što u kontaktu sa ekstracelularnim β amilodom reaguju preko svojih odbrambenih svojstava uključujući i NADPH oksidazne enzime (Wilkinson i Landreth, 2006). NOX₂ kompleks je prepoznat kao glavni izvor ROS u AB (Qin et al.,

2006). Nedavna istraživanja Ansari i Scheff (2011) pokazala su značajan porast NOX aktivnosti u pacijenta sa umerenim kognitivnim deficitom i razvijenom Alchajmerovom bolešću. Prethodna istraživanja su pokazala značajnu fiziološku funkciju NADPH oxidaze u ćelija sisara u modulaciji multiplih redoks senzitivnih unutarćelijskih obrazaca putem kojih se mogu generisati ROS molekuli (Bedard i Krause, 2007).

NADPH oxidaza/ROS-posredovano ćelijsko signaliziranje može se opisati kao celularni “alarm sistem” čini ćeliju budnom i spremnom ili da se adaptira na stres ili da podleže apoptozi (Jiang i sar., 2011). Za pretpostaviti je da je porast NOX-udruženih redoks obrazaca može participirati u razvoju ranih promena nakon izlaganja Al.

Naši rezultati pokazuju da nakon subakutnog tretmana Al u kortikalnim strukturama dolazi do povećanja ekspresije membranskih subjedinica NOX₂ p22^{phox} i gp91^{phox}. U hipokampalnim strukturama ekspresija ovih enzima je snižena, što ukazuje na izvesnu strukturnu specifičnost. Ekspresija citosolnih subjedinica, p67^{phox} i p47^{phox}, u hipokampusu je snižena u poredjenu sa kontrolama. U korteksu se registruje povišena ekspresija p67^{phox}. Promene u ekspresiji NOX₂ subjedinica koje su zapažene posle subakutnog davanja Al odgovaraju promenama koje se zapažaju u obolelih od AB.

Studije objavljene do sada, sugerišu da NADPH oxidaza može biti esencijalni izvor za Aβ-indukovane slobodne radikale. Naime, *in vivo* studija Parka i sar. (2005) pokazala je dinamiku produkcije slobodnih radikala u neokorteksu eksperimentalnih životinja korišćenjem fluoromikrografije. Zapravo, nakon dodavanja fibrilarnog Aβ superfuzionom tehnikom kroz karnijalni prozor, dolazi do porasta slobodnih radikala. Ovaj efekat se potom anulira dodavanjem peptidnog inhibitora za gp91^{phox}.

Na osnovu iznetog može se pretpostaviti da je neurotoksičnost koja nastaje nakon aktivacije mikroglijalne NADPH oksidaze u Alchajmerovoj bolesti proizvod bar dva paralelna mehanizma. U jednom, mobilizacijom ekstracelularnih slobodnih radikala i direktnom toksičnošću dolazi do propadanja neurona, a u drugom, intracelularni slobodni kiseonični radikali pokreću produkciju proinflamatornih i toksičnih citokina (Block, 2008).

Za pretpostaviti je, na dalje, da antioksidantni enzimi nisu u stanju da tokom starenja, u potpunosti zaštite mitohondrije neuralnih ćelija od A β toksičnog učinka ali je sugerisano i da amiloid beta može sam inhibirati enzime mitohondrija (Wang i sar., 2007). Canevari i sar. (1999) dokazali su da A β_{25-35} fragment mogu selektivno inhibirati Komplex IV mitohondrijalnog lanca. Fokusiranje na enzime mitohondrijalnog lanca je u predjašnim istraživanjima pokazalo da aktivnost A β_{42} proteina u celini, kao i njegov fragment A β_{25-35} utiču na aktivnost Komplexa I i redukuju operativnost enzima citohrom *c* oksidaze (Casley i sar., 2002). Naša istraživanja na modelu Alchajmerove bolesti to i potvrđuju. Aktivnost COX pada pri akutnom trovanju pri dozama LD₅₀ nakon 24 h. U subakutnom trovanju aktivnost ovog enzima je signifikantno snižena poredjenju sa kontrolama što se može tumačiti u svetlu nastanka amiloidnih tvorevina.

Uprkos brojnim istraživanjima primarni uzrok Alchajmerov bolesti još uvek nije razjašnjen. Veruje se da nastanak i razvoj amiloidne hipoteze u Alchajmerovoj bolesti ima centralnu ulogu u razvoju ove vrste demencije (Hardy i Selkoe, 2002). Ovu hipotezu podupiru studije koje su dokazale da imunizacija protiv A β snižava nivo amiloidnih depozita i poboljšava kognitivni seting u APP - transgenih miševa (Janus i sar., 2000; Wilcock i sar., 2004). Hronična aplikacija aluminijuma izaziva akumulaciju A β P u kulturi neurona pacova (Kawaharai sar., 2001) ali i u neroblastičnim ćelijama (Campbell i sar., 2000).

Depozicija A β plakova, veruje se, može da provocira inflamatorni odgovor mikroglije i makrofaga u moždanom tkivu. Kao odgovor na formiranje plakova iz ovih ćelija dolazi do oslobadjanja proinflamatornih citokina i slobodnih kiseoničnih radikala (Kadowaki i sar., 2005). Sa druge strane, prisustvo A β dokazano je u celularnim strukturama (mitohondrije) pacijenata sa AB (Manczak i sar. 2006) i verovatno prethodi ekstracelularnom nagomilavanju A β depozita (Du i sar. 2010).

Dokazano je, okviru takozvane „amiloidne kaskade”, da usled alteracije u razgradnji amiloidnog procesorskog proteina (APP) i posledičnog nastanka $A\beta_{42}$ proteina ($A\beta$ peptida- $A\beta P$), koji se nedovoljno efikasno uklanja, dolazi do taloženja ovih depozita u moždanom tkivu, te nastanka lokalne destrukcije neurona i formiranja amiloidnih plakova. $A\beta P$ je hidrofobni peptid sa sposobnošću samoorganizacije i strukturacije u oligomer stabilan u vodenoj sredini. Oligomeri $A\beta P$ formiraju nesolubilne agregate tzv. amilodne fibrile, a neurotoksičnost ovih kolekcija raste vremenom. Skorija istraživanja u ćelijskim kulturama metodom po veličini speraišćom hromatografijom, dokazala su da i solubilni oligomeri mogu biti sinaptotoksični i neurotoksični (Selkoe, 2008).

Nedvosmisleno je prihvaćeno da $A\beta$ koji nastaje iz APP u svojoj solubilnoj oligomernoj formi, pre nego $A\beta$ plakovi, indukuje sinaptičko oštećenje, neuralnu toksičnost i deficit pamćenja na animalnim modelima modelima AB (Kayed i sar, 2003; Lancor i sar., 2004; Haass i Selkoe., 2007). Na dalje, utvrđeno je da $A\beta$ oligomeri i peptidi aktiviraju glikoogen sintazu kinaze- 3β (GSK- 3β), čija aktivacija je regulisana je kroz Wnt/ β -catenin ćelijski put (He i Shen, 2009) uključen proces fosforilacije tau proteina u mozgu obolelih od AB. Pokzanao je da amyloid- β oligomeri modulišu proliferaciju, diferencijaciju i migraciju humanih neuralnih stem ćelija (NSC) putem navednog (GSK- 3β), puta (Lee i sar., 2013). Dalji nastavak istraživanja i praćenje uticaja- β oligomera, mogao bi da dovede do eventulanog razvoja humane NSC-bazirane terapije za obolele AB.

Studije koje su pratile nivoe akumulirajućih solubilnih $A\beta$ oligomera dokazale su da oni snažno koreliraju sa kognitivnim padom obolelih od AB is toga je pretpostavljeno da je njihova uloga u nastanku neurotoksičnih mehanizama imperativna (Lesne i sar., 2013). Studija Mc Donald i sar. (2010) kojom je ispitivana povezanost izmedju biohemijski različitih formi amiloid β -proteina i prisustva demencije Alachajmerovog tipa, pokazala je da su nivoi solubilnog $A\beta$ monomera ali i stabilnog $A\beta$ dimera specifično visoki u uzorku mozga (frontalnom korteksu) obolelih od AB, a da ih ima malo ili nisu detektovani u mozgu dementnih non - Alchajmer tipa.

Naša imunohistohemijska istraživanja ekspesije amiloda β u kortikalnim i hipokampalnim neuronima subakutno tretiranih životinja pokazali su da postoji statistički značajana razlika u poredjenju sa kontrolama. Sa druge strane *Western blot* tehnikom ukupnog amiloida β nisu uočena statistički značajne razlike u odnosu na kontrole. Može se pretpostaviti da je za nastanak stabilnih solubilnih oligomera potreban duži vremenski period na šta ukazuje istraživanje koje je pokazalo da nivoi oligomera β ne moraju biti uidruženi sa starošću (ilipolom) ali postoji inverzna korelacija njihovog sadržaja sa skorom na Mini mental testu (MMS). Sadržaj oligomera u likvoru raste dok MMS skor pokazuje pad u ispitanika od AB i zdravih kontrola (Savage i sar., 2014).

Tome u prilog sugerije tek objavljena studija Baker-Nigh i sar. (2015). Studija je evaluirala sadržaj i karakteristike intraneuralnih depozita amiloida β (preciznije fibrilarnu 42-amino kiselinsku izoformu), u holinergičnim neuronima *basal forebrain*-a mladih osoba, osoba starijeg životnog doba i osoba obolelih od AB. Pretpostavljeno je da su neuroni *basal forbrain*-a (grupa neurona koja leži na bazalnoj površini hemisfera i ventralnom delu nc.lentiformisa) potencijalno vulnerabilni i zato respektabilni u imunohistohemijskim i *Western blot* analizama. Imunoblot analize u ovoj studiji pokazale su visoku koncentraciju amiloida β u *basal forbrain*-u rano u srednjem životnom dobu. Nasuprot tome u kortikalnim piramidnim neuronima i magnoelularnim neuronima *globus palidus*-a nisu pronadjeni slični dokazi postojanja amiloidna imunoreaktivnosti. Sa druge strane, potvrđen je porsat solubilnih oligomera, velike težine i oligomer-specifičnih antitela u mozgu obolelih od AB i starije populacije. Sličan nalaz, u istoj studiji, pokazan je i u slučaju izučavanja molekula amiloida β srednje težine. Ovo istraživanje je pokazalo da je intraneuralna amiloid β akumulacija relativno selektivna osobenost neurona *basal forbrain*-a u ranom životnom dobu i raste sa porastom prisustva intermedijarnih i velikih amiloidnih agregata što karakteriše starenje i Alchajmerovu bolest (Baker-Nigh i sar., 2015).

U tom svetlu, naši rezultati dobijeni na osnovu ispitivanja kortikalnih i hipokampalnih neurona pokazuju da je sadržaj oformljenih ekstracelularnih agregata amiloida β , dvadeset i jedan dan nakon izlaganja aluminijumu, srazmerno mali, što upućuje

na pretpostavku da bi duže izlaganje kao i fokusiranje na vulnerabilno specifične moždane strukture poput *basal forbrain*-a, možda prezentovalo značajnije razlike u poredjenju sa kontrolama.

Novija saznanja, hipotetički, ukazuju na mogućnost da postoji selektivna intraneuralna akumulacija amiloida β tokom adultnog doba i da procesi oligomerizacije i amiloidogeneze tokom starenja dovode u holinergičkim neuronima najpre do degradacije i potencijalnog nastanka AB. U svetlu novih imidžing studija su one koje dokazuju da nije samo atrofija, već sniženi volumen subkortikalnih struktura u obolelih od AB, marker koji korelira sa stepenom oštećenja (Stepan-Buksakowska i sar., 2014). Takođe, studija Zarei i sar. (2010) akcentirala je da se talamička atrofija anterodorzalnih regiona mozga širi putem *fornix*-a na hipokampus u obolelih od AB. Ovi rezultati upućuju na mogućnost da primarna neurodegeneracija jedne strukture dovodi do sekundarne degeneracije regiona koji su sa njom povezani.

Na kraju, nedoumice koje prate kompleksni neuropatološki supstrat Alchajmerove bolesti biće, i na dalje, izazov za nova istraživanja. U tom svetlu, naši rezultati su pokušaj da se načini još jedan pomak i podsticaj u tumačenju neurobiohemijskih mehanizama koji prate ovo degenerativno oboljenje mozga.

6. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima ovog istraživanja, a na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Akutna, *per os* administracija aluminijum hlorida dovodi do promena u aktivnosti AChE, aktivnosti enzima respiratornog lanca i pojave oksidativnog stresa u kotreksu, hipokampusu, talamusu i *nc. caudatusu* eksperimentalnih životinja unutar prvih 24 časa od trovanja.
2. Akutna administracija aluminijum hlorida dovodi do promena u aktivnosti AChE u ispitivanim strukturama, koja je statistički značajno niža u komparaciji sa kontrolnom grupom i tokom celokupnog perioda praćenja promena enzimska aktivnost ne zavisi od administrirane doze Al.
3. Akutna administracija Al tokom 24 časa bitno se odražava na aktivnost ukupne SOD, koja pokazuje signifikantni porast u svim moždanim strukturama životinja tretiranih dozom LD₂₅, dok je sličan obrazac aktivnosti primetan u hipokampalnim strukturama u slučaju trovanja dozom LD₅₀. Najizrazitiji rast aktivnosti enzima SOD uočava se upravo 24 h nakon akutnog tretiranja životinja Al u svim ispitivanim strukturama.
4. Akutna administracija Al tokom 24 časa dovodi do promena u produkciji O₂⁻ koje korespondiraju sa promenama u aktivnosti ukupne SOD. Stoga je porast produkcije superaniona primetan nakon prvih 2h, održava se nakon 6h i registruje se pad na normalne vrednosti 24 časa po tretmanu.
5. Nakon akutne administracije Al aktivnost antioksidativnog enzima CAT, pokazuje značajane, strukturno specifične promene u aktivnosti u svim ispitivanim moždanim strukturama u toku prvih 24 časa.
6. Dinamika promena u mitohondrijalnom elektronskom transportnom lancu nakon 24 časa od akutnog tretmana Al predstavljena je kroz praćenje aktivnosti COX enzima i Kompleksa I. Aktivnost COX je pokazala izvesnu doznu i strukturnu specifičnost.

Akutno i trovanje Al ne uzrokuje značajne promene u aktivnosti Kompleksa I respiratornog lanca.

7. Akutna administracija aluminijum hlorida bila je praćenasignifikantno značajnim porastom nivoa lipidnih peroksida (MDA) u poredjenju sa kontrolnom grupom, u obe ispitivane doze, u svim ispitivanim moždanim strukturama u toku prvih 24 časa po tretmanu. Nasuprot tome, povećan stepen oksidacije proteina posmatran kroz pad vrednosti SH grupa, zabeležen je u korteksu, hipokampusu, talamusu i *nc. caudatus*-u već nakon dva časa po administraciji Al i to u obe aplikovane doze i ima sličnu tendencu tokom narednih 24 časa.
8. Rezultati nakon subakutnog tretmana eksperimentalnih životinja aluminijum hloridom u trajanju od 21. dana pokazali su signifikantan pad aktivnosti AChE u svim ispitivanim moždanim strukturama.
9. Subakutni tretman aluminijum hloridom je bio praćen statistički značajnim povećanjem aktivnosti SOD i porastom nivoa superoksidnih anjona (O_2^-) u ispitivanim strukturama u poredjenju sa kontrolama. Aktivnost enzima CAT je bila statistički značajano smanjena u svim moždanim strukturama, izuzev u hipokampusu.
10. Rezultati dobijeni nakon subakutnog tretmana džerbila pokazali su u statistički značajan porast nivoa lipidnih peroksida u svim ispitivanim moždanim strukturama, dok se vrednosti SH grupa bile značajno smanjene u poredjenju sa kontrolama.
11. Subakutni tretman životinja doveo je do statistički značajnog povećanja ekspresije citosolne SOD_1 u kortikalnim i mitohondrijalne SOD_2 u hipokampalnim strukturama u poredjenju sa kontrolama.
12. Rezultati dobijeni nakon subakutnog tretmana aluminijumom u dozi od LD_{10} pokazali su signifikantan pad COX aktivnosti u svim ispitivanim moždanim strukturama. Aktivnost Kompleksa I nije bila statistički značajno različita u odnosu na kontrolne vrednosti.

13. Subakutno trovanje sa Al je praćeno nakupljanjem depozita amiloda β u kortikalnim i hipokampalnim neuronima
14. Subjedinčno i strukturno specifične promene u ekspresiji NADPH oksidaze su zapažene nakon subakutnog trovanja eksperimentalnih životinja sa Al.
15. Rezultati ove doktorske teze ukazuju da se oksidativni stres kao i promene u aktivnosti enzima u holinergičkim sinapsama, javljaju rano po ingestiji Al. Promene pokazatelja oksidativnog stresa nastaju već dva sata nakon ingestije aluminijuma i prethode promenama mitohondrijalnih enzima, ukazujući na prisustvo drugih izvora slobodnih radikala. Subakutni tretman sa Al ukazuje na neurotoksičnost ovog metala koja pored promena u holinergičkom sistemu, mitohondrijalnom metabolizmu i pokazateljima oksidativnog stresa, uključuje i promenu u ekspresiji pojedinih subjedinica NADPH oksidaze, ukazujući na potencijalni značaj ovog enzima kao terapijske mete. Dalja istraživanja neurobiohemijskih efekata trovanja Al mogu da pomognu u razumevanju ranog patofiziološkog supstrata neurotoksičnosti kao i da ukažu na moguće strategije u prevenciji i tretmanu Alchajmerove bolesti.

7. LITERATURA

1. Abbott A, Dementia: A problem for our age. *Nature* 2011; 475:S2–S4.
2. Alfrey AC, LeGendre GR and Kaehny D. The dialysis encephalopathy syndrome. Possible aluminium intoxication, *N Engl J Med* 1976;. 294: 184–188.
3. Alzheimer A. Uber eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift fur Psychiatrie und phy- chish-Gerichtliche Medizin* 1907; 64: 146-148.
4. Alzheimer's Association. Alzheimer's Disease Facts and Figures, *Alzheimer's & Dementia* 2011;10:10-21
5. American Psychiatric Association. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders* (5th edition). Arlington, Va.:American Psychiatric Publishing; 2013.
6. Andrasi E, Pali N, Molnar Z, Kosel S Brain aluminum, magnesium and phosphorus contents of control and Alzheimerdiseased patients. *J Alzheimers Dis* 2005; 7: 273–284.
7. Ansari, MA, Scheff SW. Oxidative Stress in the Progression of Alzheimer Disease in the Frontal Cortex. *J Neuropathol Exp Neurol* 2010; 69:155–167.
8. Aremu DA, Meshitsuka S. Accumulation of aluminum by primary cultured astrocytes from aluminum amino acid complex and its apoptotic effect. *Brain Res* 2005;1031:284–296.
9. Aremu, DA, Meshitsuka, S. Some aspects of astroglial functions and aluminium implications for neurodegenartion. *B Res Rev* 2006 ;52, 94-196.
10. Auld DS, Kornecook TJ, Bastianetto S, and Quirion R. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Prog Neurobiol* 2002; 68: 209–245.
11. Babior BM: NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol* 2004, 16:42-47.
12. Baker-Nigh A, Vahedi S, Goetz Davis E , Weintraub S , Bigio EH , Klein WL , Geula C. Neuronal amyloid- β accumulation within cholinergic basal forebrain in ageing and

- Alzheimer's disease. *Brain* in press. First published online: 2 March 2015doi: <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awv024>.
13. Bassett CN, Montine TJ. Lipoproteins and lipid peroxidation in Alzheimer's disease. *J Nutr Health Aging* 2003; 7,:24-29.
 14. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007 ;87:245–313.
 15. Bharathi K S, Jagannatha R, and Stein R. First evidence on induced topological changes in supercoiled DNA by an aluminium D-aspartate complex. *J Biolog Inorg Chem* 2003; 8: 823–830.
 16. Bharathi P, Vasudevaraju P, Govindaraju M, Palanisamy AP, Sambamurti K, Rao KS. Molecular toxicity of aluminium in relation to neurodegeneration. *Indian J Med Res* 2008; 128: 545-556.
 17. Blass JP, Sheu RK, Gibson GE. Inherent abnormalities in energy metabolism in Alzheimer disease. Interaction with cerebrovascular compromise. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 903:204–221.
 18. Block ML. NADPH oxidase as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *BMC Neurosci* 2008;2:S1- S8.
 19. Bobba A, Petragallo VA, Marra Antonela AE. Alzheimer's proteins, oxidative stress, and mitochondrial dysfunction interplay in a neuronal model of Alzheimer's disease. *Int J Alzheimer's Dis* 2010: 2010;621870, ,doi: 10.4061/2010/621870.
 20. Bondy SC, Guo-Ross SX, Pien J. Mechanisms underlying the aluminum-induced potentiation of the pro-oxidant properties of transition metals. *Neurotoxicology* 1988;19: 65-71.
 21. Brining SK, Jones CR, Chang MC. Effects of chronic betaamyloid treatment on fatty acid incorporation into rat brain. *Neurobiol Aging* 1996; 17 : 301-10.

22. Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, and Arrighi HM. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease, *Alzheimer's and Dementia* 2007; 3:186–191.
23. Butterfield DA, Castegna A, Lauderback CM, Drake J.. Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiol Aging* 2002; 23: 655–664.
24. Butterfield A, Reead T, Perlugi M, De Marco C, Coccia R, Keller JN, Markesbery WR, Sultana R. Elevated levels of 3-Nitrotyrosine in Brain from Subjects with Amnesic Mild Cognitive Impairment: Implications for the Role of Nitration in the Progression of Alzheimer's disease *Brain Res* 2007; 1148: 243-248.
25. Cagnin A, Brooks DJ, Kennedy AM, Gunn RN, Myers R, Turkheimer FE, Jones T, Banati RB: In-vivo measurement of activated microglia in dementia. *Lancet* 2001;358:461-467.
26. Campbell A and Bondy SC. Aluminum induced oxidative events and its relation to inflammation: a role for the metal in Alzheimer's disease. *Cell Mol Biol* 2000; 46, 721-730.
27. Campbell A, Yang EY, Tsai-Turton M and Bondy SC, Pro-inflammatory effects of aluminum in human glioblastoma cells. *Brain Res* 2002; 933: 60–65.
28. Campbell A, Kumar A, La Rosa FG, Prasad KN and Bondy SC. Aluminum increases levels of β -amyloid and ubiquitin in neuroblastoma but not in glioma cells. *Proceed Soc Exp Biol Med* 2000;223;397–402.
29. Campbell A. The potential role of aluminium in Alzheimer's disease. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2002; 17:17–20.
30. Canevari L, Clark JB, and Bates TE . β -Amyloid fragment 25-35 selectively decreases complex IV activity in isolated mitochondria, *FEBS Lett* 1999;457:131–134.
31. Cardoso SM, Proença MT, Santos S, Santana I, Oliveira CR. Cytochrome c oxidase is decreased in Alzheimer's disease platelets. *Neurobiol Aging*. 2004 ;25:105-10.

32. Casado A ,Lopez-Fernández MA, Casado MC, de La Torre R. Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzyme Activities in Vascular and Alzheimer Dementias. *Neurochem Res* 2008;33:450–458
33. Casley CS, Canevari L, Land JM, Clark JB, and Sharpe MA: β -Amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme activities. *J Neurochem* 2002; 80: 91–100.
34. Ceron JJ, Tecles F and Tvarijonaviciute A .Serum paraoxonase 1 (PON1) measurement: an update.*BMC Veterinary Research* 2014, 10:74 doi:10.1186/1746-6148-10-74
35. Chen JX, Yan SS. Role of mitochondrial amyloid-beta in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2010; 20: 569–578.
36. Chen X and Yan SD. Mitochondria IAB :a potential cause of metabolic dysfunction in Alzheimer's disease," *IUBMB Life* 2006;.58:686–694.
37. Chen, WT, Liao YH, Yu HM, Cheng IH, Chen YR. Distinct effects of Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , and Al^{3+} on amyloid-beta stability, oligomerization, and aggregation: amyloid-beta destabilization promotes annular protofibril formation. *J. Biol. Chem.* 2011; 286:9646-56.
38. Chusid JGPacella BL, Kopeloff LM and Kopeloff N. Chronic epilepsy in the monkey following multiple intracerebral injection of alumina cream. *Proceed Soc Exp Biol Med* 1951; 78: 53–54.
39. Council of the European Union. Council Directive 98/83/EC on the Quality of Water Intended for Human Consumption 1998.
40. Council of the European Union. Scientific Committee on Consumer Safety Opinion on the safety of aluminium in cosmetic products.2014. SCCS 1525/14.
41. Crapper DR, Krishnan SS, Dalton AJ. Brain aluminium distribution in Alzheimer's disease and experimental neurofibrillary degeneration. *Science* 1973; 180 : 511-3.

42. Cullen, JM and Allwood, JM. Mapping the global flow of aluminum: from liquid aluminum to end-use goods. *Environ Sci Technol* 2013, 47: 3057-3064.
43. Darbre PD, Bakir A, Iskakova E. Effect of aluminium on migratory and invasive properties of MCF-7 human breast cancer cells in culture. *J Inorg Biochem.* 2013;128:245-9.
44. Darbre PD. Aluminium, antiperspirants and breast cancer. *J Inorg Biochem* 2005; 99:1912-9.
45. de Lustig, SE, Serra AJ, Kohan S, Canziani AG, Famulari LA, Dominguez OR. Copper-zinc superoxide dismutase activity in red blood cells and serum in demented patients and in aging. *J Neurol Sci* 1993;115, 18–25.
46. Di J, Zhang M, Yao K, Bi S. Direct voltammetry of catalase immobilised on silica-gel and cysteine modified gold electrode and its application. *Biosens Bioelectron* 2006; 15:247-252.
47. Dickson DW. Pathogenesis of senile plaques. *J. Neuropathol Exp Neurol* 1997;56:321–339.
48. Dickson W.D. Apoptotic mechanisms in Alzheimer neurofibrillary degeneration: cause or effect? *J Clin Invest.* 2004;114:23–27.
49. Döllken V. Über die Wirkung des Aluminiums mit besonderer Berücksichtigung der durch das Aluminium verursachten Läsionen im Zentralnervensystem, *Arch Exp Pathol Pharmacol* 1897: 98–120.
50. Domingo J, Gomez M and Colomina T. Oral silicon supplementation: an effective therapy for preventing oral aluminium absorption and retention in mammals. *Nutrition in Clinical Care* 2011; 69:41-55.
51. Drago D, Bettella M, Bolognin S, Cendron L, Scancar J, et al. Potential pathogenic role of beta-amyloid(1-42)-aluminum complex in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40: 731–746.

52. Du H, Guo L, Yan S, Sosunov AA, McKhann GM, and Yan SS. Early deficits in synaptic mitochondria in an Alzheimer's disease mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010; 107: 18670–18675.
53. Duan Y, Dong S, Gu F, Hu Y, Zhao Z. Advances in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: Focusing on Tau-Mediated Neurodegeneration. *Transl Neurodegener*. 2012; 1: 24. Published online 2012 December 15. doi: 10.1186/2047-9158-1-24.
54. Duthey B. Alzheimer Disease and other Dementias. Background Paper, 2013.
55. Edwardson JA, Candy JM. Aluminum and the pathogenesis of senile plaques—studies in Alzheimer's-disease and chronic renal failure. *Environ Geochem Health* 1990a;12:94–6.
56. Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 1961;7:88-95.
57. Esposito L, J. Raber, L. Kekonius et al. Reduction in mitochondrial superoxide dismutase modulates Alzheimer's disease-like pathology and accelerates the onset of behavioral changes in human amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci* 2006;26:5167–5179.
58. Exley C, Ahmed U, Polwart A & Bloor RN. Elevated urinary aluminium in current and past users of illicit heroin. *Addict Biol* 2007;12, 197-199.
59. Exley C, Begum A, Woolley MP & Bloor RN. Aluminium in tobacco and cannabis and smoking-related disease. *AJM* 2006;119:276.e9-276.e ll.
60. Exley C, House E. Aluminium in the human brain. *Monatsh Chem*. 2011;142:357–63.
61. Exley C, Price CN, Kelly SM, and Birchall JD. An interaction of β -amyloid with aluminium in vitro. *FEBS Letters* 1993; 324: 293–295.

62. Exley C. Aluminum and iron, but neither copper nor zinc, are key to the precipitation of β -sheets of A β 42 in senile plaque cores in Alzheimer's disease, *J Alzheimers Dis* 2006;10: 173–177.
63. Exley C. Aluminum in antiperspirants: more than just skin deep. *Am J Med* 2004 ;117:969–970.
64. Exley C. The Aluminium-Amyloid Cascade Hypothesis and Alzheimer's Disease. *Subcellular Biochemistry* 2005;38: 225-234.
65. Exley C: Does antiperspirant use increase the risk of aluminium-related disease, including Alzheimer's disease? *Mol Med Today* 1998; 4:107–109.
66. Exley C: The pro-oxidant activity of aluminum. *Free Radic Biol Med* 2004;36:380–387.
67. Ferreira, C., Piai, A., Takayanagui, M., Segura-Munoz S.I., 2008. Aluminium as a risk factor for Alzheimer's Disease . *Rev. Lat. Am. Enfermagem*. 16, 151-7.
68. Flarend R, Bin T, Elmore D and Hem SL (2001). A preliminary study of the dermal absorption of aluminium from antiperspirants using aluminium-26. *Food Chem. Toxicol.*2001; 39: 163-168.
69. Francisco F, López CC. Aluminium content of drinking waters, fruit juices and soft drinks: contribution to dietary intake. *Sci Total Environ* 2002;292: 205-213.
70. Frecker M. F. Dementia in Newfoundland: identification of a geographical isolate? *JECH*1991; 45: 307–311.
71. Frost B, Jacks RL, Diamond MI: Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J Biol Chem* 2009, 284:12845-12852
72. Galluzzi S, Geroldi C, Amicucci G, Bocchio-Chiavetto L, Bonetti M, Bonvicini C, et al. Supporting evidence for using biomarkers in the diagnosis of MCI due to AD. *J Neurol* 2013;260:640–50.

73. Games D, Adams D, Alesandrini R. Alzheimer's- type neuropathology in transgenic mice over expressing V71F beta amyloid precursor protein. *Nature* 1995; 373 : 523-7.
74. Ghribi O, DeWitt D, Forbes MS. Et al. Co-involvement of mitochondria and endoplasmic reticulum in regulation of apoptosis: changes in cytochrome c, Bcl-2 and bax in the hippocampus of aluminum-treated rabbits. *Brain Res.* 2001; 903:66-73.
75. Ghribi O, Herman MM, Forbes MS, DeWitt DA and Savory J. GDNF protects against aluminum-induced apoptosis in rabbits by upregulating Bcl-2 and Bcl-X and inhibiting mitochondrial Bax translocation. *Neur Dis* 2001; 8: 764–773.
76. Gil P, Farin~as F, Casado A et al. Malondialdehyde: a possible marker of ageing. *Gerontology* 2002; 48:209–214.
77. Goncharuk VV, Lapshin VB, Chichaeva MA, Matveeva MS, Samsoni-Todorov AO, Taranov VV and Syroezhkin AV. Heavy metals, aluminum, and arsenic in aerosols of the world ocean. *J Water Chem Tech* 2012; 34: 1–10.
78. Good PF and Perl DP. Aluminium in Alzheimer's? *Nature* 1993; 362: 418–422.
79. Goth L. *Clinica Chimica Acta* 1991;196:143-152.
80. Green SP, Cairns B, Rae J, Errett-Baroncini C, Hongo JA, Erickson RW, and Curnutte JT. Induction of gp91-phox, a component of the phagocyte NADPH oxidase, in microglial cells during central nervous system inflammation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001;21: 374–384.
81. Griffioen KJ, Ghribi O, Fox N, Savory J, DeWitt DA. Aluminium maltolate-induced toxicity in NT2 cells occurs through apoptosis and includes cytochrome c release. *Neurotoxicol* 2004; 25: 859-867.
82. Grundke-Iqbal I et al. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* 1986;261:6084–6089.
83. Gulya K, Rakonczay Z, Kasa P. Cholinotoxic effects of aluminum in rat brain. *J. Neuroche* 1990; 54: 20–26.

84. Guo GW, and Liang YX. Aluminum-induced apoptosis in cultured astrocytes and its effect on calcium homeostasis. *Brain Res* 2001; 888:221-226.
85. Gupta VB, Anitha S, Hegde ML, Zecca L, Garruto RM, Ravid R, Shankar SK, Stein R, Shanmugavelu P, Jagannatha Rao KS. Aluminum in Alzheimer's disease: Are we still at a crossroad? *CellMol Life Sci* 2005;62:143–158.
86. Gursky O, Aleshkov S. Temperature-dependent β -sheet formation in β -amyloid $a\beta$ 1-40 peptide in water: Uncoupling β -structure folding from aggregation. *Biochim Biophys Acta BBA Protein Struct Mol Enzymol* 2000;1476: 93–102.
87. Gutteridge JMC, Qunilan GJ, Clark I, Halliwell B. Aluminium salts accelerate peroxidation of membrane lipids stimulated by iron salts. *BBA* 1985; 835: 441-447.
88. Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 101–112.
89. Hansson Petersen C.A., Alikhani N., Behbahani H. et al., "The amyloid β -peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008; 105:13145–13150.
90. Hardy J and Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002; 297: 353–356.
91. Harrington CR, Wischik CM, McArthur FK., et al.. Alzheimer's-disease-like changes in tau protein processing: association with aluminium accumulation in brains of renal dialysis patients *Lancet* 1994 ; 343:993-997.
92. He P, Shen Y. Interruption of beta-catenin signaling reduces neurogenesis in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2009; 29: 6545–6557.
93. Herholz K. Acetylcholine esterase activity in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2008;. 35: 25-29.

94. Hess HH, Pope A. Intralaminar distribution of cytochrome oxidase activity in human frontal isocortex. *J Neurochem.* 1960; 5:207-217.
95. Heydenreich B, Bellinghausen I, Lund L, Henmar H, Lund G, Adler P Würtzen A and Saloga J. Adjuvant effects of aluminium hydroxide-adsorbed allergens and allergoids – differences in vivo and in vitro. *Clin & Expl Immun* 2014; 176: 310–319
96. Hirai K, Aliev G, Nunomura A, Fujioka H, Russell RL, Atwood CS, Johnson AB, Kress Y, Vinters HV, Tabaton M, Shimohama S, Cash AD, Siedlak SL, Harris PL, Jones PK, Petersen PR, Perry G, Smith MA. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 2001;21, 3017-3023.
97. Hirata-Fukae C, Li HF, Hoe HS, Gray AJ, Minami SS, Hamada K, Niikura T, Hua F, Tsukagoshi-Nagai H, Horikoshi-Sakuraba Y, Mughal M, Rebeck GW, Laferla FM, Mattson MP, Iwata N, Saido TC, Klein WL, Duff KE, Aisen PS, Matsuoka Y. Female exhibit more extensive amyloid, but not tau, pathology in an Alzheimer transgenic model. *Brain Res* 2008;1216:92–103.
98. Hyman BT, Phelps, CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Carrillo MC, et al. National Institute on Aging–Alzheimer's Association guidelines on neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2012;8:1–13.
99. Ibi M, Matsuno K, Shiba D, Katsuyama M, Iwata K, Kakehi T, Nakagawa T, Sango K, Shirai Y, Yokoyama T, Kaneko S, Saito N, and Yabe-Nishimura C. Reactive oxygen species derived from NOX1=NADPH oxidase enhance inflammatory pain. *J Neurosci* 2008;28: 9486–9494.
100. Imlay JA. Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol.* 2003;57: 395–418.
101. Infanger DW, Sharma RV, and Davison RL. NADPH oxidases of the brain: distribution, regulation, and function. *Antioxid Redox Signal* 2006;8: 1583–1596.
102. Ittel TH. Determinants of gastrointestinal absorption and distribution of aluminium in health and uraemia. *Nephrol Dial Transplant* 1993;8:17–24.

103. Jack CR Jr, Knopman DS, Jagust WJ, et al. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol.* 2010; 9:119-122.
104. Jack CR, Lowe VJ, Weigand SD, Wiste HJ, Senjem ML, Knopman DS, et al. Serial PIB and MRI in normal, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: Implications for sequence of pathological events in Alzheimer's disease. *Brain* 2009;132:1355–1365.
105. Janus C, Pearson J, McLaurin J et al. A β peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease *Nature* 2000;408,: 979–982.
106. Jelenković A, Jovanović DM, Stevanović I, Petronijević N, Bokonjić D, Živković J and Igić R. Influence of the Green Tea Leaf Extract on Neurotoxicity of Aluminium Chloride in Rats. *Phytotherapy research* 2014;28:82-87.
107. Jiang F, Zhang Y, I Gregory J, Dustin G.J. NADPH Oxidase-Mediated Redox Signaling: Roles in Cellular Stress Response, Stress tolerance, and Tissue Repair. *Pharmacol Rev* 2011;63:218–242.
108. Jovanović M, Jelenković A, Vasiljević I, Bokonjić D, Čolić M, Marinković S, Stanimirović D. Intracerebral Aluminium intoxication: an involvement of oxidative damage. In: Ruždijić S, Rakić Lj (eds.). *Neurobiological Studies-From Genes to behaviour*. Research Signpost, Kerala, India 2006; 259-271.
109. Jovanović MD, Jelenković A, Stevanović ID, et al. Protective effects of glucose-6-phosphate dehydrogenase on neurotoxicity of aluminium applied into the CA1 sector of rat hippocampus. *The Indian Journal of Medical Research.* 2014;139(6):864-872.
110. Julka and Gill KD. Involvement of altered cytoskeletal protein phosphorylation in aluminum-induced CNS dysfunction. *J Biochem Tox* 1996; 11: 227–233.
111. Kadowaki H, Nishitoh H, Urano F, Sadamitsu C, Matsuzawa A, Takeda K, Masutani H, Yodoi J, Urano Y, Nagano T, Ichijo H. Amyloid beta induces neuronal cell death through ROS-mediated ASK1 activation. *Cell Death Differ* 2005;12:19-24.

112. Kaehny WD, Hegg AP, and Alfrey AC. Gastrointestinal absorption of aluminum from aluminum-containing antacids. *N Engl J Med* 1977;296:1389-1390.
113. Kaizer RR, Corrêa MC, Gris LR, da Rosa CS, Bohrer D, Morsch VM, Schetinger MR. Effect of long-term exposure to aluminum on the acetylcholinesterase activity in the central nervous system and erythrocytes. *Neurochem Res* 2008;. 33: 2294-2301.
114. Kaizer RR, Corrêa MC, Spanevello RM, Morsch VM, Mazzanti CM, Gonçalves JF et al. Acetylcholinesterase activation and enhanced lipid peroxidation after long-term exposure to low levels of aluminum on different mouse brain regions. *J. Inorg. Biochem.* 2005;99: 1865–1870.
115. Kaltzo I, Wisniewski H and Streicher E. Experimental production of neurofibrillary degeneration. I Light microscopic observations. *J Neuropathol Exp Neurol* 1965; 24:187-199.
116. Kaneko N, Sugioka T, Sakurai H. Aluminum compounds enhance lipid peroxidation in liposomes: insight into cellular damage caused by oxidative stress. *J Inorg Biochem* 2007; 101:967-75.
117. Karantzoulis S, Galvin J. Distinguishing Alzheimer's disease from other major forms of dementia. *Expert Rev Neurother* 2011;11:1579–1591.
118. Karbouj R. Aluminium leaching using chelating agents as compositions of food. *Food Chem Toxicol* 2007; 45 :1688-1693.
119. Kawahara M i Kato-Negishi M. Link between Aluminum and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: The Integration of the Aluminum and Amyloid Cascade Hypotheses. *Int J Alzheimers Dis.* 2011;2011:276393. doi:10.4061/2011/276393
120. Kawahara M, M. Kato-Negishi, R. Hosoda, L. Imamura, M. Tsuda, and Y. Kuroda, Brain-derived neurotrophic factor protects cultured rat hippocampal neurons from aluminum maltolate neurotoxicity *J Inorg Biochem* 2003; 97:124–131.

121. Kawahara M, Midori K, Kuroda Y. Effects of aluminum on the neurotoxicity of primary cultured neurons and on the aggregation of β -amyloid protein. *Brain Res Bull* 2001 May; 5(2):211-7.
122. Kawahara M. Effects of aluminum on the nervous system and its possible link with neurodegenerative diseases *J Alzheimer's Dis* 2005; 8:171–182.
123. Kawooya J, Emmons T, Gonzalez-DeWhitt P, Camp M., D'Andrea S. Electrophoretic mobility of alzheimer's amyloid- β peptides in urea-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 2003; 323:103–113.
124. Kaye R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW *et al.* Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 2003; 300: 486–489.
125. Keller JN, Schmitt FA, Scheff SW *et al.* Evidence of increased oxidative damage in subjects with mild cognitive impairment. *Neurology* 2005; 64: 1152–1156.
126. Kihira T, Yoshida S, Uebayashin Y, Wakayama I and Yase Y, Experimental model of motor neuron disease: oral aluminium neurotoxicity, *Biomedical Research* 1994;15:, 27–36.
127. Kihira T, Yoshida S, Yase Y, Ono S and Kondo T. Chronic low-Ca/Mg high-Al diet induces neuronal loss, *Neuropathology* 2002;. 22:171–179.
128. Kim MJ, Shin KS, Chung YB, Jung KW, Cha CI, and Shin DH. Immunohistochemical study of p47PHOX and gp91phox distributions in rat brain. *Brain Res* 2005; 1040: 178–186.
129. Kish SJ, Mastrogiacono F, Guttman M, Furukawa Y, Taanman JW, Dozic S, Pandolfo M, Lamarche J, DiStefano L, and Chang LJ. Decreased brain protein levels of cytochrome oxidase subunits in Alzheimer's disease and in hereditary spinocerebellar ataxia disorders: a nonspecific change? *J Neurochem* 1999; 72:700-707.
130. Kraepelin E: *Psychiatrie, Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte, Klinische Psychiatrie*, 1910; 2: 8th Edition. Barth, Leipzig

131. Krewski D, Yokel RA, Nieboer E, Borchelt D, Cohen J, Harry J, Kacew S, Lindsay J, Mahfouz AM, Rondeau V. Human health risk assessment for aluminium, aluminium oxide, and aluminium hydroxide. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2007;10:1–269.
132. Kumar V, Bal A, and Gill KD. Impairment of mitochondrial energy metabolism in different regions of rat brain following chronic exposure to aluminium,” *Brain Res* 2008; 1232:94–103.
133. Lacor PN, Buniel MC, Chang L, Fernandez SJ, Gong Y, Viola KL et al. Synaptic targeting by Alzheimer’s-related amyloid beta oligomers. *J Neurosci* 2004; 24: 10191–10200.
134. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 181–189.
135. Lee IS, Kwangsoo Jung, Il-Sun Kim and Kook In Park Amyloid- β oligomers regulate the properties of human neural stem cells through GSK-3 β signaling. *Expl & Mol Med* 2013; 45, e60; doi:10.1038/emm.2013.125
136. Lesne SE, Sherman MA, Grant M, Kuskowski M, Schneider JA, Bennett DA et al. Brain amyloid-beta oligomers in ageing and Alzheimer’s disease. *Brain* 2013; 136: 1383–1398.
137. Leuner, S. Hauptmann, R. Abdel-Kader et al. Mito-chondrial dysfunction: the first domino in brain aging and Alzheimer’s disease? *Antiox Redox Sign* 2007;9:1659–1675.
138. Levesque L, Mizzen CA, McLachlan DR, Fraser PE. Ligand specific effects on aluminum incorporation and toxicity in neurons and astrocytes. *Brain Res* 2000; 877:191–202.
139. Li F, Calingasan NY, Yu F et al. Increased plaque burden in brains of APP mutant MnSOD heterozygous knockout mice. *J Neurochem* 2004;89:1308–1312.
140. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265–275.

141. Lukiw W J, LeBlanc HJ, Carver LA, McLachlan DRC, and Bazan NG. Run-on gene transcription in human neocortical nuclei: inhibition by nanomolar aluminum and implications for neurodegenerative disease. *J Molec Neurosc* 1998;11: 67–78.
142. Ma L and Zhou J. Dopamine promotes the survival of embryonic striatal cells: involvement of superoxide and endogenous NADPH oxidase. *Neurochem Res* 2006;31: 463–471.
143. Magnier A, Fekete V, Van Loco J, Bolle F, Elskens M. Speciation study of aluminium in beverages by Competitive Ligand Exchange–Adsorptive Stripping Voltammetry. *Talanta, Elsevier Science* 2014;122: 30-35.
144. Maljak G. Parametri antioksidativne zaštite i ateroskleroza. *Farmaceutski fakultet, Beograd*, 2009.
145. Mancuso MF, Coppede F, Murri L, and G. Siciliano G, “Mitochondrial cascade hypothesis of Alzheimer’s disease: myth or reality?” *Antioxi & Redox Signaling* 2007; 9: 1631–1646.
146. Manczak M, Park BS, Jung Y, and Reddy PH. Differential expression of oxidative phosphorylation genes in patients with Alzheimer’s disease: implications for early mitochondrial dysfunction and oxidative damage. *Neuromolecular Med* 2004; 5: 147–162.
147. Manczak MT, Anekonda S, Henson E, Park BS, Quinn J and Reddy PH. Mitochondria are a direct site of A β accumulation in Alzheimer’s disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Hum Mol Gen* 2006;15:1437–1449.
148. Marklund SL, Adolfsson R, Gottfries CG, and Winblad B. Superoxide dismutase isoenzymes in normal brains and in brains from patients with dementia of Alzheimer type J *Neur Scienc* 1985; 67:319–325.
149. Marlatt M, Lee MG, Perry G, Smith M and Zhu X, Sources and mechanisms of cytoplasmic oxidative damage in Alzheimer’s disease. *ANE* 2004; 64:81–87.

150. Marsden SNE, Parkinson IS, Ward MK, Ellis HA, Kerr DNS. Evidence for aluminium accumulation in renal failure. *Proc Eur Dial Transplant Assoc* 1979;16:588–596
151. Martyn CN, Osmond C, Edwardson JA, Barker DJP, Harris EC, and Lacey RF, Geographical relation between Alzheimer's disease and aluminium in drinking water *Lancet* 1989; 1:59–62.
152. Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. Amyloid Plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82: 4245–4249.
153. Mates M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicol* 2000;153:83-104.
154. McDonald JM, Savva GM, Brayne C, Welzel AT, Forster G, Shankar GM *et al.* The presence of sodium dodecyl sulphate-stable Aβ dimers is strongly associated with Alzheimer-type dementia. *Brain* 2010; 133: 1328–1341.
155. McKhann G, Drachman D, Folstein M *et al.* Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA work group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease *Neurology* 1984;34: 939–944.
156. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H *et al.* The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging – Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2011; 7:263–269.
157. Meiri H, Banin E, Roll M and Rousseau A. Toxic effects of aluminum on nerve cells and synaptic transmission. *Prog Neurobiol* 1993; 40: 89–121.
158. Mendez I, Williams J, Nicholson W, Taylor R. SOD Isoforms and Signaling in Blood Vessels Evidence for the Importance of ROS Compartmentalization. *Arter, Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 887-888.

159. Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals and Drugs, Eight edition, 43 (Merck &CO, INC, Whitehouse station, New Jersey 1968 pp 612,186.
160. Mičić DV and Petronijević N. Acetylcholinesterase activity in the Mongolian gerbil brain after acute poisoning with aluminum, *J Alzheimer's Dis* 2000;2:1–6.
161. Mičić DV, Petronijević ND, Vučetić SS. Superoxid dismutase activity in the mongolian gerbil brain after acute poisoning with aluminium. *J Alzheimers Dis* 2003; 5: 49-56.
162. Mičić DV, Petronijević, ND. Cytochrome c oxidase activity in the Mongolian gerbil brain after acute poisoning with aluminium, *Jugoslav. Physiol. Pharmacol. Acta* 1999; 35:587– 589.
163. Murakami K and Takahiko Shimizu T. Cytoplasmic superoxide radical. *Communicative & Integrative Biology* 2012;5: 255-258
164. Nday CM, Drever BD, Salifoglou T, Platt B. Aluminium interferes with hippocampal calcium signaling in a species-specific manner. *J Inorg Biochem* 2010;104:919-27.
165. Neri LC and Hewitt D. Aluminium, Alzheimer's disease, and drinking water. *Lancet* 1991; 338: 390.
166. Ohta,S, Ohsawa I. Dysfunction of mitochondria and oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease: on defects in the cytochrome c oxidase complex and aldehyde detoxification. *J Alzheimers Dis* 2006;. 9:155-66.
167. Ohyashiki T, Suzuki S, Satoh E, Uemori Y. A marked stimulation of Fe²⁺-initiated lipid peroxidation in phospholipid liposomes by a lipophilic aluminum complex, aluminum acetylacetonate. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1389:141–149.
168. Parihar M, Brewer G. Mitochondrial failure in Alzheimer's disease. *Am J PhysiolCell Physiol* 2007; 292: 8-23.

169. Park KW and Jin BK. Thrombin-induced oxidative stress contributes to the death of hippocampal neurons: role of neuronal NADPH oxidase. *J Neurosci Res* 2008; 86: 1053–1063.
170. Park L, Anrather J, Zhou P, Frys K, Pitstick R, Younkin S, Carlson GA, Iadecola C: NADPH-oxidase-derived reactive oxygen species mediate the cerebrovascular dysfunction induced by the amyloid beta peptide. *J Neurosci* 2005, 25:1769-1777.
171. Park L, Zhou P, Pitstick R, Capone C, Anrather J, Norris EH, Younkin L, Younkin S, Carlson G, McEwen BS, and Iadecola C. Nox2-derived radicals contribute to neurovascular and behavioral dysfunction in mice overexpressing the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:1347–1352.
172. Pavlović A i Stefanova E. Vodič za Alchajmerovu bolest. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse, Republika Srbija, ministarstvo zdravlja, 2013.
173. Pechansky F, Kessler FHP, von Diemen L, Bumaguin DB, Surratt HL, Inciardi JA. Brazilian female crack users show elevated serum aluminum levels. *Rev Bras Psiquiatr.* 2007;29(1):39-42.
174. Perry G, Cash A, Smith M. Alzheimer Disease and Oxidative stress. *J. Biomed. Biotechnol* 2002;2: 120-123.
175. Platt B, Drysdale A, Ndayb C et al. Differential toxicity of novel aluminium compounds in hippocampal culture. *Neuro Toxicol* 2007; 28: 576-586.
176. Polizzi S, Ferrara M, Bugiani M, Barbero D, Baccolo T. Aluminum and iron air pollution near an iron casting and aluminum foundry in Turin district (Italy) *J Inorg Biochem* 2007; 101:1339-1343.
177. Pratico D, Delanty N. Oxidative injury in diseases of the central nervous system: focus on Alzheimer's disease. *Am J Med* 2000;109, 577-585.
178. Pratico D, Lawson JA, Rokach J, FitzGerald GA. The isoprostanes in biology and medicine. *Trend Endocr Metabol* 2001; 12: 243-247.

179. Pratico D, Uryu K, Sung S, Tang S, Trojanowsky JQ, Lee VM . Aluminum modulates brain amyloidosis through oxidative stress in APP transgenic mice. *FASEB J.* 2002; 16:1138-40.
180. Prince M, Prina M and Guerchet M. World Alzheimer Report 2013 . Alzheimer's Disease International (ADI), London. September 2013.
181. Qin B, Cartier L, Dubois-Dauphin M, Li B, Serrander L, Krause KH. A key role for the microglial NADPH oxidase in APPdependent killing of neurons. *Neurobiol. Aging* 2006; 27: 1577–1587.
182. Readnower RD, Sauerbeck AD and Sullivan PG. Mitochondria, Amyloid β , and Alzheimer's Disease. *Int J Alzheimer's Dis* 2011; 2011, Article ID 104545, 5 pages doi:10.4061/2011/104545
183. Reddy PH. Amyloid beta, mitochondrial structural and functional dynamics in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 2009;218:.286–292.
184. Rehnroona S, Smith DS, Akesson B. et al. Peroxidative changes in brain cortical fatty acids and phospholipids, as characterized during Fe^{2+} - and ascorbic acid-stimulated lipid peroxidation in vitro. *J Neurochem.* 1980; 34:1630-8.
185. Resende R, Moreira PI, Proença T, Deshpande A, Busciglio J, Pereira C, Resende Oliveira C. Brain oxidative stress in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Free Radical Biol Med* 2008; 44:2051–2057.
186. Rhein V, Song X, Wiesner A, Ittner LM, Baysang G, Meier F, Ozmen L, Bluethmann H, Drose S, Brandt U, et al.: Amyloid-beta and tau synergistically impair the oxidative phosphorylation system in triple transgenic Alzheimer's disease mice. *PNAS* 2009, 106:20057-20062
187. Ricchelli F, Drago D, Filippi B, Tognon G, Zatta P .Aluminum-triggered structural modifications and aggregation of beta-amyloids. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62:1724-33.
188. Richardson JR. Free radicals in the genesis of Alzheimer's disease, *Annals of the New York Academy of Sciences* 1995; 695:73–76.

189. Roberts E. Alzheimer's disease may begin in the nose and may be caused by aluminosilicates. *Neurobiol Aging* 1986;7:561–56.
190. Roe CM, Fagan AM, Grant EA, Hassenstab J, Moulder KL, Maue D, et al. Amyloid imaging and CSF biomarkers in predicting cognitive impairment up to 7.5 years later. *Neurology* 2013; 7:80:1784–91.
191. Rondeau V, Commenges D, Jacqmin-Gadd H, and Dartigues JF. Relation between aluminum concentrations in drinking water and Alzheimer's disease: an 8-year follow-up study *Am J Epidemiol* 2000;152:59–66.
192. Rondeau V, Gadda HJ, Commenges D, et al. Aluminum and Silica in Drinking Water and the Risk of Alzheimer's Disease or Cognitive impairment. *Am. J. Epidemiol* 2009; 169: 489-496.
193. Roskams AJ, and Connor JR. Aluminum access to the brain: A possible role for the transferrin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990 ; 87:9024
194. Roychaudhuri R, Yang M, Hoshi MM, Teplow DB. Amyloid β -protein assembly and Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 2009; 284: 4749–4753.
195. Saiyed SM, Yokel RA: Aluminium content of some foods and food products in the USA, with aluminium food additives. *Food Addit Contam* 2005, 22(3):234-244.
196. Sasaki A, Yamaguchi H, Ogawa A, Sugihara S, Nakazato Y: Microglial activation in early stages of amyloid beta protein deposition. *Acta Neuropathol* 1997, 94:316-322.
197. Savage MJ, Kalinina J, Wolfe A, Tugusheva K, Korn R, Cash-Mason T, Maxwell JW, Hatcher NG, Haugabook SJ, Bonnie GB, et al. A Sensitive A β Oligomer Assay Discriminates Alzheimer's and Aged Control Cerebrospinal Fluid. *J Neurosci* 2014;19:2884 –2897.

198. Savory J, Herman MM, Ghribi O. Mechanisms of aluminium induced neurodegeneration in animals: implication for Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis* 2006;10:135-144.
199. Schetinger MR, Bonan CD, Morsch VM, Bohrer D, Valentim LM, Rodrigues SR. Effects of aluminium sulfate on delta-aminolevulinic acid dehydratase from kidney, brain, and liver of adult mice. *Braz J Med Biol Res* 1990;32:761-766.
200. Sedlak J and Lindsay RH. Estimation of Total, Protein-Bound, and Nonprotein Sulfhydryl Groups in Tissue with Ellman's Reagent *Analytical biochemistry* 1968;25:192-205.
201. Selkoe DJ. Soluble oligomers of the amyloid β -protein impair synaptic plasticity and behavior," *Behav Brain Res* 2008;192:106-113.
202. Seneff S, Davidson RM, Liu J. Empirical Data Confirm Autism Symptoms Related to Aluminum and Acetaminophen Exposure. *Entropy* 2012; 14:2227-2253.
203. Serrano F, Kolluri NS, Wientjes FB, Card JP, and Klann E. NADPH oxidase immunoreactivity in the mouse brain. *Brain Res* 2003; 988: 193-198.
204. Shaw CA, Tomljenovic L. Aluminum in the central nervous system (CNS): toxicity in humans and animals, vaccine adjuvants, and autoimmunity. *Immunol Res.* 2013;56:304-16.
205. Shcherbatykh I, Carpenter D. The role of metals in the etiology of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2007; 11: 191-205
206. Shelat PB, Chalimoniuk M, Wang JH, Strosznajder JB, Lee JC, Sun AY, Simonyi A, and Sun GY. Amyloid beta peptide and NMDA induce ROS from NADPH oxidase and A β release from cytosolic phospholipase A2 in cortical neurons. *J Neurochem* 2008; 106: 45-55.
207. Shetty K, Veeranna T and Guru SC. Phosphatase activity against neurofilament proteins from bovine spinal cord: effect of aluminium and neuropsychotropic drugs. *Neurosci Lett* 1992;137: 83-86.

208. Shimohama S, Tanino H, Kawakami N, Okamura N, Kodama H, Yamaguchi T, Hayakawa T, Nunomura A, Chiba S, Perry G, Smith MA, and Fujimoto S. Activation of NADPH oxidase in Alzheimer's disease brains. *Biochem Biophys Res* 2000;273: 5–9.
209. Shin RW., Lee WM.-Y and Trojanowski JQ. Aluminum modifies the properties of Alzheimer's disease PHF τ proteins in vivo and in vitro, *J Neurosci* 1994; 14: 7221–7233.
210. Solfrizzi V, Colacicco AM, D'Intorno A. et al. Macronutrients, aluminium from drinking water and foods, and other metals in cognitive decline and dementia. *J Alzheimer's Dis* 2006; 10:303-330.
211. Solomon B, Koppel R and Jossiphov J. Immunostaining of calmodulin and aluminium in Alzheimer's disease-affected brains. *Brain Res Bull* 2001; 558: 253-256.
212. Sorce S, Krause KH. NOX Enzymes in the Central Nervous System: From Signaling to Disease. *Antioxid Redox Signal* 2009;11: 2481–2504.
213. Spisak K, Klimkowicz-Mrowiec A, Pera J, Dziedzic T², Aleksandra G, Slowik A. rs2070424 of the SOD1 gene is associated with risk of Alzheimer's disease. *Neurol Neurochir Pol* 2014;48:342-5.
214. Spofforth J, Edin RC and Eng MRC. Case of aluminium poisoning. *Lancet*, 1921; 197:1301.
215. Stahl T, Taschan H. and Brunn H: Aluminium content of selected foods and food products. *Environmental Sciences Europe* 2011;23:37.
216. Stasia MJ and Li XJ. Genetics and immunopathology of chronic granulomatous disease. *Semin Immunopathol* 2008;30:209–235
217. Stelzmann RA, Schnitzlein HN and Murtagh FR. An English I'ranslation of Alzheimer's 1907 Paper, "Üjber eine eigenartige Erlranliung der Hirnrinde" *Clinic Anatomy* 1995; 8:429-431.

218. Štěpán-Buksakowska I, Szabó N, Hořínek D, Tóth E, Hort J, Warner J, Charvát F, Vécsei L, Roček M, Kincses ZT: Cortical and subcortical atrophy in Alzheimer disease: parallel atrophy of thalamus and hippocampus. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2014;28:65-72. doi: 10.1097/WAD.0b013e318299d3d6.
219. Spitz DR, Oberley LW. An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. *Anal Biochem* 1989;179:8–18.
220. Stevanović I, Jovanović M, Jelenković A, Bokonjić D, Čolić M, Stojanović I. Effect of L-NAME on AlCl₃-induced toxicity in rat brain *Acta Veter Belgrade* 2009; 59:133-146.
221. Stevanović I, Jovanović M, Čolić M, Ninković M, Jelenković A and Mihajlović R. Cytochrome C oxidase activity and nitric oxide synthase in the rat brain following aluminium intracerebral application. *Folia Neuropathol* 2013; 51: 140-146
222. Sullivan PG and Brown MR. Mitochondrial aging and dysfunction in Alzheimer's disease. *Prog Neuro-Psychopharm Bioll Psych* 2005;29:407–410.
223. Sun M, Zigman S. An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autoxidation. *Anal Biochem*. 1978;90:81-9.
224. Tanzi RE and Bertram L. New frontiers in Alzheimer's disease genetics. *Neuron* 2001;32:181–184.
225. Tejada-Simon MV, Serrano F, Villasana LE, Kanterewicz BI, Wu GY, Quinn MT, and Klann E. Synaptic localization of a functional NADPH oxidase in the mouse hippocampus. *Mol Cell Neurosci* 2005;29: 97–106.
226. Tomljenović L i Shaw CA. Aluminum vaccine adjuvants: are they safe? *Curr Med Chem* 2011;18:2630-7.
227. Tsunoda M, Sharma RP. Modulation of tumor necrosis factor α expression in mouse brain after exposure to aluminium in drinking water. *Arch Toxicol* 1999; 73:419-426.

228. Uno H, Aslum PB, Dong S. Cerebral amyloid angiopathy and plaques, and visceral amyloidosis in aged macaques. *Neurobiol Aging* 1999; 17 : 275-82.
229. Verstraeten SV and Oteiza PI. Al-mediated changes in membrane physical properties participate in the inhibition of polyphosphoinositide hydrolysis *Arch Biochem Biophys* 2002; . 408:263–271.
230. Verstraeten SV, Lucia A, Oteiza P.I. Aluminium and lead: molecular mechanisms of brain toxicity. *Arch Toxicol* 2008;82:789–802.
231. Verstraeten SV, Nogueira LV, Schreier S, Oteiza PI: Effect of trivalent metal ions on phase separation and membrane lipid packing: role in lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 1997; 338:121–127.
232. Villemagne VL, Burnham S, Bourgeat P, Brown B, Ellis KA, Salvado O, et al. Amyloid deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: A prospective cohort study. *Lancet Neurol* 2013;12:357–67.
233. Vučetić-Arsić S, Radonjić NV, Jovanović M, Selaković V, Nikolić T, Velimirović M, Stojković T, Milovanović A, Milovanović J and Petronijević ND. Oxidative stress precedes mitochondrial dysfunction in gerbil brain after aluminum ingestion. *Envir toxic and pharm* 2013;36: 1242–1252
234. Walton JR and Wang MX. APP expression, distribution and accumulation are altered by aluminum in a rodent model for Alzheimer's disease. *J Inorg Biochem* 2009;103:1548-54.
235. Walton JR. A Longitudinal Study of Rats Chronically Exposed to Aluminum at Human Dietary Levels. *Neurosci Lett* .2007;412:29–33.
236. Walton JR. An aluminum-based rat model for Alzheimer's disease exhibits oxidative damage, inhibition of PP2A activity, hyperphosphorylated tau, and granulovacuolar degeneration *J Inorg Biochem* 2007;101:1275–1284.
237. Walton JR. Evidence for participation of aluminum in neurofibrillary tangle formation and growth in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2010; 22: 65-72.

238. Wang X, Su B, Perry G, Smith MA, and Zhu X, Insights into amyloid- β -induced mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease. *Free Radical Biology and Medicine* 2007; 43: 1569–1573.
239. Wang XP and Ding HL. Alzheimer's disease: epidemiology, genetics, and beyond. *Neurosci Bull* 2008;24: 105–109.
240. Ward A, Arrighi HM, Michels S, Cedarbaum JM. Mild cognitive impairment: Disparity of incidence and prevalence estimates. *J Alzheimer's Ass* 2012 ;8: 14-21.
241. Whittaker VP, Barker LA. The subcellular fractionation of brain tissue with special reference to the preparation of synaptosomes and their component organelles. In: R. Fried, Editor, *Methods in Neurochemistry* vol. 2, Marcel Dekker, New York. 1972..
242. Wilcock DM, Rojiani A, Rosenthal A et al. Passive immunotherapy against A β in aged APP-transgenic mice reverses cognitive deficits and depletes parenchymal amyloid deposits in spite of increased vascular amyloid and microhemorrhage. *J Neuroinflamm* 2004;1: 24.
243. Wilkinson BL, Landreth GE. The microglial NADPH oxidase complex as a source of oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 2006;3:30.
244. Williams MN. Biological Roles for the NOX Family NADPH Oxidases. *J. Biol. Chem.* 2008, 283:16961-16965.
245. Wills MR and Savory J. Aluminum and chronic renal failure: sources, absorption, transport, and toxicity. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 1989;27: 59–107.
246. World Health Organization (WHO)/IPCS, Aluminum, *Environ. Health Criteria* 1997; 194: 1–152. WHO, Geneva.
247. Wu W, Brickman AM, Luchsinger J, Ferrazzano P, Pichiuole, P et al. The brain in the age of old: The hippocampal formation is targeted differentially by diseases of late life. *Ann Neurol* 2008;64:698–706.

248. Yao J, Irwin RW, Zhao L, Nilsen J, Hamilton RT and Brinton RD. Mitochondrial bioenergetic deficit precedes Alzheimer's pathology in female mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:14670–14675.
249. Ye S, Zhong H, Yanamadala S, and Campese VM. Oxidative stress mediates the stimulation of sympathetic nerve activity in the phenol renal injury model of hypertension. *Hypertension* 48: 309–315, 2006.
250. Yokel R. The toxicology of aluminum in the brain: a review. *Neurotoxicology* 2000; 21:813-828.
251. Yokel RA Brain uptake, retention, and efflux of aluminum and manganese. *Environ Health Perspect* 2002;110:699–704.
252. Yokel RA, Florence RL. Aluminium bioavailability from the approved food additive leavening agent acidic sodium aluminum phosphate, incorporated into a baked good, is lower than from water. *Toxicol.* 2006; 227: 86–93.
253. Yokel RA, McNamara PJ. Aluminum toxicokinetics: an updated mini-review. *Pharmacol Toxicol* 2001;88:159-167.
254. Yokel RA, Rhineheimer SS, Sharma P, Elmore D, McNamara PJ. Entry, half-life, and desferrioxamine-accelerated clearance of brain aluminum after a single (26)Al exposure. *Toxicol Sci* 2001;64:77–82.
255. Yokel RA, Wilson M, Harris WR, Halestrap AP. Aluminum citrate uptake by immortalized brain endothelial cells: implications for its blood–brain barrier transport. *Brain Res* 2002; 930:101–110.
256. Youdim MB: Iron in the brain: implications for Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Mt Sinai J Med* 1988, 55:97–101.
257. Yousef MI. Aluminium-induced changes in hemato-biochemical parameters, lipid peroxidation and enzyme activities of male rabbits: protective role of ascorbic acid. *Toxicology* 2004;199: 47–57.

258. Yuan CY, Lee YJ, Hsu GS. Aluminum overload increases oxidative stress in four functional brain areas of neonatal rats. *J Biomed Sci* 2012; 19: 51.
259. Yumoto S, Kakimi S, Ohsaki A, Ishikawa A. Demonstration of aluminium in amyloid fibers in the cores of senile plaques in the brains of patients with Alzheimer's disease. *J Inorg Biochem* 2009; 103:1579-1584.
260. Zafrilla P, Mulero J, Xandri JM et al (2006) Oxidative stress in Alzheimer patients in different stages of the disease. *Curr Med Chem* 13:1075–1083.
261. Zarei M, Patenaude B, Damoiseaux J, et al. Combining shape and connectivity analysis: an MRI study of thalamic degeneration in Alzheimer's disease. *Neuroimage*. 2010;49:1–8.
262. Zatta P., Ibn-Lkhatat-Idrissi M., Zambenedetti P, Kilyen M, Kiss T. In vivo and in vitro effects of aluminum on the activity of mouse brain acetylcholinesterase, *Brain Res Bull* 2002; 59: 41–45.
263. Zatta PR, Lucchini SJ, van Rensburg J, and Taylor A. The role of metals in neurodegenerative processes: aluminum, manganese, and zinc. *Brain Res Bull* 2003; 62: 15–28.
264. Ziegler-Graham K et al. Worldwide variation in the doubling time of Alzheimer disease incidence rates. *Alzheimer and Dementia*, 2008;4:316-323.

SPISAK SKRAĆENICA

AB	Alchajmerova bolest
AchE	acetilholin esteraza
Al	aluminijum
BDNF	„ <i>brain-derived</i> ” neurotropni faktor
APP	amiloidni prekursorski protein
ATP	adenozin trifosfat
A β	amiloid beta
BKP	blagi kognitivni poremećaj
CAT	katalaza
CD spekt.	cirkularno dihroizna spektroskopija
CNS	centralni nervni sistem
COX	citohrom c oksidaza
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
FBCx	frontobazilarni korteks
GDP	guanozin trifosfat

G6PDH	glukoza-6 fosfat dehidrogenaza
GPX	glutation peroksidaza
HO ₂ [·]	perihidroksi radikal
H ₂ O ₂	hidrogen peroksid
iPs	isoprostan
KMB	krvno moždana barijera
LD	letalna doza
MDA	malondialdehid
MMT	Mini Mental Test
NDPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat oksidaza
NMDA	N-metil D- aspartat ⁴
NSC	neuralne stem ćelije
O ₂ ^{·-}	superoksid anjon
OH [·]	hidroksilni radikal
PET Scan	pozitronska emisiona tomografija
RNK	ribonukleinska kiselina
RO [·]	alkoksi radikal
ROO [·]	peroksi radikal

ROOH	organski hidroperoksid
ROS	slobodni kiseonični radikali
sAPP α	solubilni amiloid prekursorski protein alfa
SH	sulfhidrilne grupe
SOD	superoksid dizmutaza

BIOGRAFIJA

Dr mr sci SVETLANA VUČETIĆ – ARSIĆ rođena je u Beogradu 1966. godine. U svom rodnom gradu je završila osnovnu školu i Petu beogradsku gimnaziju sa odličnim uspehom.

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 1985. godine i stekla zvanje Doktora medicine u svojoj 23. godini sa prosečnom ocenom 8.98. Godine 1990. upisuje postdiplomske studije iz oblasti neurologije. Zvanje Magistra nauka stiče 1993. godine. Specijalizaciju iz oblasti neurologije okončala 1997. godine. Zvanje specijaliste uže specijalizacije iz oblasti bolesti zavisnosti stekla je 2010. godine.

Od 1993. godine stalno zaposlena u Specijalnoj bolnici za bolesti zavisnosti u Beogradu, na poziciji rukovodica Odeljenja intenzivne i polunintenzivne nege.

Više od dve decenije bavi se naučnim radom iz oblasti neuronauka i kognitivne neurologije u okviru plodne saradnje sa Institutom za medicinsku i kliničku biohemiju, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Fokus svoje istraživačke i eksperimentalne delatnosti usmerava na uticaj noksi spoljne sredine u etiopatogenezi Alchajmerove bolesti, iz čega ima objavljene radove u stručnim časopisima i na međunarodnim kongresima.

Odlikuje je ekstenzivno poznavanje i široko iskustvo u tretmanu bolesti zavisnosti kao i subkoordinatorski rad u okviru prevencije i edukacije na istom polju. Autor je više radova publikovanih u inostranim časopisima iz oblasti neuronauka i adiktologije.

Do sada je izlagala svoje radove na brojnim međunarodnim evropskim i svetskim, kao i domaćim kongresima i konferencijama iz oblasti neuronauka, adiktologije i psihijatrije. Kao predavač i edukator, više od dve decenije učestvuje u kreiranju stručnih edukativnih predavanja i seminara za medicinske radnike i saradnike.

Koautor je dva priručnika iz adiktologije i recezent nekoliko knjiga iz oblasti popularne psihologije i neurologije.

Saradnik je na nacionalnim i međunarodnim projektima iz oblasti bolesti zavisnosti pod pokroviteljstvom OUN Kancelarije za droge i kriminal i član ekspertskeg tima za Srbiju Evropskog centra za praćenje distribucije i monitoring konzumiranja droga.

PRILOZI

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Svetlana Vučetić-Arnić

broj upisa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

**UTICAJ ALUMINIJUMA NA STRUKTURNE I BIOHEMIJSKE
KARAKTERISTIKE MOZGA PUSTINJSKIH MIŠEVA**

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 24.06.2015.



Prilog 2.

**Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog
rada**

Ime i prezime autora: Svetlana Vučetić-Arsić

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada **UTICAJ ALUMINIJUMA NA STRUKTURNE I BIOHEMIJSKE
KARAKTERISTIKE MOZGA PUSTINJSKIH MIŠEVA**

Mentor **Prof. dr. Nataša Petronijević**

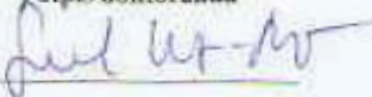
Potpisani **Svetlana Vučetić-Arsić**

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

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

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

U Beogradu, 24.06. 2015.

Potpis doktoranda


Prilog 3.

Izjava o korišćenju

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

UTICAJ ALUMINIJUMA NA STRUKTURNE I BIOHEMIJSKE KARAKTERISTIKE MOZGA PUSTINJSKIH MIŠEVA

koja je moje autorsko delo.

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

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

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

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

U Beogradu, 24.06. 2015.

Potpis doktoranda



1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.