

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

Ivana D. Guševac Stojanović

**REGIONALNO SPECIFIČAN  
NEUROPROTEKTIVAN EFEKAT  
PROGESTERONA U MODELU  
HIOPERFUZIJE MOZGA PACOVA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2020.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Ivana D. Guševac Stojanović

**REGIONALLY SPECIFIC  
NEUROPROTECTIVE EFFECT OF  
PROGESTERONE IN RAT CEREBRAL  
HYPOPERFUSION MODEL**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2020

## **MENTORI I ČLAN KOMISIJE**

### **Mentori:**

*dr Dunja Drakulić, viši naučni saradnik, Institut za nuklearne nauke „Vinča” - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Republika Srbija*

*dr Nadežda Nedeljković, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet, Beograd, Republika Srbija*

### **Član komisije:**

*dr Jelena Martinović, naučni saradnik, Institut za nuklearne nauke „Vinča” - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Republika Srbija*

*Datum odbrane:*

## ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija je izvedena u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju, Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ - Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, u okviru projekata OI 173044 i 41014 finansiranim od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Najpre bih se zahvalila **dr Anici Horvat** koja mi je otvorila vrata svoje laboratorije, pružila priliku da radim i dodatno razvijam svoje znanje i ukazala poverenje i razumevanje.

Veliku zahvalnost dugujem **dr Dunji Drakulić** koja je preuzela ulogu mentora u momentu kada je ova disertacija dospela u „ćorsokak“. Hvala na prijateljstvu, trudu, izdvojenom vremenu, pomoći u eksperimentalnom radu, prenesenom znanju i podstreku da ga i dalje nadograđujem.

Zahvaljujem prof. **dr Nadeždi Nedeljković** na svim korisnim sugestijama i pomoći, kako tokom doktorskih studija, tako i tokom pisanja same disertacije.

**Dr Jeleni Martinović** bih se zahvalila na podršci, konstruktivnim i dragocenim savetima, hvala što je bila divna koleginica, prijatelj, kao i član komisije.

Zahvalila bih se **dr Filipu Veljkoviću, dr Snežani Pejić, dr Ani Todorović, dr Dušku Blagojeviću i dr Suzani Veličković** na pruženoj eksperimentalnoj pomoći tokom izrade teze, kao i jednom od mojih najdražih prijatelja i kolega, **Nikoli Tataloviću**, ne samo na pomoći u izvođenju i tumačenju dela eksperimenata ove disertacije, nego i na tome što je uvek bio spreman da me sasluša i pomogne.

Kolegincama **dr Ivani Grković, dr Nataši Mitrović, dr Marini Zarić**, kao i kolegi **Miloradu Dragiću**, hvala na svim konstruktivnim predlozima, eksperimentalnoj pomoći, kao i na deljenju lepih, ali i teških trenutaka u našoj grupi. Zahvalila bih se na pomoći u eksperimentalnom radu i **dr Jovani Marić - Hamberger**, koja je, iako je kratko radila u našoj laboratoriji, veoma brzo postala iskren prijatelj. Hvala i **svim kolegama** Laboratorije za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ koji su na bilo koji način pomogli u izradi ove disertacije.

Izuzetno mi je drago što imam priliku da se na ovaj način zahvalim mom najboljem prijatelju, kumu i kolegi, **Željku Glumcu**, na bezmalo dve decenije najiskrenijeg prijateljstva, kolegijalnosti, beskrajnim razgovorima, smehu i što je predstavljao glas razuma i „rame za plakanje“ kada se stvari nisu odvijale onako kako sam planirala. Hvala na tehničkoj pomoći pruženoj prilikom izrade ove disertacije.

Hvala **svim mojim prijateljima** koji su bili uz mene tokom mog obrazovanja i pružali mi podršku.

Nema reči kojima bih se mogla dovoljno zahvaliti mojim roditeljima **Neveni i Draganu**, bratu **Nikoli**, kao i ostalim, **najužim članovima moje porodice**, za beskrajno strpljenje i razumevanje, za sva odricanja i ogromnu pomoć koju su mi pružali od početka mog školovanja, kao i za безусловno poverenje u moje procene i odluke.

Mom **Zoranu** najpre hvala na ljubavi, iskrenosti, strpljenju, razumevanju i podršci, ali i na kolegijalnosti i fenomenalnim idejama i savetima.

Na kraju, zahvalila bih se mojoj **Zoji** na tehničkoj pomoći u vidu odabira boja i šrafura za grafike, kao i na strpljenju, i izvinila za sate i sate oduzete od igranja i učenja koji su bili preusmereni na izradu ove doktorske disertacije!!! Stoga je njoj i posvećujem!

## **Regionalno specifičan neuroprotektivan efekat progesterona u modelu hipoperfuzije mozga pacova**

### **SAŽETAK:**

Pro-oksidativne i pro-apoptotske promene biomolekula, uključujući lipide, proteine i DNK, koje nastaju usled smanjenja protoka krvi kroz mozak (moždana hipoperfuzija, MH) za posledicu mogu imati narušavanje strukture i funkcije ćelija prečeoone moždane kore i hipokampusa. Do sada je testiran efekat brojnih jedinjenja kako bi se ublažile posledice MH, ali adekvatna terapija još uvek ne postoji. Steroidni hormon progesteron (P4) se nametnuo kao tretman u brojnim modelima neuroloških bolesti, jer smanjuje otok mozga, povećava motorne i kognitivne sposobnosti i drugo, koje nastaju usled oksidativnog/nitrozativnog stresa (OS/NS), prevazilaženja kapaciteta anti-oksidativne (AO) zaštite i apoptoze.

Za potrebe proučavanja efekata P4 u stanju eksperimentalno izazvane trajne MH, odrasli mužjaci pacova Wistar soja podeljeni su u tri grupe: lažno operisane jedinke injecirane lanenim uljem (1 mg/kg/7 dana, kontrole), jedinke sa podvezanim karotidnim arterijama injecirane lanenim uljem (1 mg/kg/7 dana) ili P4 (1.7 mg/kg/7 dana). Potencijalne promene su praćene pomoću odgovarajućih testova ponašanja, biohemijskih i histoloških metoda.

Analiza ispitivanih parametara ukazuje na to da je P4 sposoban da ublaži MH-izazvane poremećaje ponašanja, smanji obim ćelijske smrti i održi „normalnu“ morfologiju ćelija uočenu kod kontrola, kao i da regionalno-specifično moduliše indikatore OS/NS, pospeši AO i anti-apoptotsku odbranu delovanjem na enzimsku aktivnost, gensku i proteinsku ekspresiju. Predstavljeni rezultati mogu pružiti bazu za dalja ispitivanja koja bi upotpunila saznanja o efektima P4 u MH i sličnim povredama mozga.

**KLJUČNE REČI:** moždana hipoperfuzija, progesteron, oksidativni/nitrozativni stres, apoptoza/preživljavanje, pacov

**NAUČNA OBLAST:** Biologija

**UŽA NAUČNA OBLAST:** Neurobiologija

## **Regionally specific neuroprotective effect of progesterone in rat cerebral hypoperfusion model**

### **ABSTRACT:**

Pro-oxidative and pro-apoptotic modifications of biomolecules, including lipids, proteins and DNA, due to cerebral blood flow restriction (cerebral hypoperfusion, MH) may induce structural and functional alterations of prefrontal cortex and hippocampus cells. To date, the effect of a numerous compounds has been tested to mitigate the outcomes of MH, but adequate therapy does not yet exist. Steroid hormone progesterone (P4) has been used as a treatment in many neurological models since it reduces brain swelling, increases motor and cognitive abilities, etc, arised due to oxidative/nitrosative stress (OS/NS), deteriorated anti-oxidative (AO) capacity and apoptosis.

To study the effects of P4 in experimentally induced permanent MH, adult male Wistar rats were divided into three groups: sham operated animals injected with flaxseed oil (1 mg/kg/7 days, controls), animals with permanently occluded carotid arteries treated either with flaxseed oil (1 mg/kg/7 days) or P4 (1.7 mg/kg/7 days). Potential changes were monitored using appropriate behavioural tests, biochemical and histological methods.

The obtained results indicate that P4 is capable to ameliorate MH-induced behavioural disorders, reduce the extent of cell death and maintain "normal" cell morphology as observed in controls, as well as to modulate the action of tested OS/NS indicators, enhance AO and anti-apoptotic defence by acting on enzymatic activity, gene and protein expression in regional specific manner. Herein presented findings could provide a basis for further studies that would fulfill the knowledge of P4 outcomes in MH and similar brain insults.

**KEYWORDS:** cerebral hypoperfusion, progesterone, oxidative/nitrosative stress, apoptosis/cell survival, rat

**SCIENTIFIC FIELD:** Biology

**SCIENTIFIC SUBFIELD:** Neurobiology



# ***SADRŽAJ***

UVOD	1
1. Steroidni hormoni	2
1.1. Polni hormoni	2
1.1.1. Progesteron	2
1.1.2. Progesteronski receptori	2
1.1.3. Molekulski mehanizmi delovanja progesterona	3
1.1.4. Terapijski potencijal progesterona	4
1.2. Bolesti moždane cirkulacije i ćelijske patološke promene	5
1.2.1. Tipovi moždane ishemije	6
1.2.2. Osetljivost moždanih struktura na ishemiju	7
1.3. Oksidativni/nitrozativni stres	7
1.3.1. Komponente anti-oksidativne zaštite	10
1.4. Signalni putevi apoptotske kaskade	11
1.4.1. Unutrašnji (mitohondrijski) put pokretanja apoptoze	11
CILJ RADA	14
MATERIJALI I METODE	16
3.1. Materijali	17
3.2. Metode	20
3.2.1. Postupak sa životinjama	20
Eksperimentalne grupe, hirurške procedure i tretmani	20
3.2.2. Testovi ponašanja	21
Test prepoznavanja novog predmeta	21
Uzdignuti plus lavirint	21
Test otvorenog polja	21
3.2.3. Žrtvovanje životinja i priprema tkiva i uzoraka	22
3.2.3.1. Žrtvovanje životinja	22
3.2.3.2. Priprema homogenata celog tkiva, subćelijskih frakcija i uzoraka za potrebe analiza DNK fragmentisanosti, genske ekspresije i histološke analize	22
Izolovanje ukupnog ćelijskog ekstrakta	22
Priprema subćelijskih frakcija	22
Izolacija RNK i reakcija reverzne transkripcije	23
Izolacija uzoraka za određivanje nivoa fragmentisanosti DNK	23
Priprema uzoraka za histološke analize	23
3.2.4. Biohemijske analize	24
3.2.4.1. Određivanje koncentracije proteina	24
3.2.4.2. Određivanje promena ispitivanih parametara oksidativnog/nitrozativnog stresa i anti-oksidativne zaštite	24
3.2.4.2.1. Određivanje promena ispitivanih parametara oksidativnog/nitrozativnog stresa	24
Pro- i anti-oksidativni balans	24
Azot oksid	25
Produkti uznapredovale oksidativne modifikacije proteina	25
Produkti lipidne peroksidacije	26
Aktivnost ksantin-oksidge	26
3.2.4.2.2. Određivanje promena ispitivanih parametara anti-oksidativne zaštite	27
Aktivnost ukupne-superoksid dismutaze	27
Aktivnost mangan-superoksid dismutaze	27
Aktivnost bakar cink-superoksid dismutaze	28
Aktivnost katalaze	28
Aktivnosti glutation S-transferaze	28
3.2.4.3. Razdvajanje proteina na osnovu molekularskih masa i imunoblot analiza	29

Priprema uzoraka i SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza	29
Prenos proteina na poliviniliden fluoridnu membranu i imunoblot analiza	29
3.2.4.4. Kvantitativni PCR u realnom vremenu	30
3.2.4.5. Analiza fragmentisanosti ćelijske DNK pomoću difenilamin metode	30
3.2.5. Histološke analize- bojenje sa Fluoro-Jade C i tioninom	30
3.2.6. Statistička obrada rezultata	31
REZULTATI	32
4.1. Kognitivne i motorne sposobnosti pacova nakon hirurških intervencija i tretmana	33
4.2. Regionalno-specifične promene ispitivanih parametara oksidativnog/nitrozativnog stresa i komponenti anti-oksidativne zaštite pacova nakon hirurških intervencija i tretmana	34
4.2.1. Parametri oksidativnog/nitrozativnog stresa	34
4.2.2. Komponente anti-oksidativne zaštite	36
4.3. Regionalno-specifične promene ispitivanih parametara apoptotske signalne kaskade nishodno od progesteronskih receptora i procena nivoa i obima ćelijske smrti, kao i morfoloških karakteristika ćelija PFC i HIPP pacova nakon hirurških intervencija i tretmana	38
4.3.1. Ekspresija i subćelijska distribucija članova Bcl-2 familije	38
4.3.2. Ekspresija proteina citohrom C, kaspaza 3 i PARP	40
4.3.3. Ekspresija apoptotskih gena	42
4.3.4. Akt/Erk/eNOS/NO signalni put i ekspresija i distribucija PRA i PRB	43
4.3.5. Procena nivoa i obima ćelijske smrti, kao i morfoloških karakteristika ćelija PFC i HIPP	47
DNK fragmentacija	47
Histološke analize	47
DISKUSIJA	50
5.1. Regionalno-specifične promene parametara oksidativnog/nitrozativnog stresa i komponenti anti-oksidativne zaštite	51
5.2. Regionalno-specifične promene parametara apoptotske signalne kaskade nishodno od progesteronskih receptora	56
5.3. Morfološke karakteristike ćelija i nivo ćelijske smrti, kao i kognitivne i lokomotorne sposobnosti	58
ZAKLJUČAK	61
LITERATURA	65
PRILOG	80
Skraćenice	81
BIOGRAFIJA AUTORA	85
IZJAVA O AUTORSTVU	86
IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE DOKTORSKOG RADA	87
IZJAVA O KORIŠĆENJU	88

***UVOD***

## 1. Steroidni hormoni

Steroidni hormoni nastaju iz holesterola i uključeni su u pravilan razvoj i funkcionisanje organizma, odgovor na stres, rad mozga i različite metaboličke procese. Klasična podela ovih jedinjenja je na hormone kore nadbubrežne žlezde, u koje spadaju kortizol/kortikosteron (glukokortikoidi) i aldosteron (mineralokortikoidi), i polne hormone, među kojima se razlikuju muški, odnosno androgeni (testosteron i dihidrotestosteron/androsteron), i ženski (estrogeni i progestini/progestogeni).

### 1.1. Polni hormoni

Pored toga što regulišu polni razvoj i sazrevanje organizma, polni hormoni su neophodni i za normalno i polno-zavisno organizovanje mozga i ponašanje posredovano hipotalamo-hipofizno-gonadnom osom. Ove derivate sterola prevashodno sintetišu i luče gonade i adrenalne žlezde, ali i mozak gde *de novo* nastaju i nazivaju se neurosteroidi.

Rezultati mnogih studija su pokazali da su polni hormoni neophodni za preživljavanje neurona, kao i da svoje dejstvo ostvaruju u više regiona centralnog nervnog sistema (CNS) tokom normalnog razvića i starenja, dok je njihov poremećen nivo u pojedinim regionima uočen kod obolelih od neurodegenerativnih oboljenja. Kod starijih osoba se njihov nizak nivo povezuje sa smanjenjem neurogeneze, pogotovu u hipokampusu (lat. *hippocampus*, HIPPP), što za posledicu može imati smanjenje sposobnosti pamćenja koje je zavisno od godina, ali i poteškoće u izvršavanju pojedinih funkcija (Bahnasy i sar., 2018).

#### 1.1.1. Progesteron

Progesteron (P4, pregn-4-en-3,20-dion), najaktivniji prirodni progestogen, u mozgu potiče iz moždanih ćelija, ćelija kičmene moždine i perifernog nervnog sistema koje ga sintetišu direktno iz holesterola, ali i iz perifernih tkiva iz kojih se oslobađa u krv i tako dospeva do mozga. Zbog svoje lipofilne prirode lako prolazi kroz membrane ćelija, a efekte, bez obzira na pol, ostvaruje preko specifičnih receptora koji su prisutni u regionima mozga, kao što su HIPPP, kora prednjeg mozga (lat. *cortex cerebialis*) uključujući prečeonu moždanu koru (lat. *cortex praefrontalis*, PFC), hipotalamus, srednje bademasto jedro i druge (Brinton i sar., 2008). Regulišući ekspresiju gena, modulišući neurotransmittersku signalizaciju i manifestujući epigenetske aktivnosti, ali i pojačavajući efekte estrogena, ovaj steroidni hormon ispoljava mnoge reproduktivne i ne-reproduktivne funkcije, uključujući i regulaciju širokog spektra moždanih funkcija (Bahnasy i sar., 2018).

#### 1.1.2. Progesteronski receptori

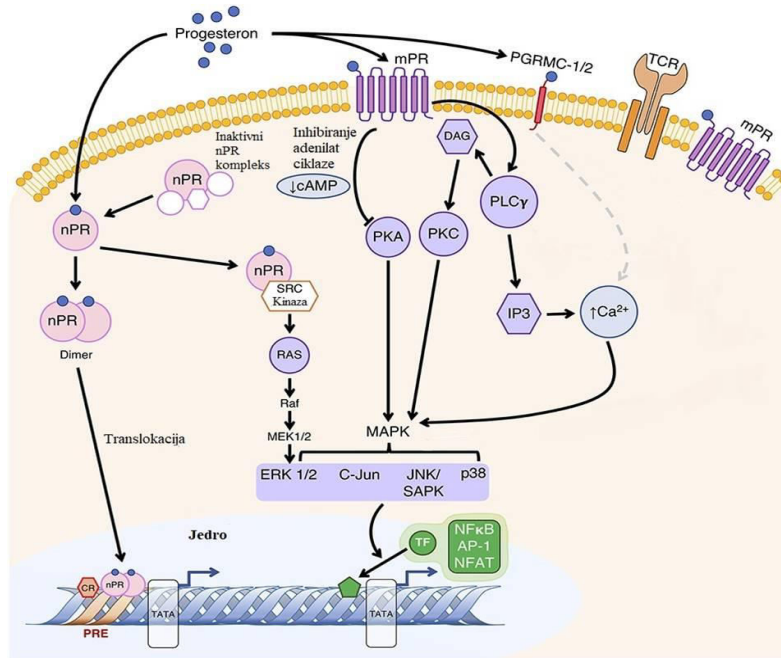
Progesteron se vezuje za tri tipa receptora (progesteronski receptor, PR): jedarne, transmembranske (mPR) i membranski vezane (komponenta 1 membranskog progesteronskog receptora, eng. *progesterone receptor membrane component 1*, PGRMC1).

- a) Jedarni (klasični) PR su otkriveni 70-tih godina prošlog veka, deluju kao ligand-inducibilni transkripcioni faktori, sa DNK-vezujućim domenom koji se nalazi između N-terminalnog regiona (poseduje aktivirajuće i inhibirajuće funkcije) i C-terminalnog ligand-vezujućeg regiona (Brinton i sar., 2008). Postoje dve izoforme- PRA (molekulske mase ~ 94 kDa) i PRB (molekulske mase ~ 120 kDa) koje kodira isti gen, ali se prepisuju sa različitim promotora.
- b) Transmembranski (mPR, odnosno, PAQR (progestin i adipoQ)) specifični receptori vezani za membranu, uključeni su u brze ne-genomske aktivnosti P4 (Brinton i sar., 2008; Garg i sar., 2017), uključujući kontrolu aktivnosti dopaminskog sistema i sistema  $\gamma$ -amino buterne kiseline (GABA) u mnogim regijama CNS (Berent-Spillson i sar., 2015).

c) PGRMC1 je lokalizovan uz membrane endoplazmatsičnog retikuluma i Goldži aparata i uključen je u aktivaciju mitogenom aktiviranih protein kinaza (MAPK) putem P4 (Garg i sar., 2017).

### 1.1.3. Molekulski mehanizmi delovanja progesterona

Progesteron može delovati na genomski i ne-genomski način (*Slika 1.*).



*Slika 1. Molekulski mehanizmi delovanja progesterona  
Preuzeto iz Shah i sar., 2019 i modifikovano*

- 1) Genomsko delovanje se odvija posredstvom dva jedarna PR (PRA i PRB) koji imaju sposobnost brzog premeštanja iz citosola u jedro. Nevezani receptori se nalaze u kompleksu sa šaperonskim molekulima, kao što su proteini toplotnog šoka (eng. *heat shock protein*, HSP) HSP40, HSP70 i HSP90. Po vezivanju liganda, receptori se oslobađaju od šaperonskih molekula, dimerizuju se i odlaze u jedro gde se vezuju za specifična palindromska DNK vezujuća mesta (eng. *progesterone response elements*, PRE) u promotorskim regionima gena, nakon čega se pokreće transkripcija (Brinton i sar., 2008).
- 2) Ne-genomski mehanizam posredovan je aktivacijom receptora na ćelijskoj membrani, citosolnih PR i/ili unutarćelijskom kaskadom preko sekundarnih glasnika. Naime, primećeno je da se nakon vezivanja P4 za mPR i citosolne PR menja prenos signala kroz ćeliju (Hagiwara i sar., 2016) time što se modulišu specifični signalni putevi i nastanak cAMP (ciklični adenozin-monofosfat), inhibira adenil ciklaza, reguliše transport vanćelijskog  $Ca^{2+}$ , i drugo (Boonyaratanakornkit i sar., 2001). Progesteron deluje kao pozitivni modulator GABA-A receptora, odnosno, kao inhibicioni steroid u nervnom tkivu (Garg i sar., 2017). Aktivacija PGRMC1 po vezivanju P4 putem signalne kaskade koja uključuje učešće kinaza regulisanih vanćelijskim signalima (eng. *extracellular-signal-regulated kinase*, Erk), odgovorna je za oslobađanje neurotrofnog moždanog faktora (eng. *brain derived neurotrophic factor*, BDNF), jednog od ključnih posrednika protektivnih osobina P4 (Singh i sar., 2013). Ovaj faktor podstiče preživljavanje neurona, deluje protivupalno, smanjuje neurotoksičnost, podstiče regeneraciju neurona i poboljšava kognitivne funkcije (Chen i sar., 2013). Ipak, iako P4 zavisna akcija može biti brza, nastale promene mogu biti jakog intenziteta i dugotrajne (Contrò i sar., 2015).

Utvrđeno je da unutarćelijski PR učestvuju u protektivnom delovanju P4 u eksperimentalnom modelu moždanog udara, time što se, između ostalog, aktivira MAPK koja dalje dovodi do

fosforilacije/aktivacije transkripcionih faktora, kao što su c-Fos, c-Jun i jedarni PR, što je neophodno za kontrolu transkripcije gena (Singh i sar., 2013). Osim toga, pokazano je da u mozgu PR mogu biti odgovorni i za ne-genomske učinke P4. Tako, humani PRB može stupiti u interakciju sa određenim domenom proto-onkogenske tirozinske kinaze (SRC) (Boonyaratanakornkit i sar., 2001), što ukazuje da citosolni PR mogu posredovati u brznoj P4–posredovanoj aktivaciji SRC i nizvodnih Erk i drugih kinaza nezavisno od njegove transkripcione aktivnosti.

#### 1.1.4. Terapijski potencijal progesterona

Progesteron ispoljava zaštitne efekte u mnogim životinjskim eksperimentalnim modelima kojima se oponašaju pojedini aspekti poremećaja rada mozga primećeni kod starijih ljudi i obolelih od neurodegenerativnih bolesti povezanih sa starenjem, poput Alchajmerove bolesti (AB). Tako, fiziološke koncentracije P4 značajno smanjuju oksidativne promene nastale usled ekscitotoksičnosti glutamata (Nilsen i Brinton, 2002a,b; Kaur i sar., 2007; Brinton i sar., 2008) i glukoze (Goodman i sar., 2002). Takođe, pokazano je da ovaj hormon štiti od toksičnosti izazvane  $\text{FeSO}_4^-$  i amiloid  $\beta$ -peptidom u kulturama HIPP (Goodman i sar., 2002). Upravo, smatra se da su brzi/neposredni, ali i dugoročni mehanizmi delovanja uključeni u zaštitne osobine P4 u različitim eksperimentalnim modelima (Singh i sar., 2013).

Jedan od modela u kojem je dokazano da P4 pokazuje zaštitne efekte je traumatska povreda mozga (TPM). P4 smanjuje moždani vazogeni i citotoksični otok (Roof i sar., 1997; Roof i Hall, 2000) i do 24 h nakon povrede (Singh i Su, 2013). Smatra se da u osnovi ovakvog efekta leže smanjenje nivoa akvaporina 4 (Guo i sar., 2006) i inhibicija rada  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, čime se menja nivo vazopresina (Schumacher i sar., 2007). Progesteron može smanjiti i nivo lipidne peroksidacije (LPO), nastale usled TPM, sprečavanjem stvaranja slobodnih radikala i povećanjem efikasnosti komponenti anti-oksidativnog (AO) sistema zaštite (Roof i sar., 1997), što može pomoći očuvanju integriteta membrane i stabilizaciji krvno-moždane barijere (KMB).

Progesteron ograničava apoptozu stabilizacijom mitohondrija i inhibicijom aktivnosti pro-apoptotskih enzima, kao i aktiviranjem anti-apoptotskih signalnih puteva (Djebaili i sar., 2004; 2005). Pri povredi medijalne čeonke kore glodara, P4 se opire efektima komponente komplekta C3 i nuklearnog faktora kapa B (Pettus i sar., 2005), što ukazuje na anti-inflamatorno dejstvo. Upravo, smanjenje upalnih procesa najverovatnije nastaje usled toga što P4 dovodi do smanjenja nivoa citokina i aktivacije i migracije imunskih ćelija (Nilsen i Brinton, 2002b; Djebaili i sar., 2004; Pettus i sar., 2005).

U animalnom modelu multiple skleroze, P4 inhibira mikrogliju pokrenutu faktorom nekroze tumora- $\alpha$ , što smanjuje degeneraciju i apoptozu neurona (Drew i Chavis, 2000). Pokazano je i da P4 deluje zaštitno kod kontuzija kičmene moždine, tako što smanjuje veličinu lezija i sprečava sekundarni gubitak neurona (Thomas i sar., 1999). Podstiče i morfološki i funkcionalni oporavak kičmene moždine Wobbler miševa u modelu neurodegeneracije (Gonzalez Deniselle i sar., 2002). Takođe, može uticati i na proces remijelinizacije, što se ogleda u pojačanoj ekspresiji proteina mijelina u oštećenom išijadičnom nervu mladih i odraslih pacova (Ibanez i sar., 2003). Ovo ukazuje da P4 može biti od potencijalne terapijske koristi kod bolesti kod kojih je demijelinizacija važan činioc patogeneze (Singh i Su, 2013).

U studijama moždanog udara, ovaj hormon se pokazao kao efikasan neuroprotektant. Tretman pre podvezivanja središnje moždane arterije dovodi do izrazitog smanjenja moždanog infarkta (Jiang i sar., 1996). Osim toga, primećeno je da i post-ishemijska primena P4 dovodi do zaštite (Singh i Su, 2013) i rezultuje poboljšanjima u izvođenju somatosenzornih i neuroloških testova (Chen i sar., 1999). I kod mačaka podvrgnutih moždanoj ishemiji je pokazano da su neurološke funkcije značajno poboljšane nakon primene P4, a broj preživelih neurona povećan (González-Vidal i sar., 1998). Takođe, ovaj steroid smanjuje i obim ćelijske smrti nakon ishemije (Cervantes i sar., 2002) usled sposobnosti da smanji nivo LPO (Roof i sar., 1997) i ekspresiju upalnih gena (Singh i Su, 2013). U modelu moždane ishemije kod miševa izazvane podvezivanjem zajedničkih karotidnih

arterija (eng. *two vessel occlusion*, 2VO), primećeno je da P4 ispoljava neuroprotektivna dejstva u akutnoj fazi, smanjenjem obima oštećenja (Aggarwal i sar., 2008).

## 1.2. Bolesti moždane cirkulacije i patološke promene na ćelijskom nivou

Neurodegenerativne bolesti nastaju kao posledica progresivnog odumiranja neurona u različitim regionima nervnog sistema, što može uzrokovati pojavu ne samo neuroloških, već i psiholoških poremećaja i simptoma. Najučestalije cerebrovaskularne bolesti su ishemija, demencija, vaskularna demencija (VAD), AB, Parkinsonova bolest (PB), Hantingtonova bolest i druge (Chung i sar., 2018). Obično se javljaju u starijem životnom dobu i povezuju se sa poremećajima cirkulacije usled čega je moždano tkivo nedovoljno snabdeveno kiseonikom i hranljivim materijama. Mogu nastati, između ostalog, zbog nemogućnosti srca da ispumpa dovoljno krvi u mozak usled začepjenja (eng. *occlusion*) i patološkog suženja (lat. *stenosis*) krvnih sudova, nepravilnog rada srca, trajnog niskog pritiska kao posledice srčanog udara ili urođenih srčanih mana, hirurških intervencija i ogromnog gubitka krvi, kao i zbog različitih oboljenja poput srpaste anemije, i drugog.

Povezuju se sa patološkim promenama u ćelijama CNS, poput:

- ✓ depolarizacije membrana neurona i glijskih ćelija (Katsura i sar., 1994);
- ✓ strukturnih i funkcionalnih oštećenja mitohondrija, usled čega se javlja energetska defecit koji se uočava kroz promene nivoa adenzin-trifosfata (ATP), adenzin-difosfata (ADP), adenzin-monofosfata (AMP), adenzina i fosfokreatina (Farkas i sar., 2007; Du i sar., 2017);
- ✓ oslobađanja ekscitatornih aminokiselina (glutamat i aspartat (Asp)) i kateholamina u vanćelijski prostor i poremećaja njihovog preuzimanja (Harukuni i Bhardwaj, 2006);
- ✓ strukturnih i funkcionalnih modifikacija glutamatnih receptora, što dalje narušava transport jona  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{K}^+$  (Katsura i sar., 1994; Harukuni i Bhardwaj, 2006) i vodi ka aktivaciji proteolitičkih enzima koji degraduju citoskeletne proteine, npr, aktin i spektrin, kao i proteine vanćelijskog matriksa, poput laminina (Chen i Strickland, 1997);
- ✓ stvaranja slobodnih radikala koji mogu nadvladati mehanizme AO zaštite, uzrokujući oštećenja lipida, proteina i DNK;
- ✓ inicijacije apoptotske signalne kaskade, koju karakteriše skupljanje ćelije, pupljenje membrane, kondenzacija hromatina, fragmentacija nukleozomne i jedarne DNK, što sve vodi ka formiranju apoptotskih tela (Bennett i sar., 1998);
- ✓ pokretanja upalnih procesa koji doprinose kognitivnom defecitu kod pacijenata obolelih od VAD (Du i sar., 2017), dok ishemija vodi ka „prilivu” upalnih ćelija, migraciji leukocita u mozak i aktivaciji mikroglije (Harukuni i Bhardwaj, 2006). Ipak, nije poznata uloga pojedinih citokina, imajući u vidu da su pokazana njihova dvostruka svojstva u mozgu pogođenom ishemijom, koja ujedno dovode do tolerancije, ali i ishemijske povrede mozga (Harukuni i Bhardwaj, 2006).



### 1.2.1. Tipovi moždane ishemije

Iako je u ovom momentu dostupno više modela moždane ishemije, oni u velikom broju slučajeva ne reflektuju u potpunosti promene koje se dešavaju u ljudskom organizmu, te se posebna pažnja mora obratiti na pravilan izbor životinjske vrste (**Tabela 1.**).

**Tabela 1.** Prednosti i mane korišćenja velikih i malih životinja

Velike životinje		Male životinje	
✓	✗	✓	✗
Pogodne za tehnike poput nuklearno magnetne rezonance	Velike razlike u stepenu oštećenja mozga	Lakše ih je čuvati i rukovati njima, a održavanje je jeftinije	Drugačija anatomija od ljudske
Lakše je izvaditi krv, izmeriti krvni pritisak, glukozu u krvi, mlečnu kiselinu, hemoglobin	Veća fiziološka variranja i stepen smrtnosti, održavanje je skuplje, rukovanje životinjama je zahtevnije	Genetički homogene (naročito miševi)	Nadgledanje fizioloških parametara je teže
Merenja se mogu vršiti istovremeno, u istoj životinji	Anestezija se mora dobro prilagoditi	Lakše izvođenje fiksacionih procedura, kao što su <i>in vivo</i> tehnike brzog zamrzavanja za biohemijske i neurohemijske analize	
Girencefalni mozak	Etička opravdanost	Etički prihvatljivije od upotrebe većih vrsta	Lizencefalni mozak

Moždana ishemija može biti:

- ❖ **fokalna** - nastaje usled drastičnog smanjenja cirkulacije u određenom regionu mozga, najčešće usled začepjenja krvnih sudova mozga prilikom tromboze ili embolije, što dovodi do moždanog udara. U tkivu se uočavaju dva karakteristična regiona, ishemijsko jezgro (region direktno pogođen ishemijom koji karakterišu nekroza, nedovoljna količina kiseonika, ATP i glukoze) i senka (lat. *penumbra*), region oko jezgra koji je posredno zahvaćen ishemijom i u kojem ćelije pretežno umiru procesom apoptoze) (Farkas i sar., 2007);
- ❖ **globalna** - nastaje kada se protok krvi kroz ceo mozak ili u određenim regionima mozga potpuno prekine (potpuna moždana ishemija) ili smanji (nepotpuna moždana ishemija). Vraćanje moždane cirkulacije na normalan nivo u kraćem vremenskom periodu čini nastale promene potencijalno reverzibilnim, međutim, brzo vraćanje, dovodi do većih oštećenja u poređenju sa onim nastalim usled same ishemije (Harukuni i Bhardwaj, 2006).

Globalna moždana ishemija može biti privremena ili trajna, zavisno od dužine trajanja ishemijske epizode. Privremena moždana ishemija je vremenski ograničeno delimično ili potpuno smanjenje protoka krvi kroz mozak. Najčešće nastaje kod osoba koje su podvrgnute operacijama srca, usled srčanog zastoja, gušenja, šoka (Harukuni i Bhardwaj, 2006) i može dovesti do nastanka znatnih neuroloških poremećaja, kao i do smrti. S druge strane, trajnu karakterišu dugotrajna umerena smanjenja moždane cirkulacije koja obično nastaju usled arterio-venoznih oštećenja, začepjenja ili sužavanja karotidnih arterija (Hossmann, 2006).

U eksperimentalnim uslovima, nepotpuna globalna moždana ishemija može biti nametnuta podvezivanjem:

- a) jednog krvnog suda (eng. *one vessel occlusion*, 1VO)– jedne zajedničke karotidne arterije čime se prate potencijalni poremećaji učenja i pamćenja, ali ne i histo-patološke promene u mozgu;
- b) dva krvna suda (2VO)– obe zajedničke karotidne arterije koje zajedno sa vertebralnim arterijama formiraju Vilis-ov krug, strukturu smeštenu u bazi lobanje.

Kod pacova, 2VO model predstavlja hirurški relativno jednostavnu proceduru sa manjim stepenom neurodegeneracije i većom stopom preživljavanja u odnosu na ostale dole navedene modele. Protok krvi kod pacova najviše je smanjen u kori i beloju masi prednjeg mozga (~ 40 % od kontrolnih vrednosti) i HIPP (~ 60 % od kontrolnih vrednosti), dok kičmena moždina, mali mozak i moždano stablo ne trpe oštećenja nastala ishemijom, jer vertebralne arterije nisu podvezane. Pomoću ovog modela, prate se promene nastale usled umerenog narušavanja moždane cirkulacije odnosno moždane hipoperfuzije (MH), a koja može biti odgovorna za memorijski deficit, pojavu i progresiju demencije. U zavisnosti od dužine trajanja, mogu se pratiti promene nastale privremenom ili trajnom MH (Farkas i sar., 2007);

- c) tri krvna suda (eng. *three vessel occlusion*, 3VO)– vertebralnih i karotidnih arterija u različitim kombinacijama (Liu i sar., 2012);
- d) četiri krvna suda (eng. *four vessel occlusion*, 4VO)– sve zajedničke karotidne i vertebralne arterije. Ovom metodom se kod pacova opšti protok krvi kroz mozak svodi gotovo na nulu i trajno oštećuju HIPP, kora prednjeg mozga i prugasto telo (lat. *corpus striatum*) u kratkom vremenskom periodu (Pulsinelli i Buchan, 1988).

### 1.2.2. Osetljivost moždanih struktura na ishemiju

Moždane strukture nisu podjednako osetljive na smanjenje protoka krvi. Smatra se da je HIPP struktura koja je najosetljivija na ishemiju i da kod obolelih od AB trpi najveća oštećenja. Oštećenje najpre zahvata CA1 i CA4 sektore (lat. *cornu Ammonis*, Amonov rog, CA), a zatim i subikulum. Osim HIPP i kora prednjeg mozga, pogotovu PFC, podložna je oštećenjima usled poremećaja cirkulacije koja odlikuje moždanu ishemiju. Tako, ćelije u III, V i VI sloju podležu oštećenju već nakon 4 min, dok CA3 sektor HIPP trpi promene 6 min nakon početka ishemije. Nešto veću otpornost pokazuju ćelije kaudoputamena kod kojeg se promene uočavaju nakon 8 do 10 min (Smith i sar., 1984). S druge strane, talamus je manje podložan ishemiji od kore prednjeg mozga, dok kičmena moždina ne trpi oštećenja čak ni ukoliko je mozak oštećen u znatnoj meri.

Jedan od razloga za nejednaku osetljivost struktura leži i u činjenici da različite populacije neurona i glijskih ćelija ispoljavaju razlike u osetljivosti, kao i specifičan metabolizam odgovara. Glijske ćelije pokazuju veću otpornost u odnosu na osetljivije neurone koji pokazuju „selektivnu ranjivost“. Naime, piramidni neuroni u slojevima III i VI u somatosenzornoj i auditornoj kori izuzetno su osetljivi na ishemiju, dok su neuroni u slojevima II, IV i V otporniji. Osim toga, više piramidnih ćelija umire u sloju III nego u sloju VI (Lin i sar., 1990).

### 1.3. Oksidativni/nitrozativni stres

Narušavanje moždane cirkulacije, nastalo usled starenja i/ili neurodegenerativnih oboljenja, regionalno-specifično oštećuje ćelije CNS. Trenutno je jedno od najpouzdanijih i najprihvatljivijih objašnjenja za mehanističku osnovu starenja „slobodno-radikalna teorija starenja“ koja postulira da je ono, i bolesti povezane sa njim, posledica oštećenja ćelijskih molekula izazvanih slobodnim radikalima i nemogućnošću uravnoteženja ovih promena unutrašnjom AO zaštitom (Vila i sar., 2007).

Slobodni radikali su male reaktivne vrste (joni, atomi i molekuli) koji konstantno nastaju u svim ćelijama kao rezultat normalnog ćelijskog metabolizma. U niskim koncentracijama su korisni i učestvuju u fiziološkim procesima, dok su u visokim koncentracijama štetni i izazivaju promene na ćelijskim komponentama, kao što su lipidi, proteini i DNK. Mogu biti egzogenog (alkohol, duvanski dim, lekovi, pesticidi, jonizujuće i UV zračenje, stres, teški metali i drugi) i/ili endogenog (ksantin-oksidaza (eng. *xanthine oxidase*, XOD), citohrom P-450 izoenzimi, i drugi) porekla (Weidinger i Kozlov, 2015; Poprac i sar., 2017). XOD katalizuje prelazak purinske baze u mokraćnu kiselinu, koristeći kiseonik kao akceptor elektrona, pri čemu nastaje superoksidni anjon

(Neogi i sar., 2012). Ovaj enzim odgovoran je i za hidroksilaciju N-heterocikličnih i aldehidnih supstrata, i inicijaciju reakcije peroksidacije lipida. Identifikovane su dve forme XOD, NAD<sup>+</sup>-zavisna ksantin-dehidrogenaza (eng. *xanthine dehydrogenase*, XDH) i O<sub>2</sub>-zavisna ksantin-oksidaža, koje reverzibilno pomoću reaktivatora sa sulfhidrilnim (SH) grupama, odnosno ireverzibilno putem proteolize, prelaze jedan u drugi (Wang i sar., 2017).

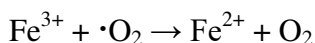
U fazi inicijacije, reaktivne vrste nastaju spontano i/ili indukovano nekim faktorom, tako što dolazi do homolitičkog cepanja veze u kojem svaki fragment zadržava po jedan elektron. Njihova reaktivnost, ali i nestabilnost i visok energetska potencijal potiču od barem jednog nesparenog elektrona u spoljnom elektronskom omotaču, koji odlikuje slobodna i vrlo nestabilna valenca. Zbog težnje da spare elektrone, ove vrste se lako, brzo, ali i nepredvidivo vezuju za okolne biomolekule pri čemu dolazi do burne lančane hemijske reakcije oksidacije i ulaska u fazu propagacije, koju prati pokretanje unutrašnjeg puta apoptoze (Belhadj Slimen i sar., 2014).

S obzirom na to da nespareni elektron može biti na atomima različitih elemenata, razlikuju se: reaktivne vrste kiseonika (eng. *reactive oxygen species*, ROS), reaktivne vrste azota (eng. *reactive nitrogen species*, RNS), reaktivne vrste hlora (eng. *reactive chlorine species*), reaktivne vrste broma (eng. *reactive bromine species*) i reaktivne vrste sumpora (eng. *reactive sulphur species*). U **Tabeli 2.** predstavljene su radikalske i neradikalske forme ROS i RNS (Rahman i sar., 2012).

**Tabela 2.** Slobodno radikalske i neradikalske forme reaktivnih vrsta kiseonika i azota  
Preuzeto iz Rahman i sar., 2012 i modifikovano

Radikalske vrste	Neradikalske vrste
<b>Reaktivne vrste kiseonika</b>	
superoksidni anjon, O <sub>2</sub> <sup>-</sup> hidroksilni radikal, OH <sup>•</sup> peroksilni radikal, RO <sub>2</sub> <sup>•</sup> alkoksilni radikal, RO <sup>•</sup> hidroperoksilni radikal, HO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	vodonik-peroksid, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> hipohlorna kiselina, HOCl ozon, O <sub>3</sub> singletni kiseonik, <sup>1</sup> O <sub>2</sub> organski peroksidi, ROOR' peroksinitrit, ONOO <sup>-</sup> peroksinitritna kiselina, ONOOH
<b>Reaktivne vrste azota</b>	
Azot-oksidi (azotmonoksidni radikal), NO <sup>•</sup> Azot-dioksidi (azotdioksidni radikal), NO <sub>2</sub> <sup>•</sup> nitratni radikal, NO <sub>3</sub>	azotasta kiselina, HNO <sub>2</sub> nitrozil-, NO <sup>+</sup> nitroksidni anjon, NO <sup>-</sup> azot oksid, NO azot(IV)-oksid, N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> azot(III)-oksid, N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> peroksinitrit, ONOO <sup>-</sup> peroksinitritna kiselina, ONOOH nitronijum (nitril), NO <sup>2+</sup> alkilperoksinitriti, ROONO nitril (nitronijum) hlorid NO <sub>2</sub> Cl

Tri glavne ROS forme su: O<sub>2</sub><sup>-</sup>, OH<sup>•</sup> i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O<sub>2</sub><sup>-</sup> nastaje dodavanjem jednog elektrona molekularnom kiseoniku u reakciji koja je katalizovana nikotin adenindinukleotid fosfat (NAD(P)H)-oksidazom, XOD ili elektron transportnim sistemom mitohondrija. Takođe, može nastati radom XOD i oksidaza u mitohondrijama i u peroksidomima korišćenjem molekularnog kiseonika u metaboličkim reakcijama (Hayyan i sar., 2016). U sukcesivnim reakcijama, Haber-Weiss-ovoj i Fenton-ovoj reakciji, u prisustvu metala, kao što su Fe<sup>2+</sup> ili Cu<sup>2+</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se razlaže na OH<sup>-</sup>, najreaktivniji ROS koji oštećuje proteine, lipide, DNK i druge biomolekule.



Haber-Weiss-ova reakcija



Fenton-ova reakcija

Osim oksidacije okolnih biomolekula, novonastali  $O_2^-$  i  $H_2O_2$  mogu delovati i kao sekundarni glasnici i stimulisati produkciju azot oksida (NO). NO je gas, rastvorljiv u vodi, bez mirisa sa prosečnim polu-životom od 3 do 5 sek, jer se brzo oksiduje u nitrite i nitrate (Weight i Nicholson, 1998). Iako se prvobitno verovalo da je toksičan, ispostavilo se da deluje i kao signalni molekul. Naime, pokazano je da NO koga proizvode aktivirani makrofagi, u reakciji sa gvoždem uglavnom mitohondrijskih proteina, igra važnu ulogu u regulaciji protoka krvi, sprečava lepljenje trombocita, deluje kao neurotransmiter i doprinosi primarnoj imunnoj zaštiti (Levine i sar., 2012). S druge strane, toksičnost NO se obično javlja usled direktnog stupanja u interakciju sa različitim proteinskim grupama što može dovesti do reverzibilnog formiranja disulfida između cisteina (Cys) i glutationa, tzv. S-glutationa (Cohen i Adachi, 2006), formiranja nitrozotiola (Stamler, 1994) ili nitrozilacije proteina (Matsushita i sar., 2003). Toksičnost može nastati i usled formiranja  $ONOO^-$ , jakog oksidanta i medijatora povrede tkiva (Dawson i Dawson, 1996). NO, takođe, može izazvati apoptozu direktno ili preko  $ONOO^-$  (Leist i sar., 1997). Pored ovih direktnih akcija, NO može pokrenuti unutarćelijsku signalizaciju aktiviranjem rastvorljive guanil ciklaze i naknadnim formiranjem cikličnog guanozin-monofosfata (cGMP). Kod sisara, NO može nastati radom tri izoforme enzima NO-sintaze (NOS): nervne (nNOS), inducibilne (iNOS) i endotelne (eNOS). Svi NOS proteini su homodimeri i vezuju se za kalmodulin, sadrže hem i koriste L-arginin i molekularni kiseonik kao supstrat i NADPH kao ko-substrat.

- ✓ nNOS je uključen u modulisanje fizioloških funkcija, kao što su učenje, pamćenje, neurogeneza (Zhou i Zhu, 2009) i regulacija krvnog pritiska (Togashi i sar., 1992). Prekomerna aktivnost nNOS izazvana ulaskom  $Ca^{2+}$  u nervne ćelije je povezana sa smrću neurona posredovanom aktivnošću receptora osetljivih na N-metil-D-aspartat (Forstermann i Sessa, 2012);
- ✓ iNOS nije konstitutivno ekspimiran u ćelijama, ali njegova sinteza može biti pokrenuta bakterijskim lipopolisaharidom, citokinima i drugim agensima. Jednom ekspimiran, iNOS je stalno aktivan i nije regulisan koncentracijom unutarćelijskog  $Ca^{2+}$  (Forstermann i Sessa, 2012);
- ✓ eNOS je najviše prisutan u endotelnim ćelijama gde učestvuje u očuvanju proširenosti krvnih sudova, kontroli krvnog pritiska i ima anti-sklerotične efekte. Može se naći i u miocitima srca, krvnim pločicama, neuronima i drugim ćelijama. Za regulaciju eNOS aktivnosti neophodan je  $Ca^{2+}$  aktivirani kalmodulin, a sa porastom unutarćelijskog  $Ca^{2+}$  raste i njegova aktivnost (Hemmens i Mayer, 1998). Aktivnost eNOS je, između ostalog, regulisana i fosforilacijom enzima (Fleming i Busse, 2003) na serinskim (Ser), treoninskim (Thr) i tirozinskim (Tyr) reziduama. Fosforilacija na  $Ser^{1177}$  pospešuje osetljivost enzima na  $Ca^{2+}$  i predstavlja dodatni mehanizam aktivacije eNOS (Fleming i Busse, 2003). Smatra se da P4 utiče na eNOS kako genomski, tako i ne-genomskim mehanizmom. Naime, pokazano je da P4 ostvaruje brze efekte u ćelijama fosforilišući eNOS na  $Ser^{1177}$  i to aktiviranjem kinaza, PI3/Akt i Erk1/2 (Khorram i Han, 2009). Treba istaći da se  $Thr^{495}$  fosforiliše u fiziološkim uslovima, najverovatnije posredstvom protein kinaze C. Fosforilacija  $Thr^{495}$  ometa vezivanje kalmodulina za svoje vezujuće mesto, a defosforilacija koja se javlja u patofiziološkim uslovima je povezana sa stimulusima koji povećavaju unutarćelijsku koncentraciju  $Ca^{2+}$  i povećavaju aktivnost eNOS (Forstermann i Sessa, 2012). Više kalmodulina se vezuje kada se  $Thr^{495}$  defosforiliše (Fleming i Busse, 2003) što dovodi do razilaženja eNOS kompleksa.

U patološkim uslovima, prekomerno nastali ROS/RNS, između ostalog, stupaju u interakciju sa lipidima i iniciraju LPO. Produkti LPO mogu nastati enzimskim ili ne-enzimskim putem, a svoje efekte mogu ostvariti na više načina. Osim toga što imaju ulogu signalnih molekula i deluju kroz post-translacione modifikacije proteina, najčešće oksiduju polinezasićene masne kiseline (eng. *poly unsaturated fatty acids*, PUFAs) dugačkih lanaca koje imaju više od jedne dvostruke veze, poput linoleinske i arahidonske kiseline. Budući da su lipidi odgovorni za održavanje integriteta ćelijskih membrana, njihova peroksidacija menja sastav, strukturu i dinamiku membrana. Kao visoko reaktivna jedinjenja, produkti LPO su, takođe, u stanju da propagiraju dalji nastanak ROS/RNS ili

se razgrađuju u reaktivna jedinjenja sposobna da umrežavaju proteine i DNK (Gaschler i Stockwell, 2017), kao i da oksiduju bočne lance aminokiselinskih ostataka (pri čemu su Cys i metioninske rezidue izuzetno osetljive), menjaju električnu šaržu, oksiduju okosnice proteina što rezultira njihovom fragmentacijom (Kelly i Mudway, 2003; Frijhoff i sar., 2015).

### 1.3.1. Komponente anti-oksidativne zaštite

Anti-oksidanti su jedinjenja/molekuli kojima se značajno smanjuje, onemogućava i neutrališe oksidacija supstrata, odnosno biomolekula. Osim toga, pojedini anti-oksidanti učestvuju i u popravljanju oštećenja nastalih delovanjem reaktivnih vrsta. Prisutni su u svim ćelijama u manjoj koncentraciji u odnosu na supstrat i odgovorni su za održavanje normalne fiziološke funkcije ćelije. Svoje funkcije ostvaruju tako što se ponašaju kao „hvatači“ slobodnih radikala, supresori katalitičke funkcije jona metala u procesima degradacije lipidnih molekula, nastanka i dejstva reaktivnih vrsta, inhibitori nekih enzima, itd (Rajendran i sar., 2014).

Prema načinu delovanja razlikuju se: preventivni anti-oksidanti koji onemogućavaju nastanak reaktivnih vrsta (oksihemoglobin u eritrocitima, proteini feritin, transferin, ceruloplazmin i metalotionein), „hvatači“ koji vezuju reaktivne vrste i tako ih uklanjaju (mali molekuli: vitamin C, vitamin E, ubikinon-10, urat i glutation (GSH)) i reparacioni koji su odgovorni za popravku i/ili uklanjanje već oštećenih biomolekula (fosfolipid-zavisna glutation-peroksidaza (GPx), fosfolipaza A2, glikozilaze, DNK-ligaze i DNK-polimeraze) (Valko i sar., 2016; Poprac i sar., 2017).

Prema prirodi anti-oksidanti se dele na:

a) **enzimske** (primarna linija odbrane) koji su odgovorni za razlaganje i uklanjanje slobodnih radikala. U prisustvu kofaktora (bakar, cink, mangan i gvožđe) u nekoliko koraka, oni konvertuju štetne oksidativne produkte do  $H_2O_2$ , a potom i do  $H_2O$ . U ovu grupu ubrajaju se: superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), GPx, glutation-reduktaza i glutation S-transferaza (GST) (Attia i sar., 2012).

- ✓ **SOD** je jedan od glavnih enzima zaštite ćelije od oksidativnih oštećenja i ključnih parametara AO zaštite (Đorđević i sar., 2000). Svoje dejstvo ostvaruje katalizom dismutacije visoko reaktivnog  $O_2^{\cdot-}$  u manje reaktivan  $H_2O_2$  i  $O_2$ . Kod eukariota se razlikuju tri izoforme ovog metaloproteina: bakar, cink zavisna SOD (CuZnSOD), mangan zavisna SOD (MnSOD) i vanćelijska-SOD. Iako je princip reakcije za sve tri izoforme isti, one se međusobno razlikuju po prelaznom metalu (bakar, cink i mangan) koji se nalazi u aktivnom centru, molekulskoj masi (32 kDa CuZnSOD, 23 kDa MnSOD i 135 kDa vanćelijska-SOD), lokalizaciji u ćeliji (citosol, mitohondrije, vanćelijski prostor i drugo), ali i mehanizmima regulacije i ulozi koju imaju u specifičnim fiziološkim i patološkim procesima (Che i sar., 2016).

*CuZnSOD* (citosolna SOD1) je prva identifikovana SOD izoforma, ujedno i glavna unutarćelijska SOD. Nalazi se u citosolu i u manjoj meri u međumembranskom prostoru mitohondrija, ali može se naći i u jedru, lizozomima i peroksidomima. U AO zaštiti, CuZnSOD ima dvostruku ulogu, osim što uklanja  $O_2^{\cdot-}$ , ponaša se i kao ćelijski pufer za jone bakra (Valko i sar., 2016).

*MnSOD* (mitohondrijska SOD2) nalazi se u matriksu mitohondrija (Fridovich i Freeman, 1986). Sintetiše se u citoplazmi, a u mitohondrije se usmerava signalnim peptidom gde je uključena u dismutaciju  $O_2^{\cdot-}$ .

- ✓ **CAT** ili  $H_2O_2$  oksido-reduktaza je detektovana u jetri i bubrezima, manje u vezivnim tkivima i izuzetno malo u nervnom tkivu. U većini ćelija nalazi u mitohondrijama i peroksidomima, osim u eritrocitima gde se nalazi u citosolu i uključena je u razlaganje neradikalnog  $H_2O_2$ , koji se stvara tokom ćelijskog metabolizma, do  $H_2O$ . Reakcija se uspešno ostvaruje samo ako je enzim u tetramernoj strukturi i u prisustvu visokih koncentracija  $H_2O_2$ . Bez obzira na koncentraciju  $H_2O_2$ , CAT ne može da bude zasićena svojim supstratom, već njena enzimaska

aktivnost raste linearno sa porastom koncentracije  $H_2O_2$ . Izmenjena aktivnost i narušena ekspresija ovog enzima leže u osnovi molekulskih mehanizama upale, mutageneze, apoptoze, i drugih (Đorđević i sar., 2000).

- ✓ GST pripada grupi enzima koji su prisutni slobodni u citosolu ili vezani za membranu ćelija jetre, pluća, bubrega, eritrocita, leukocita i testisa. GST, koja se ponaša kao ne-selenski zavisna GPx, katalizuje konjugaciju redukovanog GSH, preko SH grupa, sa unutarćelijskim elektrofilnim produktima OS. Kroz formiranje hidrofилnih metabolita koji se izbacuju iz organizma, ovaj enzim učestvuje u njegovoj detoksikaciji. Povećana aktivnost GST zavisi, između ostalog, i od ROS nastalih u redoks ciklusu (Espinosa-Diez i sar., 2015), što predstavlja adaptivni mehanizam na povećan nivo OS, jer ovaj enzim u ćeliji uklanja nastale toksične karbonilne, peroksidne i epoksidne proizvode. Osim toga, GST učestvuje i u transportu i sintezi pojedinih jedinjenja, ali i vezivanju steroida, metabolita i lekova (Singh, 2015).

- b) ne-enzimske (sekundarna linija odbrane) uključuju komponente male molekulske težine koji mogu biti liposolubilne i hidrosolubilne prirode. Liposolubilne vrste, poput vitamina A i E,  $\beta$ -karotena, koenzima Q, flavonoida i drugih fenola, svoje dejstvo ostvaruju u lipidnoj fazi ćelijske membrane i membranama unutarćelijskih organela, kao i unutar serumskih lipoproteina. U hidrosolubilne spadaju vitamin C, mokraćna kiselina, ceruloplazmin, GSH, transferin, i drugi. Delujući u vodenoj fazi, oni reaguju sa liposolubilnim anti-oksidantima na graničnoj površini membrana (Masella i sar., 2005).

Ukoliko se ravnoteža u ćeliji između pro-/anti-oksidanata pomeri u pravcu pro-oksidanata, javlja se oksidativni/nitrozativni stres (OS/NS) koji doprinosi razvoju mnogobrojnih patoloških stanja, kao što su neurodegenerativni poremećaji, autoimuna oboljenja, kancer, neurološki poremećaji, ateroskleroza, hipertenzija, ishemija/reperfuzija, dijabetes, astma (Đorđević i sar., 2000; Kašparová i sar., 2005).

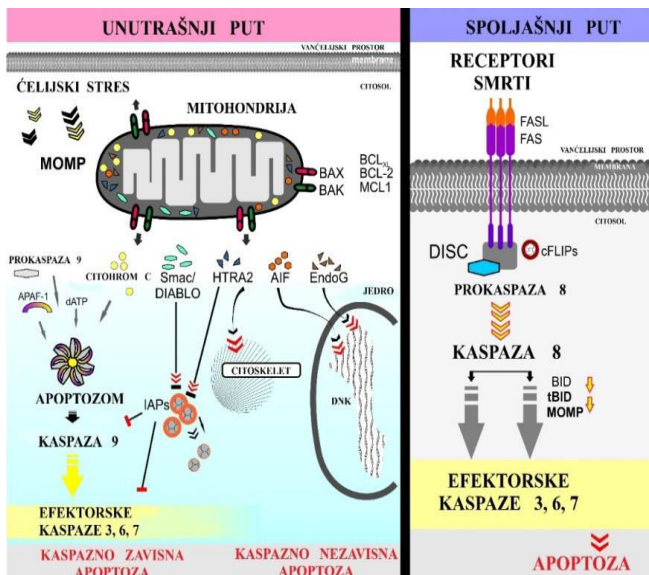
## 1.4. Signalni putevi apoptotske kaskade

Apoptoza ili „programirana ćelijska smrt” je energetski zavisna i strogo kontrolisan proces, koji se nalazi u osnovi brojnih fizioloških, ali i velikog broja patoloških stanja uključujući mnoge neurodegenerativne i autoimune bolesti, ishemijska oštećenja, i drugo. Može nastati kao posledica OS (Elmore, 2007). Postoje dva glavna načina pokretanja apoptoze, spoljašnji (pokreće se vezivanjem liganda za receptore smrti) i unutrašnji (mitohondrijski put koji se pokreće unutarćelijskim signalima). Ipak, postoje saznanja da se, bez obzira na poreklo signala, ova dva puta ukrštaju na nivou proteolitičkih enzima, kaspaza (eng. *cysteine asparty specific proteases*) (Elmore, 2007).

### 1.4.1. Unutrašnji (mitohondrijski) put pokretanja apoptoze

Unutrašnji put može biti aktiviran negativnim (odsustvo faktora rasta, hormona, citokina) ili pozitivnim (radijacija, toksini, hipoksija, hipertermija, virusne infekcije i slobodni radikali) signalima. Ovi signali dovode do formiranja pora na unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani, gubitka membranskog potencijala i oslobađanja pro-apoptotskih proteina iz međumembranskog prostora u citosol (Saelens i sar., 2004) (*Slika 2.*). Imajući u vidu da se regulacija njegovog pokretanja odvija posredstvom Bcl-2 (eng. *B-cell lymphoma 2*) familije proteina, ovaj put se naziva i „Bcl-2“ kontrolisani put.





**Slika 2.** Spoljašnji i unutrašnji put pokretanja ćelijske smrti. Preuzeto sa <https://www.alga.cz/en/c-507-apoptosis-inductors.html> i modifikovano

U fiziološkim uslovima Bcl-2 i Bcl-x<sub>L</sub> se nalaze u membrani jedra i endoplazmatskog retikuluma, kao i u međumembranskom prostoru mitohondrija gde regulišu propustljivost mitohondrijskih pora i sprečavaju izlazak apoptogenih faktora, kao što su citohrom C (CitC) (Liu i sar., 1996) i faktor indukcije apoptoze (eng. *apoptosis inducing factor*, AIF). Osim toga, ovi molekuli sprečavaju premeštanje Bax i drugih pro-apoptotskih molekula iz citosola ka mitohondrijama i Bax/Bak oligomerizaciju u mitohondrijskoj membrani. U apoptotskim uslovima, Bax i Bak se premeštaju ka mitohondrijama, oligomerizuju se i formiraju pore na spoljašnjoj membrani mitohondrija na Ca<sup>2+</sup>-zavisan način što omogućava oslobađanje CitC iz unutarmembranskog prostora mitohondrija u citosol.

CitC ima ključnu ulogu u procesima apoptoze i oksidativne fosforilacije. Nakon sinteze u citoplazmi, premešta se u mitohondrije gde se vezuje za kardiolipin koji se nalazi na njihovoj unutrašnjoj strani (Vladimirov i sar., 2018). Usled pro-apoptotskog signala, CitC se oslobađa u citosol, vezuje se i aktivira APAF-1 (eng. *apoptotic protease activating factor 1*, faktor aktivacije apoptotičnih proteaza 1), kao i prokaspazu 9 i formira „apoptozom“. Komplex kaspaza 9/apoptozom pokreće efektorsku kaspazu 3 i ćeliju uvodi u „tačku bez povratka“, odnosno u apoptotsku smrt (Elmore, 2007). Upravo, kaspaza 3 je okarakterisana kao najznačajnija egzekutorska kaspaza, koja se aktivira inicijatorskim kaspazama 8, 9 ili 10. Zimogen kaspaze 3 je protein od 32 kDa, a nakon apoptotskog signala se seče na dve subjedinice od 17 i 12 kDa. Po aktiviranju, kaspaza 3 seče strukturne, signalne proteine, regulatore replikacije, transkripcije i translacije, regulatore apoptoze i mnoge druge. Sečenje može izazvati aktivaciju dormantnih, pro-apoptotskih proteina ili inaktivaciju proteina ključnih za preživljavanje kao što su lamin, aktin i PARP (eng. *poly(ADP-ribose) polymerase*, poli(ADP-riboza)-polimeraza) što može uvesti ćeliju u proces dezintegracije u apoptotska tela (Elmore, 2007).

PARP-1 je jedarni enzim koji učestvuje u reparaciji oštećene DNK i transkripciji, i ima ulogu u vazokonstrikciji, regulisanju astrocitne i mikroglijalne funkcije, dugotrajnoj memoriji i starenju (Sung i Ambron, 2004). Aktivacija PARP odigrava se kada na DNK nastanu jednolančani prekidi izazvani različitim stimulusima. Po detekciji jednolančanog prekida, PARP se vezuje za DNK, konformacijski se menja i započinje sintezu poli(ADP-riboza) lanca što predstavlja signal za uključivanje drugih DNK enzima neophodnih za popravku, kao što su DNK-ligaza III, DNK-polimeraza β i „proteini skele“ uz korišćenje βNAD<sup>+</sup> (β-nikotinamid adenin dinukleotid) (Soldani i Scovassi, 2002). PARP-1 se u patološkim stanjima seče kaspazom 3 na Asp<sup>214</sup> i glicinu (Gly)<sup>215</sup>, pri

Članovi Bcl-2 familije mogu biti podeljeni na osnovu funkcije na pro- i anti-apoptotske. Ovi proteini imaju jedan ili više evolutivno konzerviranih Bcl-2 homolognih (BH) domena koji su neophodni za dimerizaciju sa drugim proteinima ove familije, a čime se kontroliše njihova aktivnost (Danial i Korsmeyer, 2004).

- Anti-apoptotski proteini- Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> (eng. *Bcl-extralong*) i Bcl-w (eng. *Bcl-2-like protein 2*), kao i Mcl-1 (faktor-1 leukemije mijeloidne ćelije).
- Pro-apoptotski proteini- Bax (eng. *Bcl-2 associated X protein*), Bak (eng. *Bcl-2 antagonistic killer*), Bim (eng. *Bcl-2 interacting mediator of cell death*), Bad (eng. *Bcl-2 antagonist of cell death*) i Bid (eng. *Bcl-2 interacting domain death agonist*) (Tsujiimoto, 1998).

čemu nastaju dva fragmenta, molekulske mase 89 kDa (koji sadrži auto-modifikacioni i katalitički domen) i 24 kDa sa DNK vezujućim domenom (Chaitanya i Babu, 2008). Nakon sečenja, PARP-1 gubi svoju sposobnost za prepoznavanje prekida i postaje neaktivan u prisustvu oštećenja DNK što sprečava korišćenje NAD<sup>+</sup> (Soldani i Scovassi, 2002).

Erk1/2 (Erk44/42 kDa) imaju ulogu u regulaciji brojnih funkcija mozga odraslih jedinki (Kim i Choi, 2010). Nakon aktivacije, Erk1/2 mogu se translocirati u jedro i aktivirati veliki broj transkripcionih faktora ili mogu ostati u citosolu gde regulišu druge ćelijske procese. Poremećaj signalizacije posredovane Erk1/2, dovodi se u vezu sa nekoliko bolesti, kao što su moždani udar i AB (Zhu i sar., 2001; Shioda i sar., 2009). Iako je aktivacija Erk1/2 generalno povezana sa diferencijacijom, proliferacijom ćelija mozga poput neurona, oligodendrocita i astrocita i pokretanjem signalne kaskade odgovorne za preživljavanje ćelija, brojne studije su pokazale da aktivacija može posredovati i u gubitku funkcije, ali i smrti neurona (Namura i sar., 2001; Arai i Lo, 2009; Subramaniam i Unsicker, 2010; Zhao i sar., 2012). S druge strane, uočeno je da ovaj signalni molekul doprinosi regulaciji inflamatornih odgovora, citokina, ćelijske apoptoze u ishemičnoj i hemoragičnoj povredi mozga (Feld i sar., 2014; Zhao i sar., 2017; Chen i sar., 2019). Različiti efekti Erk1/2 mogu biti posledica različitih stimulusa i tipova ćelija koje su uključene u odgovor.

Akt je Ser/Thr kinaza koja pripada superfamiliji protein kinaza, uključujući cAMP-zavisnu protein kinazu A/protein kinazu G/protein kinazu C (AGC). Kod sisara su do sada nađena tri Akt/PKB gena: PKB $\alpha$ /Akt1 (Jones i sar., 1991), PKB $\beta$ /Akt2 (Cheng i sar., 1992) i PKB $\gamma$ /Akt3 (Brodbeck i sar., 1999). PKB $\alpha$ /Akt1 i PKB $\beta$ /Akt2, sadrže dva regulatorna mesta fosforilacije, Thr<sup>308</sup> i Ser<sup>473</sup>. Fosforilacija Thr<sup>308</sup> delimično aktivira Akt/PKB, dok je fosforilacija oba mesta potrebna za punu aktivaciju (Alessi i sar., 1996). Akt signalni put je prepoznat i kao jedan od najkritičnijih puteva u regulaciji preživljavanja ćelija. Aktivacija ovog puta obezbeđuje ćelijama signal za preživljavanje koji je neophodan da se odupru pro-apoptotskim stimulusima (Yao i Cooper, 1995). Osim toga, ovaj signalni put je odgovoran za fosforilaciju pro-apoptotskog proteina Bad na Ser<sup>136</sup> i utišavanje njegove pro-apoptoske aktivnosti (Peso, 1997), dok fosforilacija kaspaze 9 na Ser<sup>196</sup>, posredovana Akt putem slabi njenu aktivnost (Donepudi i Grütter, 2002).



***CILJ RADA***

Moždanu hipoperfuziju karakterišu brojni neurološki deficiti i progresivno narušavanje kognitivnih i motornih sposobnosti usled nedovoljnog snabdevanja tkiva glukozom i kiseonikom. U tom stanju se, usled povećanog nivoa OS/NS i smanjenog kapaciteta odgovora komponenti AO zaštite, prekomerno stvaraju ROS/RNS koji sa visokim afinitetom reaguju sa lipidima, proteinima i DNK. Time remete strukturu i funkciju neurona i glijskih ćelija u mozgu, što za posledicu može imati pokretanje apoptotske signalne kaskade i finalno, njihovu smrt. Iako brojni literaturni podaci ukazuju na sposobnost P4 da u različitim patološkim stanjima reguliše protok krvi kroz mozak, smanji otok i oštećenje tkiva i ubrza oporavak, informacije o njegovim efektima u stanju MH koja je karakteristična za patofiziološka stanja, poput staračke demencije, VAD i AB, su oskudne. Stoga, cilj ove doktorske disertacije je pružanje jasnijeg uvida u mehanizme dejstva P4 u uslovima nametnute trajne MH kod odraslih mužjaka pacova Wistar soja, kao i ispitivanje razlika odgovora PFC i HIPP, u zadatim eksperimentalnim uslovima.

U skladu sa navedenim ciljem, praćen je efekat P4 u stanju nametnute trajne MH na:

- a) kognitivno i lokomotorno ponašanje;
- b) pojedinačne parametre OS/NS i komponente AO zaštite u moždanim strukturama PFC i HIPP;
- c) ekspresiju proteina i gena uključenih u signalne kaskade i apoptotske puteve aktivirane OS/NS nishodno od PRA i PRB, kao i na citomorfološke karakteristike i nivo ćelijske smrti u moždanim strukturama PFC i HIPP.

Saznanja proistekla iz ove studije bi mogla poslužiti kao osnova za razvijanje novih farmakoloških pristupa, čime bi se popravio kvalitet života obolelih.

***MATERIJALI***  
***I***  
***METODE***

### 3.1. Materijali

U eksperimentalnoj postavci ove doktorske disertacije, korišćene su hemikalije p.a. stepena čistoće, prikazane u **Tabeli 3.**, kao i primarna i sekundarna antitela za imunoblot analizu predstavljena u **Tabeli 4.**, dok su „prajmeri” za kvantitativni PCR u realnom vremenu (eng. *real time quantitative PCR*, RTqPCR) nabavljeni od firme Metabion, Nemačka (**Tabela 5.**).

**Tabela 3.** Hemikalije korišćene u eksperimentima i njihovi proizvođači

PROIZVOĐAČ	HEMIKALIJE
<b>SERVA</b> (Nemačka)	Tris baza, glicin, agaroz, N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED), dietil pirokarbonat (DEPC), spermin, spermidin, aprotinin, antipain, leupeptin, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB), N-hloro-p-toluensulfonamid natrijum (hloramin T), 1,1,3,3-tetrametoksi propan (TMOP), dimetilsulfoksid (DMSO), kalijum-jodid, vodonik-peroksid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), natrijum-hidroksid, mokraćna, hlorovodonična, metasulfonska i glacijalna (sirćetna) kiselina
<b>Sigma Chemical Company</b> (SAD)	Pregn-4-en-3,20-dion (P4), goveđi serumski albumin (eng. <i>bovine serum albumin</i> , BSA), sulfanilamid, N-(1-Naftil)etilendiamin dihidrohlorid, natrijum dodecil sulfat (SDS), Tween-20, saharoz, β-merkaptioetanol, fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF), natrijum-fluorid, etilendiaminotetrasirćetna kiselina (EDTA), ditiotreitol (DTT), etilenglikol-bis (2-aminoetiletar)-N,N,N',N'-tetra sirćetna kiselina (EGTA), adrenalin, akrilamid, Folin-Ciocalteu reagens, DPX, difenilamin (DPA), Eukitt®, ksilol, 1-hloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB), 1-metil-2-fenilindol, acetonitril
<b>EMD Millipore Corporation</b> (SAD)	Fluoro-Jade C (FJC), poliviniliden fluorid (PVDF) membrana, 20 × koncentrovani supstrat za hemiluminiscenciju (eng. <i>enhanced chemiluminescence</i> , ECL)
<b>Santa Cruz Biotechnology, Inc</b> (SAD)	Suvo bezmasno mleko (eng. <i>non-fat milk</i> , NFM)/Blotto, Marker™Molecular Weight Standards (9 proteina različitih molekulskih masa (250 kDa, 130 kDa, 95 kDa, 72 kDa, 55 kDa, 36 kDa, 28 kDa, 17 kDa i 11 kDa))
<b>Invitrogen</b> (SAD)	TRIzol reagens
<b>Applied Biosystems</b> (SAD)	High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, „SYBR green“ kit (Power SYBR Green PCR Master Mix)
<b>Roche</b> (Švajcarska)	Inhibitori proteaze i fosfataze
<b>Pierce Biotechnology</b> (SAD)	Inhibitorji proteaze i fosfataze
<b>Acros Organics</b> (Belgija)	Peroksidaza

**Tabela 4.** Antitela korišćena u imunoblot analizi

<b>PRIMARNA ANTITELA</b>			
<b>Antitelo</b>	<b>Proizvođač i kataloški broj</b>	<b>Vrsta</b>	<b>Razblaženje</b>
<b>katalaza</b>	Abcam, ab16731	primarno zečje poliklonsko	1:5000
<b>MnSOD</b>	Abcam, ab13533	primarno zečje poliklonsko	1:5000
<b>CuZnSOD</b>	Santa Cruz Biotechnology, Inc, 271014	primarno mišje monoklonsko	1: 1000
<b>GST</b>	Thermo Fisher Scientific, PA5-29558	primarno zečje poliklonsko	1: 1000
<b>PARP</b>	Cell Signaling Technology, Inc, #9542	primarno zečje poliklonsko	1: 1000
<b>t-Akt</b>	Cell Signaling Technology, Inc, #9272	primarno zečje poliklonsko	1: 1000
<b>fosfo-Akt (p-Akt<sup>Ser473</sup>)</b>	Cell Signaling Technology, Inc, #9271S	primarno zečje poliklonsko	1: 1000
<b>t-Erk44/42 kDa</b>	Cell Signaling Technology, Inc, #9102	primarno zečje poliklonsko	1: 1000
<b>fosfo-Erk (p-Erk44/42 kDa)</b>	Cell Signaling Technology, Inc, #9101S	primarno zečje poliklonsko	1: 1000
<b>prokaspaza 3</b>	Santa Cruz Biotechnology, Inc, 7148	primarno zečje poliklonsko	1: 1000
<b>sečena kaspaza 3</b>	Cell Signaling Technology, Inc, #9661S	primarno zečje poliklonsko	1: 1000
<b>Bax</b>	Santa Cruz Biotechnology, Inc, 7480	primarno mišje monoklonsko	1: 1000
<b>Bcl-2</b>	Santa Cruz Biotechnology, Inc, 492	primarno zečje poliklonsko	1: 1000
<b>β-aktin</b>	Santa Cruz Biotechnology, Inc, 1615	primarno kozje poliklonsko	1: 1000
<b>citC</b>	Santa Cruz Biotechnology, Inc, 13561	primarno mišje monoklonsko	1: 1000
<b>PR</b>	Santa Cruz Biotechnology, Inc, 810	primarno mišje monoklonsko	1: 1000
<b>t-eNOS</b>	Santa Cruz Biotechnology, Inc, 654	primarno zečje poliklonsko	1: 1000
<b>fosfo-eNOS (p-eNOS<sup>Ser1177</sup>)</b>	Santa Cruz Biotechnology, Inc, 12972	primarno kozje poliklonsko	1: 1000
<b>fosfo-eNOS (p-eNOS<sup>Thr495</sup>)</b>	Santa Cruz Biotechnology, Inc, 19827	primarno kozje poliklonsko	1: 1000
<b>mHsp60</b>	Santa Cruz Biotechnology, Inc, 13115	primarno mišje monoklonsko	1: 1000
<b>c-jun</b>	Santa Cruz Biotechnology, Inc, 1694	primarno zečje poliklonsko	1: 1000
<b>α-tubulin</b>	Sigma Aldrich, T9026	primarno mišje monoklonsko	1: 1000
<b>SEKUNDARNA ANTITELA</b>			
<b>anti-zečje IgG</b>	Santa Cruz Biotechnology, Inc, 2030	koza	1:5000 - 1:10000
<b>anti-mišje IgG</b>	Santa Cruz Biotechnology, Inc, 2318	magarac	1:5000 - 1:10000
<b>anti-kozje IgG</b>	Santa Cruz Biotechnology, Inc, 2033	magarac	1:5000 - 1:10000

**Tabela 5.** „Prajmeri” korišćeni u analizi ekspresije gena

Gen	Sekvence prajmera (5'-3')	Temperature topljenja (°C)	Produkt (bp)
<b>RPL19</b>	F: TCGCCAATGCCAACTCTCGTC	63	92
	R: AGCCCGGGAATGGACAGT	65	
<b>Bax</b>	F: TGCTACAGGGTTTCATCCAG	58	135
	R: CCAGTTCATCGCCAATTC	57	
<b>Bcl-2</b>	F: TGGAAAGCGTAGACAAGGAGATGC	65	88
	R: CAAGGCTCTAGGTGGTCATTCAGG	67	
<b>PARP</b>	F: CGCTCAAGGCTCAGAACGAG	63	130
	R: CAGGATTGCGGACTCTCCA	59	
<b>kaspaza 3</b>	F: GATGTCGATGCAGCTAACC	57	321
	R: TGTCTCAATACCGCAGTCC	57	

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Postupak sa životinjama

U izradi ove doktorske disertacije, korišćeni su mužjaci pacova soja Wistar, s obzirom na to da u humanoj populaciji postoji veći rizik i lošiji ishod nakon ishemijskih povreda mozga kod muškog u odnosu na ženski pol (Stein, 2008; Liu i sar., 2012). Takođe, muškarci imaju nizak, ali stabilan nivo cirkulišućeg P4 što ih čini pogodnim za ispitivanje uticaja hormona.

Korišćene životinje su bile starosti 3 meseca ( $n = 137$ ), težine 350 – 400 g i odgajane su u vivarijumu Laboratorije za molekularnu biologiju i endokrinologiju, Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ - Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, u kontrolisanim uslovima. U kavezima je bilo smešteno 3 – 4 životinje, pri konstantnoj temperaturi od  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , vlažnosti vazduha od 55 %, svetlosnom režimu 12 h svetlost/12 h mrak i ishrani zasnovanoj na *ad libidum* režimu.

Rad sa eksperimentalnim životinjama je odobren od strane Etičkog komiteta za rad sa životinjama u istraživanjima Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ - Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, i izveden u saglasnosti sa principima koje propisuje publikacija *Guide for Care and Use of Laboratory Animals* (NIH Publication No. 80-23). Rešenja o odobrenju su zavedena pod brojevima 02/11 i 323-07-04253/2016-05.

#### Eksperimentalne grupe, hirurške procedure i tretmani

Životinje su nasumično bile podeljene prvog dana eksperimenta u sledeće grupe na osnovu tipa operacije i tretmana:

1. S + V – jedinke podvrgnute lažnoj operaciji (eng. *sham operation*, S) i tretirane lanenim uljem (V) u dozi od 1 mg/kg/dan. Ova grupa jedinki je služila kao kontrolna;
2. 2VO + V – jedinke podvrgnute operaciji trajnog podvezivanja zajedničkih karotidnih arterija (2VO) i tretirane lanenim uljem (V) u dozi od 1 mg/kg/dan;
3. 2VO + P4 – jedinke podvrgnute operaciji trajnog podvezivanja zajedničkih karotidnih arterija (2VO) i tretirane sa P4 u dozi od 1.7 mg/kg/dan, rastvorenom u lanenom ulju.



**Slika 3.** Izolovanje zajedničkih karotidnih arterija. Preuzeto iz Cao i sar., 2018

Pre početka operativnog zahvata, jedinke su anestetizirane injekcijom 5 % hloral-hidrata (400 mg/kg), a nakon provere uspavanosti je napravljen rez na sredini ventralne strane vrata, neposredno iznad grudne kosti. Zajedničke karotidne arterije (bilateralno izložene) su pažljivo razdvojene od okolnog tkiva i nerva vagusa (*Slika 3.*), a zatim dvostruko podvezane 5-0 hirurškim svilenim koncem. Kontrolna grupa je lažno operisana, odnosno, podvrgnuta je identičnoj operacionoj proceduri, koja je podrazumevala manipulisanje obema arterijama, ali ne i njihovo podvezivanje. Svi tretmani su aplicirani subkutano, jednom dnevno u jutarnjim časovima, između 09:00 – 10:00 h, tokom sedam dana.

### 3.2.2. Testovi ponašanja

#### Test prepoznavanja novog predmeta

Testom prepoznavanja novog predmeta (eng. *novel object recognition*, NOR) je procenjivana sposobnost učenja i pamćenja, odnosno reakcija životinja na novi u odnosu na stari, poznati predmet. Pacovima ( $n = 6$  u svakoj eksperimentalnoj grupi) je 3 min pre početka testa bilo dozvoljeno da se upoznaju sa eksperimentalnom arenom (dimenzija  $80 \times 70 \times 45$  cm). Tokom faze upoznavanja sa predmetima, životinje su 5 min istraživale arenu u kojoj su postavljena dva istovetna predmeta, jedan nasuprot drugog. Nakon pauze od 4 h (koja se smatra kratkoročnim zadržavanjem memorije), usledila je faza testiranja (5 min) u kojoj je jedan od predmeta zamenjen novim. Treba istaći da u ovoj eksperimentalnoj postavci korišćeni predmeti nisu ličili na živa bića. Dva istovetna predmeta su bila glatka (predmeti kockastog oblika ispunjeni peskom), dok je novi bio složeniji (konusna laboratorijska posuda ispunjena peskom). Ni jedan od njih nije bio viši od dvostruke veličine životinje, one nisu mogle da sede na njima, a s obzirom na to da su bili ispunjeni peskom, životinje nisu mogle da ih obaraju. Tokom obe faze je mereno vreme istraživanja svakog objekta ponaosob.

Analiza je urađena pomoću ANY-maze softvera (Stoeling Co, SAD). Očuvanost pamćenja je izračunata formulom: (Vreme istraživanja novog predmeta) / (Vreme provedeno u istraživanju novog predmeta + Vreme provedeno u istraživanju poznatog predmeta), gde odnos iznad 0.5 ukazuje na očuvanost (Karlsson i sar., 2016). Pojačana istraživačka aktivnost novog u odnosu na poznati/prethodno prisutni predmet ukazuje na procese učenja i pamćenja (prepoznavanja). Istraživačko ponašanje je definisano kao suočavanje, njuškanje ili dodirivanje bilo kog predmeta na udaljenosti  $< 1$  cm od njuške. Mirisni stimuli su izbegavani čišćenjem arene i predmeta sa 70 % alkoholom između ispitivanja (Stanojlović, Guševac Stojanović i sar., 2019).

#### Uzdignuti plus lavirint

Ponašanje koje se dovodi u vezu sa opštom aktivnošću je procinjeno uzdignutim plus lavirintom (eng. *elevated plus maze*, EPM). Aparatura korišćena u ovoj eksperimentalnoj postavci je bila podignuta 50 cm iznad tla i sastojala se od centralne platforme ( $10 \times 10$  cm) sa po dva otvorena i zatvorena kraka. Životinje ( $n = 10$  u svakoj eksperimentalnoj grupi) su postavljane na centralnu platformu glavom okrenutom prema otvorenom kraku i nakon toga su snimane 10 min. Broj ukupnih ulazaka u krak je smatran indeksom opšte lokomotorne aktivnosti (Stanojlović i sar., 2015a).

#### Test otvorenog polja

Test otvorenog polja (eng. *open field test*, OF) za određivanje lokomotorne i istraživačke aktivnosti je sproveden u kvadratnoj areni dimenzija  $100 \times 100 \times 40$  cm podeljenoj na kvadrate veličine  $25 \times 25$  cm. Jedan po jedan, pacovi ( $n = 10$  u svakoj eksperimentalnoj grupi) su smeštani u centar arene i snimani 10 min. Lokomotorna aktivnost je procinjivana brojem prolazaka sve četiri šape preko jednog kvadrata, podizanjem gornjeg dela tela i šapa od tla, kao i smeštanjem sve četiri šape u polje (Stanojlović i sar., 2015a).



### **3.2.3. Žrtvovanje životinja i priprema tkiva i uzoraka**

#### **3.2.3.1. Žrtvovanje životinja**

Prva grupa životinja (n = 128) žrtvovana je dekapitacijom pomoću giljotine (Harvard Apparatus, SAD). Nakon izdvajanja celih mozгова, izolovani su PFC i HIPP koji su potom zamrzavani u tečnom azotu radi određivanja fragmentisanosti DNK, promena parametara OS/NS i AO zaštite, kao i nivoa proteinske i genske ekspresije.

Za potrebe histoloških analiza, dodatna grupa životinja (n = 9) je anestetizirana prekomernom dozom hloral-hidrata i ispirana (perfundovana) kroz srce sa 0.9 % natrijum hloridom (NaCl, ~ 200 ml po životinji), a zatim sa 4 % paraformaldehidom (PFA, ~ 50 ml po životinji).

#### **3.2.3.2. Priprema homogenata celog tkiva, subćelijskih frakcija i uzoraka za potrebe analiza DNK fragmentisanosti, genske ekspresije i histološke analize**

Za određivanje potencijalnih promena ispitivanih parametara OS/NS i AO zaštite, korišćen je ukupan ćelijski ekstrakt. Proteinska ekspresija je praćena u specifičnim subćelijskim frakcijama: citosolnoj (citosol, cit), jedarnoj (nukleosol, jed) i mitohondrijskoj (mitosol, mth), dok su promene genske ekspresije i DNK fragmentisanosti proćavane u specifićno pripremljenim uzorcima za potrebe tih analiza. Histohemijska analiza je raćena na presecima PFC i HIPP.

#### **Izolovanje ukupnog ćelijskog ekstrakta**

Promene parametara OS/NS i AO zaštite su ispitivane na PFC i HIPP pojedinaćnih životinja svake grupe (n = 10 za svaku grupu), koji su homogenizovani u u staklo-teflon Potter-Elvehjem homogenizeru sa 10 vol (wt/vol) rastvora za izolaciju (50 mM Tris-HCl, 0.25 M saharoze, 1 mM EDTA, pH 7.4), nakon ćega su podeljeni za dalje analize. U prvi set uzoraka, koji je slućio za detektovanje promena parametara OS/NS, je dodavan koktel inhibitora: 1 mM natrijum ortovanadat, 5 mM natrijum fluorid, leupeptin (5 µg/ml), aprotinin (2 µg/ml), 1 mM PMSF, kao i 5 mM EDTA i 1 mM EGTA. Uzorci su ljućjani na ledu 15 min, nakon ćega su promućkani i ponovo ljućjani 15 min, centrifugirani na 12000 × g, 15 min na 4°C (Eppendorf 5417 centrifuga, Nemaćka) (Szymańska i sar., 2009). Drugi set uzoraka koji je korišćen za proućavanje aktivnosti ispitivanih AO enzima, SOD, CAT, GST, XOD, sonifikovan je 3 × 10 sek na 10 MHz (Sonopuls, Bandelin; Nemaćka) na ledu i nakon toga centrifugiran na 105000 × g, 60 min na 4°C (Beckman L7-55 Ultracentrifuga, Nemaćka) (Nikolić-Kokić i sar., 2018). Dobijeni supernatanti su korišćeni kao ekstrakti celih ćelija u daljim analizama.

#### **Priprema subćelijskih frakcija**

Subćelijske frakcije su dobijene homogenizovanjem pojedinaćnih PFC i HIPP (n = 6 za kontrolnu i n = 8 za svaku 2VO grupu) u staklo-teflon Potter-Elvehjem homogenizeru u 2 vol hladnog (4°C) pufera: 10 % glicerol, 50 mM NaCl, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 20 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 1 mM Na<sub>2</sub>EGTA, 2 mM DTT, proteazni inhibitori (0.15 mM spermin, 0.15 mM spermidin, 0.1 mM PMSF, 5 µg/ml antipain, 5 µg/ml leupeptin, 5 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml tripsin inhibitor i 3 mM benzamidin), kao i fosfatazni inhibitori (20 mM β-glicerofosfat, 5 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> × 10H<sub>2</sub>O, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> i 25 mM NaF). Dobijeni homogenat je centrifugiran na 2000 × g, 10 min, na 4°C (Eppendorf 5417 centrifuga, Nemaćka), nastali supernatant je korišćen za dobijanje frakcija cit i mth (S1), a talog za dobijanje jed. Dalje, centrifugiranjem supernatanta (S1) na 20000 × g, 30 min, na 4°C staloćene su mitohondrije, a novonastali supernatant (S2) je centrifugiran na ultracentrifugi na 105000 × g, 60 min, na 4°C kako bi se izdvojio cit. Talog u kojem su bila jedra je opran u 0.5 ml homogenizacionog pufera i joć jednom centrifugiran na 2000 × g, 10 min, na 4°C (Beckman centrifuga, Nemaćka). Ovako oprana jedra su potom resuspendovana u 0.5 ml homogenizacionog pufera koji je sadržao 0.5 M NaCl, a potom je smeća inkubirana 60 min na ledu uz povremeno

mešanje na vorteksu. Po završetku inkubacije, smeša je centrifugirana na  $8000 \times g$ , 10 min, na  $4^{\circ}C$ , a izdvojeni supernatant se koristio kao jed ekstrakt.

Mitohondrijski ekstrakt dobijen je tako što su mitohondrije oprane u 0.5 ml homogenizacionog pufera. Potom su ponovo centrifugirane na  $20000 \times g$ , 30 min, na  $4^{\circ}C$  i resuspendovane u puferu za lizu mitohondrija koji je sadržao 0.05 % Triton X-100 i inkubirane na ledu 90 min. Mitohondrijska suspenzija je potom centrifugirana na  $20000 \times g$ , 60 min, na  $4^{\circ}C$  (Stanojlović i sar., 2014a).

### **Izolacija RNK i reakcija reverzne transkripcije**

Smrznuto tkivo PFC ili HIPP (50 – 100 mg,  $n = 6$  za kontrolnu i  $n = 8$  za svaku 2VO grupu), homogenizovano je u staklo-teflon Potter-Elvehjem homogenizeru (8 – 10 pokreta tučkom) u 10 vol TRIzol reagensa prema uputstvu proizvođača. Homogenat je dalje inkubiran 5 min na  $37^{\circ}C$  kako bi se odvojio nesolubilni materijal. Potom su uzorci centrifugirani na  $12000 \times g$ , 15 min, na  $4^{\circ}C$  (Eppendorf 5417 centrifuga, Nemačka) i smeša je zagrevana u termo-bloku 5 min na  $37^{\circ}C$ , kako bi preostali nukleo-proteinski kompleksi disosovali. Na 1 ml korišćenog TRIzol reagensa dodavano je 0.2 ml hloroforma, a tube su snažno mućkane 15 sek. Uzorci su još jednom zagrevani u termo-bloku 2 – 3 min na  $37^{\circ}C$  i centrifugirani na  $12000 \times g$ , 15 min, na  $4^{\circ}C$  (Eppendorf 5417 centrifuga, Nemačka).

Nakon centrifugiranja, u tubama su izdvojene tri faze: donja, crveno-roze faza (hloroform) i interfaza, bela faza (fenol) u kojima zaostaju proteini, lipidi i DNK; kao i gornja, prozirna vodena faza (koja predstavlja oko 60 % početne zapremine TRIzola korišćenog za homogenizaciju) u kojoj se nalazi RNK. Gornja faza je prebacivana u novu tubu i dodavan je 1 vol izopropanola. Posle inkubacije preko noći na  $-20^{\circ}C$ , uzorci su centrifugirani na  $12000 \times g$ , 10 min, na  $4^{\circ}C$  i supernatant je odbacivan. Talog koji sadrži RNK je resuspendovan u 0.5 ml hladnog 75 % etanola, dobro promućkan i centrifugiran na  $7500 \times g$ , 5 min, na  $4^{\circ}C$ . Dobijeni talog je osušen na vazduhu 10 – 15 min i rastvoren u 100  $\mu l$  sterilne vode sa 0.1 % DEPC.

Potom je cDNK sintetisana pomoću komercijalno dostupnog kompleta High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. Ukratko, u reakciji reverzne transkripcije reverznom transkriptazom (MultiScribe™ Reverse Transcriptase 50 U/ $\mu l$ ), korišćeno je 2  $\mu g$  totalne RNK u prisustvu 2  $\mu l$  oligo(dT) prajmera, 0.8  $\mu l$  100 mM miksa dezoksিনukleotida (dNTP), 1  $\mu l$  ribonukleaznog inhibitora i 10  $\times$  RT pufera u finalnoj zapremini od 20  $\mu l$ . Dobijene cDNK su čuvane na  $-20^{\circ}C$  do upotrebe.

### **Izolacija uzoraka za određivanje nivoa fragmentisanosti DNK**

Za analizu fragmentisanosti ćelijske DNK korišćena je metoda opisana u publikaciji Bagchi i saradnika (Bagchi i sar., 1999), tako što su smrznuta pojedinačna tkiva obe moždane strukture ( $n = 6$  za kontrolnu grupu i po  $n = 8$  za svaku 2VO grupu) homogenizovana u puferu koji je sadržao 5 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM  $Na_2EDTA$  i 0.5 % Triton X-100.

### **Priprema uzoraka za histološke analize**

Nakon prethodno opisanog postupka žrtvovanja i perfundovanja jedinki svih eksperimentalnih grupa, mozgovi su brzo, ali pažljivo izvađeni, a potom fiksirani u 4 % PFA rastvoru, 24 h na  $4^{\circ}C$ . U narednim danima, mozgovi su dehidratirani u rastućem gradijentu saharoze u 0.2 M PBS puferu (0.2 g  $KH_2PO_4$ , 8 g NaCl, 1.15 g  $Na_2HPO_4$ ) (10 %, 20 %, 30 %, rastvor saharoze, u svakom po najmanje 24 h na  $4^{\circ}C$ ).

Potom su mozgovi sečeni na preseke debljine 20  $\mu m$  na kriotomu (Leica, Nemačka), direktno lepljeni na želatinizovane mikroskopske pločice, sušeni preko noći i zamrzavani na  $-20^{\circ}C$  do upotrebe.

### 3.2.4. Biohemijske analize

#### 3.2.4.1. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina u uzorcima je određivana po metodi Lowry-ja modifikovanoj po Markwell-u (Markwell i sar., 1978), a koju je moguće koristiti kada je očekivana koncentracija proteina u uzorku u opsegu od 1 mg/ml do 10 mg/ml. Kao standard za određivanje koncentracije proteina korišćen je BSA od kojeg je pravljen serija razblaženja za standardnu krivu opsega 0.2 – 10 mg/ml.

Sledeći reagensi su upotrebljeni za određivanje koncentracije proteina:

- Reagens A: 2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  + 0.4 % NaOH + 0.16 % K-Na-tartarat + 1 % SDS;
- Reagens B: 4 %  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ;
- Reagens C: Reagens A: Reagens B (100:1), pravi se neposredno pre upotrebe;
- Reagens D: Folin-Ciocalteu reagens se razblažuje u bidestilovanoj vodi ( $\text{ddH}_2\text{O}$ ) u odnosu 1:1.

Postupak: u svaku epruvetu (osim slepe probe/blanka) je stavljano je po 10  $\mu\text{l}$  rastvora BSA/uzorka i 890  $\mu\text{l}$   $\text{ddH}_2\text{O}$ . Blank je sadržao 900  $\mu\text{l}$   $\text{ddH}_2\text{O}$ , bez proteina. U sve epruvete je zatim dodavano po 100  $\mu\text{l}$  1 M NaOH, dobro promešano i ostavljeno da se inkubira 10 min na sobnoj temperaturi (ST). Po isteku 10 min dodavano je 3 ml rastvora C, ponovo promešano i ostavljeno da stoji 20 min na ST. Nakon toga je dodavano 0.3 ml reagensa D, promešano i smeša je ostavljena 45 min na ST, do pojave boje. Optička gustina (eng. *optical density*, OD) merena je na talasnoj dužini od 750 nm na spektrofotometru (S-30 Boeco, Nemačka). Na osnovu  $\text{OD}_{750\text{nm}}$  očitanih vrednosti za BSA je konstruisana prava iz koje je određivana koncentracija proteina u uzorku na osnovu pročitane  $\text{OD}_{750\text{nm}}$  za uzorak.

#### 3.2.4.2. Određivanje promena ispitivanih parametara oksidativnog/nitrozativnog stresa i anti-oksidativne zaštite

##### 3.2.4.2.1. Određivanje promena ispitivanih parametara oksidativnog/nitrozativnog stresa

###### Pro- i anti-oksidativni balans

Pro- i anti-oksidativni balans (eng. *pro- and anti-oxidant balance*, PAB) je određivan pomoću modifikovane metode Hamidi-Alamdaria i saradnika (Alamdari i sar., 2008). Rastvori  $\text{H}_2\text{O}_2$  i mokraćne kiseline u odgovarajućim odnosima, korišćeni su za pravljenje standardne krive. Kapacitet prisutnih anti-oksidanata je kalibrisan prema mokraćnoj kiselini i izražavan u  $\mu\text{mol/l}$ , dok je  $\text{H}_2\text{O}_2$  služio za određivanje količine pro-oksidanata i izražavan u  $\mu\text{mol/l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Za potrebe eksperimenta su korišćeni sledeći rastvori:

TMB I rastvor: 60 mg TMB + 10 ml DMSO;

TMB katjon: 1 ml TMB I + 50 ml acetatnog pufera (0.05 M, pH 4.5) + 175  $\mu\text{l}$  sveže pripremljenog hloramina T (100 mmol/l), dobro promešan i inkubiran 1 h na 37°C, na tamnom mestu uz stalno mešanje. Nakon inkubacije, u 50 ml TMB katjona dodavano je 25 U enzima peroksidaze;

TMB II rastvor: 200  $\mu\text{l}$  TMB/DMSO je rastvoreno u 10 ml acetatnog pufera (0.05 M, pH 5.6). Ovako pripremljen rastvor je korišćen odmah ili najviše u roku od 2 dana, pri čemu je čuvan na temperaturi od 4°C;

Radni rastvor: 1 ml TMB katjona + 10 ml TMB rastvora II i 6 min mešano na ST i tamnom mestu. Pripremljen radni rastvor je korišćen odmah.

0.05 M acetatni pufer je pravljen rastvaranjem 1.846 g natrijum acetata (molekulske mase 82.03 g/mol i koncentracije 0.0225 M) i 1.651 g sirćetne kiseline (molekulske mase 60.05 g/mol i koncentracije 0.0275 M) u 800 ml dH<sub>2</sub>O nakon čega je rastvor podešavan do pH 4.5. U rastvor je potom dodato dH<sub>2</sub>O do 1 l.

Postupak: u bunariće mikrotitar ploče su dodavani standardni rastvori/slepa proba (dH<sub>2</sub>O)/uzorci (10 µl). Potom je u bunariće višekanalnom automatskom pipetom dodavano 180 µl radnog rastvora. Mikrotitar ploča je inkubirana na tamnom mestu 12 min na 37°C. Reakcija je zaustavljena sa 40 µl 2 mol/l HCl, pri čemu je plava boja rastvora prevođena u žutu. Apsorbanca je merena spektrofotometrijski na 450 nm (Tecan Group Ltd, Švajcarska). Na osnovu izmerenih apsorbanci koje se dobijaju u standardnim rastvorima, konstruisana je kalibraciona kriva iz koje su određivane koncentracije uzoraka.

Vrednosti PAB su izražavane u arbitrarnim jedinicama (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> komplementarne jedinice, HKU), koje predstavljaju procenat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u standardnim rastvorima pomnožen sa 6 i prikazane kao procenat od kontrole.

### **Azot oksid**

Nivo NO je određivan indirektno praćenjem nivoa nitrita (NO<sub>2</sub>) kao stabilnog NO proizvoda, korišćenjem Griess-ovog reagensa (Griess reagens: 1.5 % sulfanilamid u 1 M HCl uz 0.15 % N-(1-Naftil)etilendiamin dihidrohlorid u dH<sub>2</sub>O) u ukupnom ekstraktu ćelija, kao i subćelijskoj frakciji cit izolovanih iz PFC i HIPP životinja svih eksperimentalnih grupa.

Postupak: u mikrotitarskoj ploči sa 96 bunarića, 50 µl uzorka/standarda/blanka je pomešano sa jednakom zapreminom Griess-ovog reagensa, inkubirano 10 min u mraku na ST, a apsorbanca je merena spektrofotometrijski na 540 nm (Tecan Group Ltd, Švajcarska). Rastuće koncentracije natrijum nitrita (NaNO<sub>2</sub>) su korišćene za generisanje standardne krive iz koje je izračunata koncentracija NO<sub>2</sub> u uzorku (Stanojlović, Guševac Stojanović i sar., 2019). Rezultati su izraženi kao procenat promene u odnosu na kontrolnu grupu.

### **Produkti uznapredovale oksidativne modifikacije proteina**

Procena nivoa produkata uznapredovale oksidativne modifikacije proteina (eng. *advanced oxidation protein products*, AOPP), vršena je prema metodi koju su opisali Witko-Sarsat i saradnici (Witko-Sarsat i sar., 1996).

Za potrebe metode su korišćeni sledeći rastvori:

Radni rastvor 1 glacijalna kiselina pomešana sa fosfatnim puferom u odnosu 1:8;

Radni rastvor 2: kalijum-jodid rastvoren u fosfatnom puferu.

20 mM fosfatni pufer je pravljen tako što je rastvoreno 0.680 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> u 250 ml dH<sub>2</sub>O, a zatim 0.890 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> rastvoreno u 250 ml dH<sub>2</sub>O. Potom je u rastvor Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> dodavan KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> sve dok pH nije postigla vrednost od 7.4.

Za rastvor 1.16 M kalijum jodida koji se čuva u tamnoj boci, odmereno je 19.257 g kalijum jodida koji je potom rastvoren u fosfatnom puferu do 1000 ml.

Nivo AOPP je određivan metodom završne tačke sa slepom probom reagensa.

Postupak: 10 µl uzorka/standarda pomešano je sa 75 µl Radnog rastvora 1 i posle inkubacije od 1 min očitavana je prva apsorbanca uzorka. Nakon toga, reakcionoj smeši je dodavan radni rastvor 2 (75 µl) i posle inkubacije od 3 min, ponovo je merena apsorbanca na talasnoj dužini od 340 nm (Tecan Group Ltd, Švajcarska). Koncentracija AOPP izražena je preko ekvivalenta hloramina T koji je upotrebljen za izradu standarde prave u rasponu koncentracija od 10 µmol/l do 100 µmol/l, pri čemu njegova apsorbanca linearno raste sa porastom koncentracije. Rezultati su izraženi kao procenat promene u odnosu na kontrolnu grupu.

## Produkti lipidne peroksidacije

Koncentracija produkata LPO je merena specifičnim enzimskim imunoesejom prema metodi Gerard-Monnier i saradnika (Gérard-Monnier i sar., 1998).

Standardi (serija razblaženja 10 mM TMOP)/blank (acetonitril:metanol u odnosu 3:1)/uzorci (47  $\mu$ l) pomešani su sa radnim rastvorom (152  $\mu$ l) i nakon blagog vorteksovanja dodavano je 35  $\mu$ l metasulfonske kiseline. Smeše su još jednom vorteksovane i zagrevane 60 min, na 45°C. Potom su centrifugirane na 13000  $\times$  g, 15 min, na 4°C. U bunariće mikrotitar ploče je dodavano po 100  $\mu$ l dobijenog supernatanta, a apsorbancija je očitavana na 580 nm (Tecan Group Ltd, Švajcarska).

Radni rastvor je napravljen pred upotrebu na sledeći način: pomešana je  $\frac{1}{4}$  vol štoka gvožđa (34  $\mu$ M FeCl<sub>3</sub> u rastvoru acetonitril:metanol u odnosu 3:1) i  $\frac{3}{4}$  vol štoka rastvora napravljenog od 20 mM 1-metil-2-fenilindol u rastvoru acetonitril:metanol u odnosu 3:1.

Na osnovu izmerenih apsorbanci standardnih rastvora, konstruisana je kalibraciona kriva iz koje su određivane koncentracije uzoraka. Rezultati su izraženi kao procenat promene u odnosu na kontrolnu grupu.

## Aktivnost ksantin-oksidade

Aktivnost XOD određivana je praćenjem formiranja mokraćne kiseline u prisustvu ksantina kao supstrata (Terada i sar., 1990).

Za određivanje aktivnosti enzima XOD korišćeni su:

- 0.1 M fosfatni pufer pH 7.4
- 0.25 mM EDTA u 0.1 M PBS pH 7.4
- 0.2 mM ksantin u 0.1 M PBS pH 7.4

Postupak: u kivetu je dodavano 0.4 ml EDTA, 0.1 ml uzorka, 0.5 ml ksantina, 4.17  $\mu$ l ksantin-oksidade, a zatim je praćena promena apsorbance na 292 nm, 15 min, na 37°C.

Aktivnost je računata po sledećoj formuli:

Aktivnost XOD:  $(\Delta A/\text{min} \times 1000)/1.22 \times 10^4 \times C_{\text{pr}} = [\text{nmol mokraćne kis/min/mg proteina}]$

$\Delta A$  – srednja promena apsorbance uzorka u min;  $1.22 \times 10^4$  – ekstinkcioni koeficijent za mokraćnu kiselinu na 292 nm [ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ];  $C_{\text{pr}}$  – koncentracija proteina [mg/ml].

### 3.2.4.2.2. Određivanje promena ispitivanih parametara anti-oksidativne zaštite

U cilju određivanja stepena AO zaštite, u uzorcima tkiva PFC i HIPP vršeno je merenje aktivnosti SOD (ukupna, MnSOD, CuZnSOD) CAT, GST i XOD. Promena apsorbance praćena je na spektrofotometru (Shimadzu UV-160, Japan).

#### Aktivnost ukupne-superoksid dismutaze

Određivanje aktivnosti enzima SOD vršeno je adrenalinskom metodom (Misra i Fridovich, 1972) koja se zasniva na činjenici da adrenalin u alkalnoj sredini podleže auto-oksidaciji gradeći adrenohrom (svetlo roze boje) i  $O_2^-$ . Prisutna SOD uklanja  $O_2^-$  i inhibira auto-oksidaciju adrenalina. Akumulacija adrenohroma dovodi do razvijanja blede crvene boje i promene apsorbance pri talasnoj dužini od 480 nm. Nagib linearnog dela porasta apsorbance, jednak je brzini auto-oksidacije adrenalina, dok se procenat inhibicije auto-oksidacije adrenalina koju izazove SOD iz uzorka koristi kao mera katalitičke aktivnosti enzima. Brzina auto-oksidacije u odsustvu enzima uzimana je kao referentna (kontrolna) vrednost.

Za određivanje aktivnosti SOD enzima upotrebljeni su:

- Adrenalin, rastvoren u 0.1 M HCl
- Karbonatni pufer: 0.05 M  $Na_2CO_3$  i 0.1 mM EDTA, pH 10.2

Postupak: u staklenu kivetu je odmeravano 3 ml karbonatnog pufera i potom je dodavan rastvor adrenalina u kolićini dovoljnoj da promena apsorbance (u toku auto-oksidacije) bude od 0.02 nm/min do 0.022 nm/min. Reakcija je praćena 4–6 min kako bi se taćno odredio plato promene apsorbance. Karbonatni pufer i rastvor adrenalina predstavljaju kontrolnu reakciju (blank). Pri određivanju aktivnosti SOD, u karbonatni pufer se pre adrenalina dodaje uzorak u kolićini koja rezultira inhibicijom od 50 % vrednosti dobijene za blank. Procenat inhibicije auto-oksidacije adrenalina u prisustvu SOD iz uzorka, u odnosu na kontrolnu reakciju auto-oksidacije adrenalina, korišćen je za izraćunavanje aktivnosti ovog enzima. Kolićina enzima potrebna da smanji stopu auto-oksidacije adrenalina za 50 %, u linearnom delu porasta apsorbance, na pH 10.2 je definisana kao jedna SOD jedinica.

Aktivnost enzima SOD je raćunata prema formuli:

Aktivnost ukupne-SOD =  $(2 \times R \times (\Delta K - \Delta A)) / (V \times C_{pr} \times \Delta K) = [U/mg \text{ proteina}]$  [U =  $\mu\text{mol}$  adrenalina/min/mg proteina]

R – razblaženje uzorka;  $\Delta K$  – promena vrednosti apsorbance/min pri reakciji sa blankom;  $\Delta A$  – promena vrednosti apsorbance/min pri reakciji sa uzorkom; V – zapremina uzorka (ml);  $C_{pr}$  – koncentracija proteina u uzorku (mg/ml).

Internacionalna jedinica (U) je jedinica enzimске aktivnosti koja predstavlja onu kolićinu enzima koja razgradi 1  $\mu\text{mol}$  supstrata po 1 min (U =  $\mu\text{mol}/\text{min}$ ).

#### Aktivnost mangan-superoksid dismutaze

Postupak za određivanje aktivnosti MnSOD je isti kao i postupak za određivanje aktivnosti SOD, s tim da je u uzorku najpre inhibirana aktivnost CuZnSOD dodavanjem 8 mM KCN. Za određivanje aktivnosti MnSOD, potrebno je veću kolićinu uzorka (u kojem je inhibirana CuZnSOD) dodati u reakcionu smešu MnSOD, s obzirom na to da ona predstavlja svega 5–10 % ukupne-SOD. Formula po kojoj se izraćunava je identićna kao za izraćunavanje ukupne-SOD.

### **Aktivnost bakar cink-superoksid dismutaze**

Da bi se odredila aktivnost CuZnSOD, bilo je potrebno prvo odrediti aktivnost MnSOD i ta vrednost je oduzimana od vrednosti ukupne-SOD, prema formuli:

Aktivnost CuZnSOD = aktivnost ukupne-SOD – aktivnost MnSOD

### **Aktivnost katalaze**

Aktivnost CAT je određivana metodom koju je opisao Beutler (Beutler, 1975) i koja se zasniva na spektrofotometrijskom praćenju brzine degradacije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na 230 nm (usled razgradnje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dolazi do pada apsorbance).

Za određivanje aktivnosti enzima CAT korišćeni su:

- 30 % vodeni rastvor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- 1M TRIS, 5 mM EDTA pufer pH 8.0

Postupak: od 30 % vodenog rastvora H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pravljen je 10 mM rastvor (na 230 nm apsorbance rastvora iznosi 0.860). U kivetu su redom dodavani 50 µl TRIS, EDTA pufer, uzorak u količini da ΔA/min u opsegu od 0.03 ml do 0.06 ml i 1 ml 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> rastvora. Merenje apsorbance vršeno je na svakih 30 s u toku 3 min.

Aktivnost CAT je izračunavana prema formuli:

Aktivnost CAT =  $\Delta A \times R / (0.071 \times V \times C_{pr}) = [\mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg proteina}]$

ΔA – srednja promena apsorbance uzorka u minuti; R – razblaženje uzorka; 0.071 – ekstinkcioni koeficijent za H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na 230 nm [M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>]; V – zapremina uzorka u kojoj je određena aktivnost enzima [ml]; C<sub>pr</sub> – koncentracija proteina [mg/ml].

Jedinica aktivnosti CAT je definisana kao količina enzima koja razloži 1 mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u min na 25°C.

### **Aktivnosti glutation S-transferaze**

Aktivnosti GST praćena je pomoću metode koju su opisali Habig i saradnici (Habig i sar., 1974) i koja se zasniva na sposobnosti enzima GST da katalizuje reakciju vezivanja CDNB za SH grupu Cys koji ulazi u sastav GSH, pri čemu se formira CDNB-GSH kompleks. Stopa porasta apsorbance usled formiranog CDNB-GSH direktno je proporcionalna aktivnosti GST u uzorku.

Za određivanje aktivnosti enzima GST upotrebljeni su:

- 0.5 M fosfatni pufer pH 6.5
- 25 mM CDNB u 95 % etanolu
- 20 mM GSH

Postupak: u kivetu je dodavano 2 ml H<sub>2</sub>O, 0.1 ml (25 mM) CDNB, 0.6 ml PBS (0.5 M pH 6.5), 0.3 ml (20 mM) GSH i uzorak.

Merenje je vršeno na svakih 30 s tokom 3 min na temperaturi od 25°C, na 340 nm.

Aktivnost GST je izračunavana prema formuli:

Aktivnost GST:  $(\Delta A_{uz} - \Delta A_{bl}) \times 312.5 / (V \times C_{pr}) = [\text{nM GSH}/\text{min}/\text{mg proteina}]$

ΔA<sub>uz</sub> – srednja promena apsorbance uzorka u min; ΔA<sub>bl</sub> – srednja promena apsorbance blanka u min; V – zapremina uzorka u kojoj je određena aktivnost enzima [ml]; C<sub>pr</sub> – koncentracija proteina [mg/ml], 312.5-ekstinkcioni koeficijent.

### 3.2.4.3. Razdvajanje proteina na osnovu molekularne mase i imunoblot analiza

#### Priprema uzoraka i SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza

Ekspresija proteina iz ukupnog ekstrakta ćelija, kao i subćelijskih frakcija izolovanih iz PFC i HIPP životinja svih eksperimentalnih grupa je praćena imunoblot analizom.

Pomoću pufera za izolaciju, koncentracije proteina u uzorcima su svedene na 2.5 mg/ml. Alikvoti su neposredno pred upotrebu pomešani sa puferom za pripremu uzoraka proteina za SDS-PAGE ( $2 \times$  *Sample Buffer*) i  $\beta$ -merkaptetanolom u odnosu 1:9. Nakon kuvanja na 100°C, 5 min, uzorci su ohlađeni, nanošeni na SDS-poliakrilamid (PAA) gel i razdvajani po molekularnoj masi na denaturišućoj SDS-poliakrilamid gel elektroforezi, po metodi Laemmli-ja (Laemmli, 1970) na sistemu Mini Protean II (Bio-Rad Laboratories Inc, SAD).

Na gel je nanošeno po 5  $\mu$ l molekularnog markera i po 16  $\mu$ l pripremljenih uzoraka (~ 40  $\mu$ g proteina), a proteini su najpre koncentrovani na 5 % gelu, a potom razdvajani na 8 – 12 % PAA gelovima u puferu za elektroforezu (0.25 M TRIS bazu, 0.192 M glicin i 0.1 % SDS). Elektroforeza je trajala ~ 1.5 h pri konstantnom naponu od 100 V na ST. Nakon elektroforeze, gelovi su korišćeni za Western blot analizu.

#### Prenos proteina na poliviniliden fluoridnu (PVDF) membranu i imunoblot analiza

Neposredno pre završetka elektroforeze, PVDF membrane veličine 6  $\times$  9 cm su aktivirane potapanjem na 15 sek u 100 % metanol, ispirane u ddH<sub>2</sub>O 2 min i potapane u pufer za transfer koji je sadržao 20 % metanol, 0.025 M TRIS-HCl, 0.192 M glicin, pH 8.3 na 15 min. Po završetku elektroforeze, gelovi su takođe potapani u pufer za transfer. Zatim je formiran „sendvič” ređanjem papira Whatman GB003 (Whatman Inc, VB), poliakrilamidnog gela, PVDF membrane i još jednog papira Whatman. Formirani „sendviči” su potom bili natopljeni puferom za transfer i postavljeni u aparat za mokri transfer (Trans-Blott Cell, Bio Rad Laboratories Inc, SAD) i dodatno potopljeni u pufer za transfer. Prenos proteina sa gelova na membrane je izvođen pri konstantnom naponu od 100 V, 60 – 90 min, na 4°C.

Membrane su zatim inkubirane 1 – 2 h u puferu za blokiranje, 5 % BSA/NFM rastvorenom u TBST puferu (50 mM TRIS HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween-20) na ST, uz blago mućkanje. Nakon toga je membrana presećana na odgovarajućim molekularnim težinama i inkubirana tokom noći sa primarnim antitelima prikazanim u **Tabeli 4**. Sledećeg dana, membrane su ispirane 5  $\times$  5 min TBST puferom uz blago mućkanje, a potom inkubirane 1.5 h uz blago mućkanje sa odgovarajućim sekundarnim antitelima (**Tabela 4**). Nakon finalnog ispiranja 5  $\times$  5 min u TBST puferu, na membrane je nanošen 20  $\times$  koncentrovani supstrat za hemiluminiscenciju (eng. *enhanced chemiluminescence*, ECL).

Membrane su inkubirane u ECL supstratu 5 min, nakon čega su ocedene, postavljane u kasete za razvijanje filmova i pokrivene tankom folijom. Na pokrivene membrane su postavljani rendgen filmovi (Fuji, Japan), a dužina ekspozicije je varirala od 1 min do 7 min. Količina proteina od interesa u analiziranim uzorcima je odgovarala intenzitetu signala na filmu koji je bio kvantifikovan denziometrijski u programu za analizu slike Image J (Image Processing and Analysis in Java). Vrednosti OD signala korigovane su u odnosu na pozadinu i izražene u odnosu na  $\beta$ -aktin sa istog blota, a rezultati su izraženi kao procenat promene u odnosu na kontrolnu grupu.



#### 3.2.4.4. Kvantitativni PCR u realnom vremenu

Za određivanje nivoa genske ekspresije nekoliko ispitivanih apoptotskih molekula („prajmeri” su prikazani u **Tabeli 5.**), korišćen je odgovarajući komplet koji se sastojao od fluorescentne boje SYBR Green, odgovarajućeg pufera, miksa dNTP i termostabilne DNK polimeraze.

Postupak: reakcione smeše su nanošene u bunariće sterilne ploče, koja je potom inkubirana na 50°C, 2 min, a zatim na 95°C, 10 min radi disocijacije dvolančane DNK. Usledila je denaturacija dvolančane DNK tokom 15 sek na 95°C, neophodna za, vezivanje „prajmera” i elongaciju lanaca u svakom ciklusu u toku 1 min na specifičnoj temperaturi vezivanja „prajmera”. Apsolutne vrednosti ekspresije iRNK svih uzoraka su normalizovane na signal *RPL19* uključen u svaku RTqPCR reakciju. Kako bi se procenila efikasnost amplifikacije (E), za svaki set „prajmera” su korišćene standardne krive. Vrednost E je dobijena iz nagiba krive (Ct-početak detektibilne amplifikacije u funkciji logaritma koncentracije cDNK) (Rutledge i Côté, 2003), dok je efikasnost PCR reakcije bila slična za sve parove „prajmera” i kretala se u opsegu od 0.96 do 0.99 (maksimalna moguća efikasnost je 1). Kvantifikacija relativne količine transkripata je rađena korišćenjem  $\Delta\Delta C_T$  (Livak i Schmittgen, 2001). Rezultati su izraženi kao procenat promene u odnosu na kontrolnu grupu.

#### 3.2.4.5. Analiza fragmentisanosti ćelijske DNK pomoću difenilamin metode

Nakon prethodno opisanog postupka homogenizacije, uzorci su centrifugirani na 27000 × g, 20 min na 90°C (Beckman L7-55 Ultracentrifuga, Nemačka) usled čega se intaktni hromatin u talogu izdvojio od fragmentisane DNK koja je ostala u supernatantu. Kako bi finalna koncentracija u svim uzorcima bila 0.5 N, dobijenom talogu dodavana je 0.5 N perhlorna kiselina (PCA), a supernatantima 5.5 N PCA. Nakon toga, uzorci su zagrevani 15 min na 90°C i centrifugirani na 1500 × g, 10 min, na 4°C (Eppendorf 5417 centrifuga, Nemačka), čime su uklanjani proteini. Izdvojenim supernatantima dodavan je DPA koji se vezuje za deoksiribozu, a potom su uzorci ostavljeni 16 – 20 h na ST do razvijanja plave boje. Apsorbanca uzoraka je merena na 600 nm (Bagchi i sar., 1999).

Nivo fragmentisane DNK u uzorcima je izračunavan na osnovu formule: % fragmentisane DNK =  $(OD_{600\text{ nm}T}/OD_{600\text{ nm}(T+B)}) \times 100$ , gde je *T* = fragmentisana DNK, *B* = intaktna DNK. Nivo fragmentacije DNK u uzorcima izolovanim iz životinja 7 dana nakon 2VO operacije i tretmana lanenim uljem odnosno P4, izražavan je kao procenat u odnosu na fragmentaciju u kontrolnim uzorcima.

#### 3.2.5. Histološke analize- Fluoro-Jade C i tionin bojenje

Prvi set preseka korišćen je za bojenje tioninom. Ukratko, pločice sa presecima PFC i HIPP (20 μm) uranjane su u PBS i inkubirane 30 min u 0.5 % rastvoru tionina. Višak tionina ispran je dH<sub>2</sub>O i u rastućim koncentracijama etanola (70 %, 95 % i 99.9 %). Sekcije su očišćene u ksilolu i prekrivene Eukitt® sredstvom za brzo sušenje i pregledane pod svetlosnim mikroskopom Olympus AX70 (Olympus AX70, Analytical Instruments LLC, SAD) na uvećanju od 630 × i sačuvani u .tiff formatu.

Postupak FJC bojenja: pločice sa presecima PFC i HIPP su prvo uranjane 5 min u PBS, inkubirane 10 min u 0.06 % rastvoru KMnO<sub>4</sub>. Zatim su prebacivane u 0.0001 % rastvor FJC koji sadrži 0.1 % glacijalnu sirćetnu kiselinu. Nakon 10 min, pločice su ispirane 3 × 1 min u dH<sub>2</sub>O, ocedene i pažljivo osušene, a potom inkubirane u ksilolu 2 min radi potpune dehidracije i prekrivene pokrovnim staklom. Preseci su posmatrani na Zeiss Axiovert fluorescentnom mikroskopu (Zeiss, Nemačka) pomoću uvećanja od 200 × i sačuvani u .tiff formatu (Stanojlović, Guševac Stojanović i sar., 2019).

### **3.2.6. Statistička obrada rezultata**

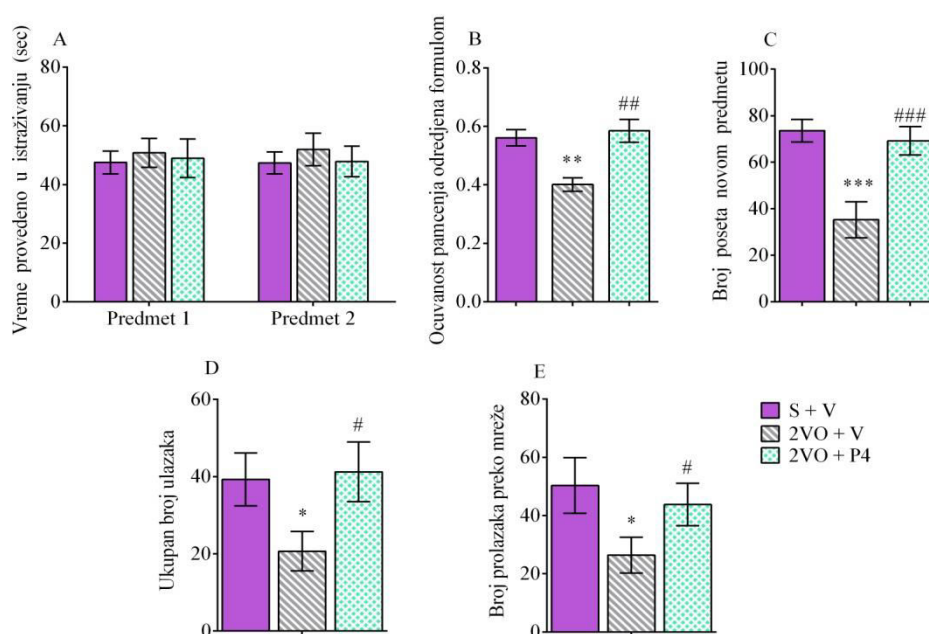
Svi rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška merenja (SEM), i kao procenat od odgovarajuće kontrole osim rezultata testova ponašanja koji su predstavljeni kao arbitrarne jedinice. Obrada rezultata je vršena u softverskim programima Origin, verzija 7.0 (Jandel Co, SAD) i GraphPadPrism, verzija 6 (GraphPad Software, SAD). Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su određivane primenom jednofaktorijske analize varijanse (eng. *one way analysis of variance*, ANOVA) praćene odgovarajućim „multiple range” testom (*Tuckey post hoc*). Za statistički značajne razlike su izabrane one čija je p vrednost bila manja od 0.05.

***REZULTATI***

#### 4.1. Kognitivne i motorne sposobnosti pacova nakon hirurških intervencija i tretmana

Rezultati NOR testa su ukazali da su tokom faze treninga, pacovi svih eksperimentalnih grupa proveli istu količinu vremena u istraživanju dva ista objekta (*Slika 4. A*). Jedinke podvrgnute trajnom podvezivanju zajedničkih karotidnih arterija i tretmanu P4 su provele slično vreme istražujući novi objekat kao kontrole, odnosno više vremena istražujući novi u odnosu na poznati objekat u poređenju sa onima koje su primale laneno ulje ( $p < 0.01$ ) (*Slika 4. B*). Pored toga, 2VO pacovi koji su primali P4 češće su posećivali novi objekat od životinja koje su primale laneno ulje ( $p < 0.001$ ) i u istoj meri kao kontrolne životinje (*Slika 4. C*).

Lokomotorna aktivnost jedinki svih eksperimentalnih grupa praćena je EPM i OF testovima (*Slika 4. D i E*). Na *Slici 4. D* ilustrovano je smanjenje lokomotorne aktivnosti (ispitivane EPM testom) kod 2VO + V grupe u poređenju sa kontrolnom ( $p < 0.05$ ), odnosno, sa 2VO + P4 grupom ( $p < 0.05$ ), što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim OF testom (*Slika 4. E*). Prikazani rezultati oba testa ukazuju na sposobnost tretmana P4 da lokomotornu aktivnost vrati na nivo opažen kod kontrolnih jedinki.



**Slika 4.** Kognitivne i lokomotorne sposobnosti pacova nakon hirurških intervencija i tretmana praćene odgovarajućim testovima. Kognitivne sposobnosti praćene su pomoću testa prepoznavanja novog objekta merenjem vremena provedenog u istraživanju oba ista predmeta, za 6 životinja po eksperimentalnoj grupi (A), sposobnosti pamćenja koja je testirana zamenom jednog od predmeta drugim/novim, za 6 životinja po eksperimentalnoj grupi (B) i učestalosti obilazaka novog predmeta, za 6 životinja po eksperimentalnoj grupi (C), dok su lokomotorne sposobnosti praćene merenjem ukupnog broja ulazaka pomoću testa „uzdignutog plus lavirinta”, za 10 životinja po eksperimentalnoj grupi (D) i broja prolazaka preko mreže pomoću testa otvorenog polja za 10 životinja po eksperimentalnoj grupi (E). Rezultati su predstavljani kao srednje vrednosti  $\pm$  SEM. Statistički značajne razlike su određivane testovima one-way ANOVA i Tukey post hoc. Simbol \* označava statistički značajnu razliku između S + V i obe 2VO grupe (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ), dok simbol # označava statistički značajnu razliku između 2VO grupa (#  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ , ###  $p < 0.001$ ).

## 4.2. Regionalno-specifične promene ispitivanih parametara oksidativnog/nitrozativnog stresa i komponenti anti-oksidativne zaštite pacova nakon hirurških intervencija i tretmana

### 4.2.1. Parametri oksidativnog/nitrozativnog stresa

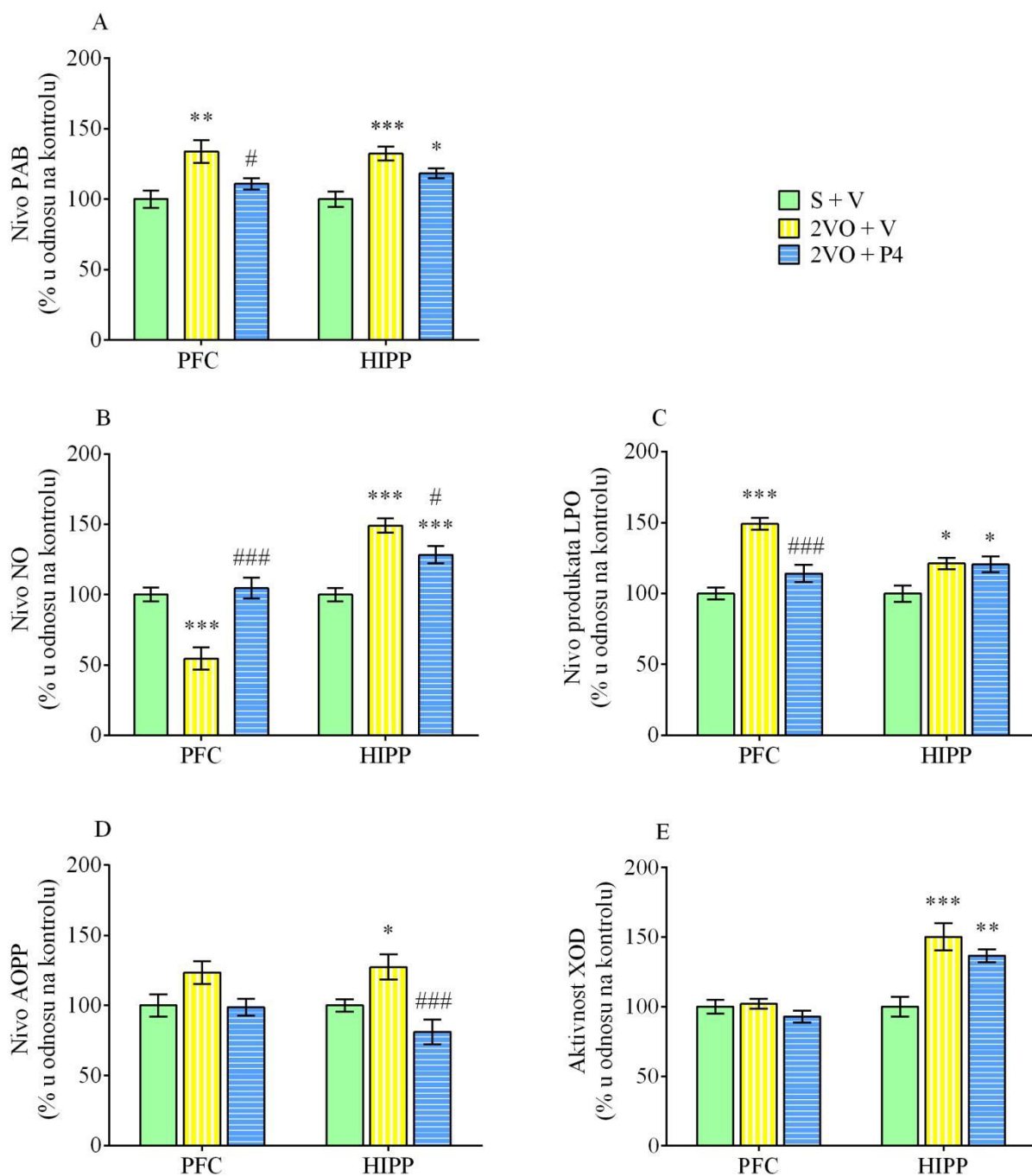
Značajan rast nivoa PAB je zapažen kod 2VO + V u poređenju sa životinjama S + V grupe ( $p < 0.01$  za PFC i  $p < 0.001$  za HIPP), da bi nakon P4 tretmana ova vrednost bila vraćena na kontrolni nivo u PFC ( $p < 0.05$ ), ali ne i u HIPP ( $p < 0.05$ ) (*Slika 5. A*).

Dobijeni rezultati za promenu nivoa NO ukazuju na regionalno-specifičan odgovor ispitivanih moždanih struktura nakon hirurških intervencija i tretmana (*Slika 5. B*). Naime, u PFC 2VO + V jedinki uočeno je smanjenje nivoa NO u odnosu na kontrole ( $p < 0.001$ ), dok je tretman P4 ovaj pad vratio na kontrolni nivo ( $p < 0.001$ ) (*Slika 7. B*). Trajno podvezivanje karotidnih arterija i tretman lanenim uljem značajno su povećali nivo NO u HIPP ( $p < 0.001$ ), a isti trend uočen je i kod jedinki tretiranih sa P4 ( $p < 0.001$ ), iako je zabeleženo smanjenje nivoa NO pri poređenju obe 2VO grupe ( $p < 0.05$ ) (*Slika 5. B*).

Kao što je prikazano na *Slici 5. C*, kod 2VO + V jedinki u PFC i HIPP primećeno je povećanje nivoa produkata LPO ( $p < 0.001$  za PFC i  $p < 0.05$  za HIPP). Tretman P4 je nakon trajnog podvezivanja karotidnih arterija smanjio njihovo stvaranje u PFC do kontrolnih vrednosti ( $p < 0.001$ ), dok u HIPP ovaj hormon nije vratio nivo produkata LPO na kontrolni nivo ( $p < 0.05$ ) (*Slika 5. C*).

U odnosu na kontrolnu grupu, nametnuta trajna MH je uzrokovala porast nivoa oksidovanih proteinskih produkata samo u HIPP ( $p < 0.05$ ), dok je u PFC bio primećen porast nivoa AOPP, ali bez statističke značajnosti (*Slika 5. D*). S druge strane, u HIPP, tretman P4 je vratio nivo AOPP na kontrolne vrednosti ( $p < 0.001$  za HIPP) (*Slika 5. D*).

Kao što je prikazano na *Slici 5. E*, uočen je regionalno-specifičan odgovor XOD u stanju trajne MH. Naime, u PFC nije primećena promena aktivnosti ispitivanog enzima, dok je u HIPP zabeležen porast kako kod 2VO + V ( $p < 0.001$ ), tako i kod 2VO + P4 životinja ( $p < 0.01$ ).



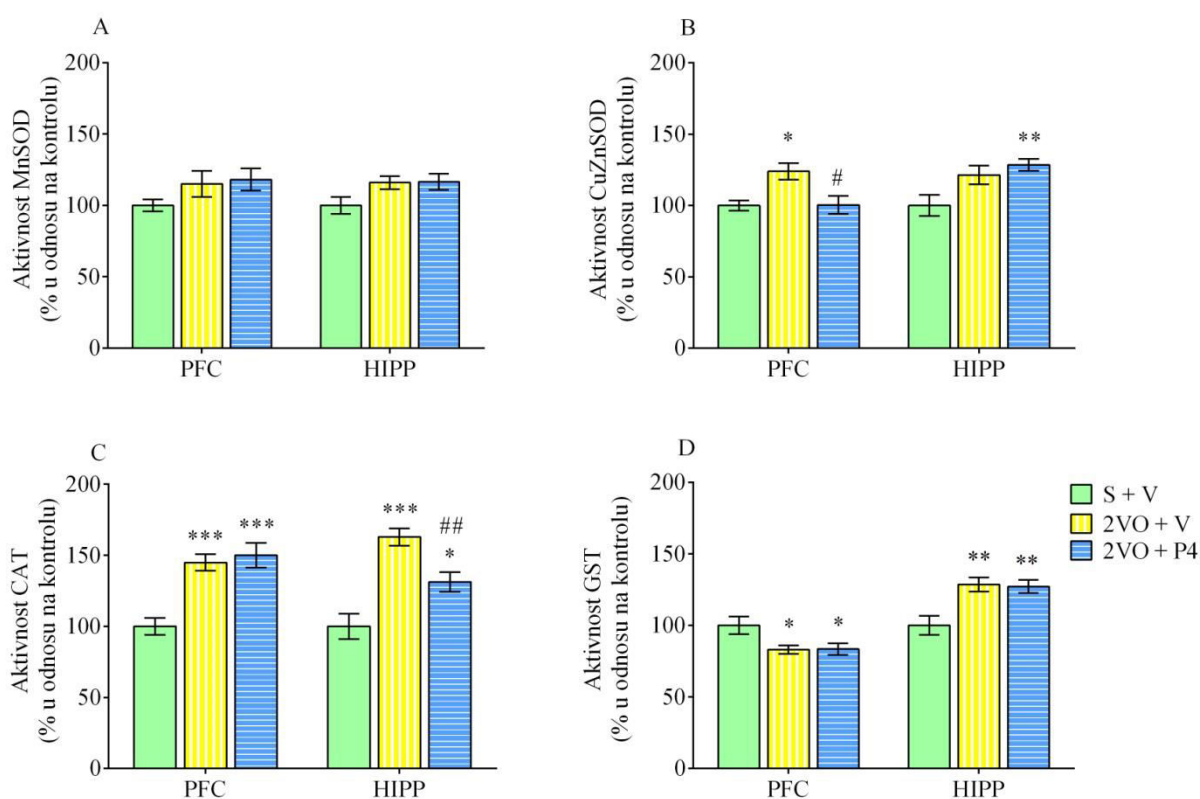
**Slika 5.** Nivoi parametara redoks sistema (PAB, NO, produkti LPO, AOPP i XOD) u ukupnim ćelijskim ekstraktima PFC, odnosno HIPP, nakon hirurških intervencija i tretmana praćeni su odgovarajućim esejima. Rezultati su predstavljani kao srednje vrednosti  $\pm$  SEM za po 10 životinja po eksperimentalnoj grupi i izražavani kao procenti od kontrole. Statistički značajne razlike, dobijene iz merenja koja su rađena u duplikatu, određivane su testovima one-way ANOVA i Tukey post hoc. Simbol \* označava statistički značajnu razliku između S + V i obe 2VO grupe ( $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ), dok simbol # označava statistički značajnu razliku između 2VO grupa (#  $p < 0.05$ , ###  $p < 0.001$ ).

#### 4.2.2. Komponente anti-oksidativne zaštite

**Slika 6. A** ilustruje nepromenjenu aktivnost MnSOD u PFC i HIPP u obe 2VO grupe u odnosu na kontrole. Nasuprot tome, primećen je porast aktivnosti CuZnSOD u PFC ( $p < 0.05$ ), dok je tretman P4 vratio aktivnosti na kontrolni nivo ( $p < 0.05$ ) (**Slika 6. B**). U HIPP, pokazan je trend povećanja aktivnosti CuZnSOD u 2VO + V grupi u poređenju sa kontrolom, ali bez statističke značajnosti, dok je tretman P4 statistički značajno povećao aktivnost ovog enzima u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0.01$ ) (**Slika 6. B**).

Novonastali  $H_2O_2$  dalje neutrališe CAT čija je aktivnost u odnosu na kontrole bila statistički značajno povećana u obe moždane strukture nakon trajnog podvezivanja karotidnih arterija i tretmana lanenim uljem ( $p < 0.001$ ), odnosno P4 ( $p < 0.001$  u PFC i  $p < 0.05$  u HIPP), s tim da je uočeno statistički značajno smanjenje aktivnosti ovog enzima pri poređenju 2VO grupa u HIPP ( $p < 0.01$ ) (**Slika 6. C**).

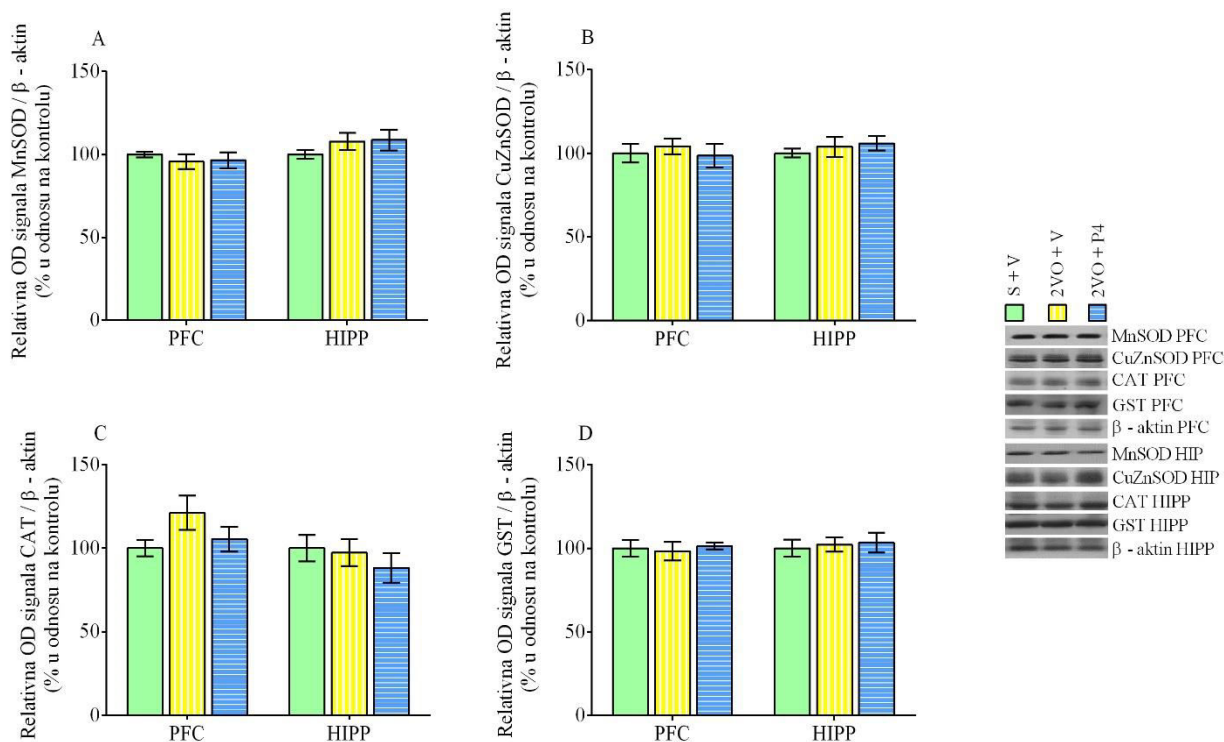
U PFC je nakon podvezivanja karotidnih arterija, bez obzira na primenjeni tretman, aktivnost GST bila statistički značajno smanjena u poređenju sa kontrolama ( $p < 0.05$ ), dok je u HIPP uočen potpuno obrnut trend, odnosno povećanje aktivnosti ispitivanog enzima ( $p < 0.01$ ) (**Slika 6. D**).



**Slika 6.** Aktivnosti enzima anti-oksidativne zaštite (MnSOD, CuZnSOD, CAT, GST) u ukupnim ćelijskim ekstraktima PFC, odnosno HIPP, nakon hirurških intervencija i tretmana praćene su odgovarajućim esejima. Rezultati su predstavljani kao srednje vrednosti  $\pm$  SEM za po 10 životinja po eksperimentalnoj grupi i izražavani kao procenti od kontrole. Statistički značajne razlike, dobijene iz merenja koja su rađena u duplikatu, određivane su testovima one-way ANOVA i Tukey post hoc. Simbol \* označava statistički značajnu razliku između S + V i obe 2VO grupe ( $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ), dok simbol # označava statistički značajnu razliku između 2VO grupa (#  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ ).

Budući da su opažene promene aktivnosti komponenti AO zaštite, dalje su ispitivane potencijalne promene ekspresije odgovarajućih proteina pomoću imunoblot metode.

Nivoi MnSOD, CuZnSOD, CAT i GST proteina u ukupnim ćelijskim ekstraktima PFC i HIPP u sve tri eksperimentalne grupe, prikazani su na **Slici 7**. Za razliku od aktivnosti enzima koje su bile narušene, njihove ekspresije nisu bile statistički značajno promenjene ni u jednoj eksperimentalnoj grupi, što ukazuje da se modifikuje katalitička efikasnost enzima, a ne nivo ovih proteina, odnosno da ne dolazi do *de novo* sinteze.



**Slika 7.** Imunoblot analiza zastupljenosti proteina anti-oksidativne zaštite (MnSOD, CuZnSOD, CAT, GST) u ukupnim ćelijskim ekstraktima PFC, odnosno HIPP, nakon hirurških intervencija i tretmana. Rezultati su predstavljani kao srednje vrednosti  $\pm$  SEM za po 10 životinja po eksperimentalnoj grupi i izražavani kao procenti od kontrole (sve vrednosti su normalizovane u odnosu na OD traka dobijenih za  $\beta$ -aktin). Statistički značajne razlike, dobijene iz merenja koja su rađena u duplikatu, određivane su testovima one-way ANOVA i Tukey post hoc.



### 4.3. Regionalno-specifične promene ispitivanih parametara apoptotske signalne kaskade nishodno od progesteronskih receptora i procena nivoa i obima ćelijske smrti, kao i morfoloških karakteristika ćelija PFC i HIPP pacova nakon hirurških intervencija i tretmana

Daljem proučavanju regionalno-specifičnog odgovora pojedinih komponenti unutrašnjeg/mitohondrijskog apoptotskog puta, prethodio je pilot eksperiment, čiji su rezultati utvrdili da se kod 2VO + V životinja u ukupnom ćelijskom ekstraktu menja ekspresija ključnih molekula ovog puta, Bax i Bcl-2 i da je ravnoteža između ispitivanih apoptotskih molekula Bcl-2 familije pomerena ka pro-apoptotskim. Dodatno, javlja se i regionalno specifičan odgovor moždanih struktura od interesa nakon P4 tretmana u stanju MH (**Tabela 6.**), te je pristupljeno daljim analizama.

**Tabela 6.** Imunoblot analiza zastupljenosti proteina Bcl-2 familije u ukupnim ćelijskim ekstraktima PFC i HIPP nakon hirurških intervencija i tretmana dobijenih u pilot eksperimentu. Rezultati su predstavljani kao srednje vrednosti  $\pm$  SEM za po 5 životinja po eksperimentalnoj grupi i izražavani kao procenti od kontrole (sve vrednosti su normalizovane u odnosu na OD traka dobijenih za  $\beta$ -aktin). Statistički značajne razlike, dobijene iz merenja koja su rađena u duplikatu, određivane su testovima one-way ANOVA i Tukey post hoc. Simbol \* označava statistički značajnu razliku između S + V i obe 2VO grupe (\*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ), dok simbol # označava statistički značajnu razliku između 2VO grupa (###  $p < 0.001$ ).

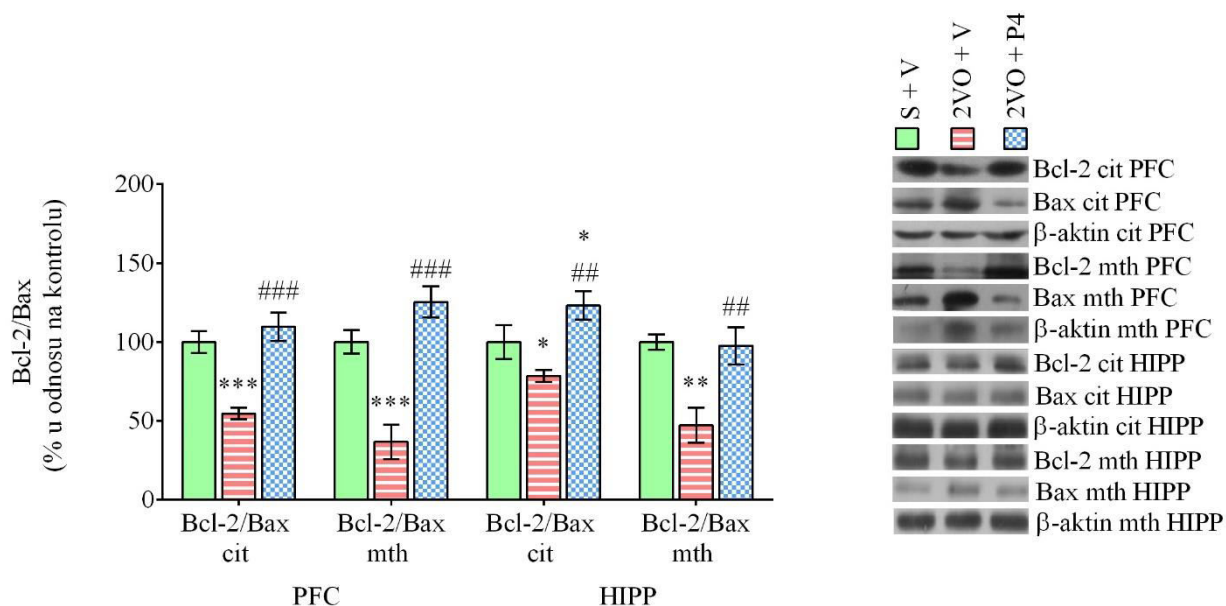
	PFC			HIPP		
	S + V	2VO + V	2VO + P4	S + V	2VO + V	2VO + P4
Bcl-2/Bax	100 $\pm$ 5.32	52.47 $\pm$ 4.04***	97.81 $\pm$ 5.14###	100 $\pm$ 6.11	68.88 $\pm$ 6.19**	109.06 $\pm$ 4.28###

#### 4.3.1. Ekspresija i subćelijska distribucija članova Bcl-2 familije

Nivoi proteinske ekspresije pojedinačnih Bcl-2 i Bax u cit i mth prikazani su u **Tabeli 7.** Uočene promene ekspresije su posledično promenile odnos Bcl-2/Bax u obe ispitivane frakcije. U poređenju sa kontrolnim jedinkama, nametanje MH i tretman lanenim uljem uzrokovali su smanjenje njihovog odnosa i pomeranje ka pro-apoptotskom stanju u obe frakcije PFC ( $p < 0.001$ ) (**Slika 8.**), što je praćeno vraćanjem ovog odnosa na kontrolni nivo nakon tretmana P4 ( $p < 0.001$ ). U HIPP 2VO + V životinja, promene pojedinačnih proteina dovele su do smanjenja odnosa Bcl-2/Bax u poređenju sa kontrolama ( $p < 0.05$  za cit i  $p < 0.01$  za mth) (**Slika 8.**). Tretman P4 povećao je odnos Bcl-2/Bax u obe ispitivane frakcije u odnosu na 2VO + V jedinke ( $p < 0.01$ ), dok je ovaj odnos u cit nadmašio kontrolnu vrednost ( $p < 0.05$ ) (**Slika 8.**).

**Tabela 7.** Imunoblot analiza zastupljenosti proteina Bcl-2 familije u cit i mth PFC, odnosno HIPP, nakon hirurških intervencija i tretmana. Rezultati su predstavljani kao srednje vrednosti  $\pm$  SEM za po 6 životinja u kontrolnoj, odnosno po 8 životinja u obe 2VO grupe i izražavani kao procenti od kontrole (sve vrednosti su normalizovane u odnosu na OD traka dobijenih za  $\beta$ -aktin). Statistički značajne razlike, dobijene iz merenja koja su rađena u duplikatu, određivane su testovima one-way ANOVA i Tukey post hoc. Simbol \* označava statistički značajnu razliku između S + V i obe 2VO grupe ( $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ), dok simbol # označava statistički značajnu razliku između 2VO grupa (#  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ , ###  $p < 0.001$ ).

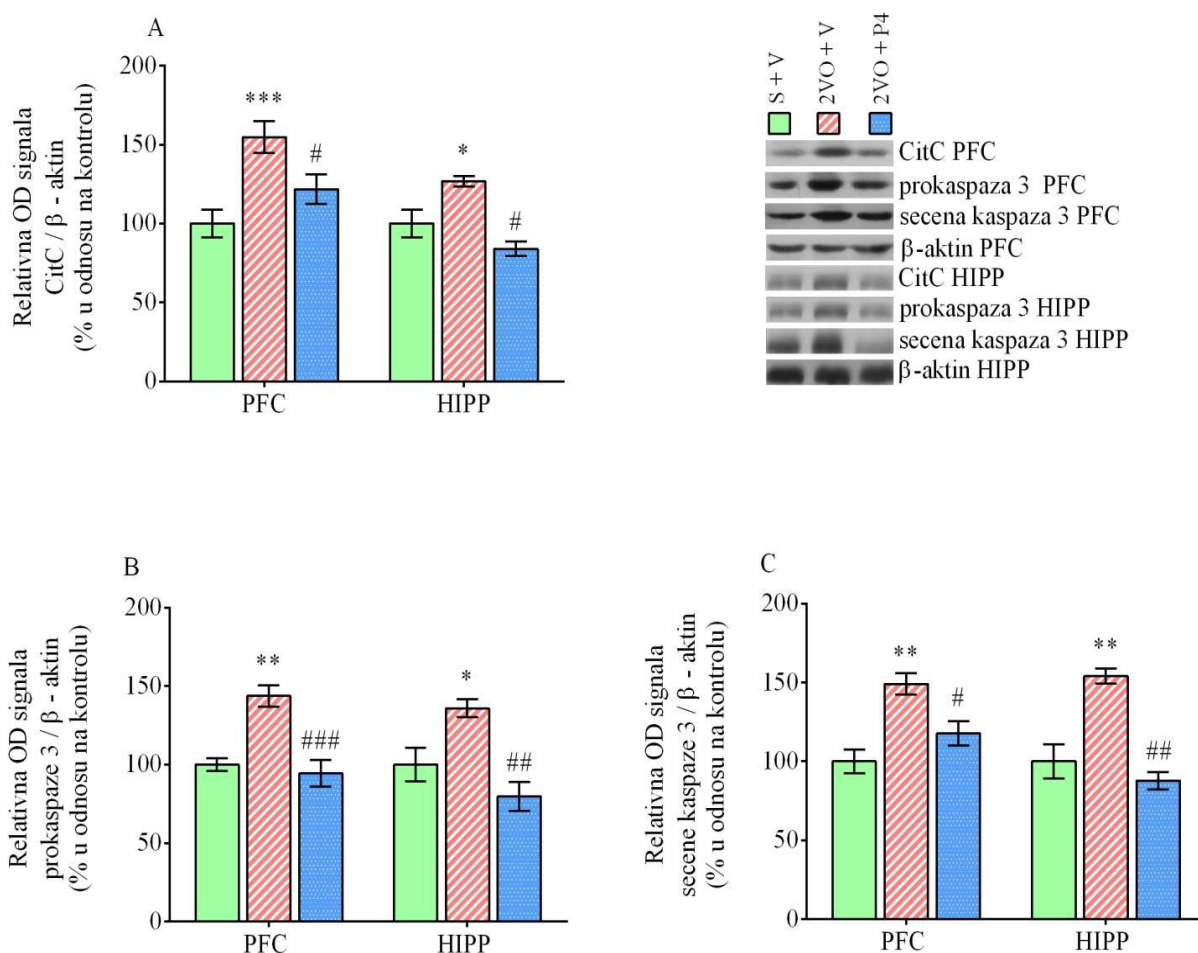
Protein/ $\beta$ -aktin	PFC			HIPP		
	S + V	2VO + V	2VO + P4	S + V	2VO + V	2VO + P4
Bcl-2 cit	100 $\pm$ 10.02	75.87 $\pm$ 6.68*	105.45 $\pm$ 6.59##	100 $\pm$ 10.02	87.63 $\pm$ 7.92	132.71 $\pm$ 8.25*##
Bax cit	100 $\pm$ 9.59	138.65 $\pm$ 8.17**	95.27 $\pm$ 7.68###	100 $\pm$ 11.29	111.53 $\pm$ 4.31	107.77 $\pm$ 9.96
Bcl-2 mth	100 $\pm$ 5.92	61.35 $\pm$ 7.75**	118.25 $\pm$ 6.97###	100 $\pm$ 4.34	72.84 $\pm$ 8.31*	102.56 $\pm$ 5.91#
Bax mth	100 $\pm$ 11.26	166.92 $\pm$ 7.75***	88.67 $\pm$ 6.22###	100 $\pm$ 9.33	154.04 $\pm$ 7.15**	96.52 $\pm$ 5.97##



**Slika 8.** Imunoblot analiza relativnog odnosa Bcl-2/Bax proteina cit i mth PFC, odnosno HIPP, nakon hirurških intervencija i tretmana. Rezultati su predstavljani kao srednje vrednosti  $\pm$  SEM za po 6 životinja u kontrolnoj, odnosno po 8 životinja u obe 2VO grupe i izražavani kao procenti od kontrole (sve vrednosti su normalizovane u odnosu na OD traka dobijenih za  $\beta$ -aktin). Statistički značajne razlike, dobijene iz merenja koja su rađena u duplikatu, određivane su testovima one-way ANOVA i Tukey post hoc. Simbol\* označava statistički značajnu razliku između S + V i obe 2VO grupe ( $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ), dok simbol # označava statistički značajnu razliku između 2VO grupa (##  $p < 0.01$ , ###  $p < 0.001$ ).

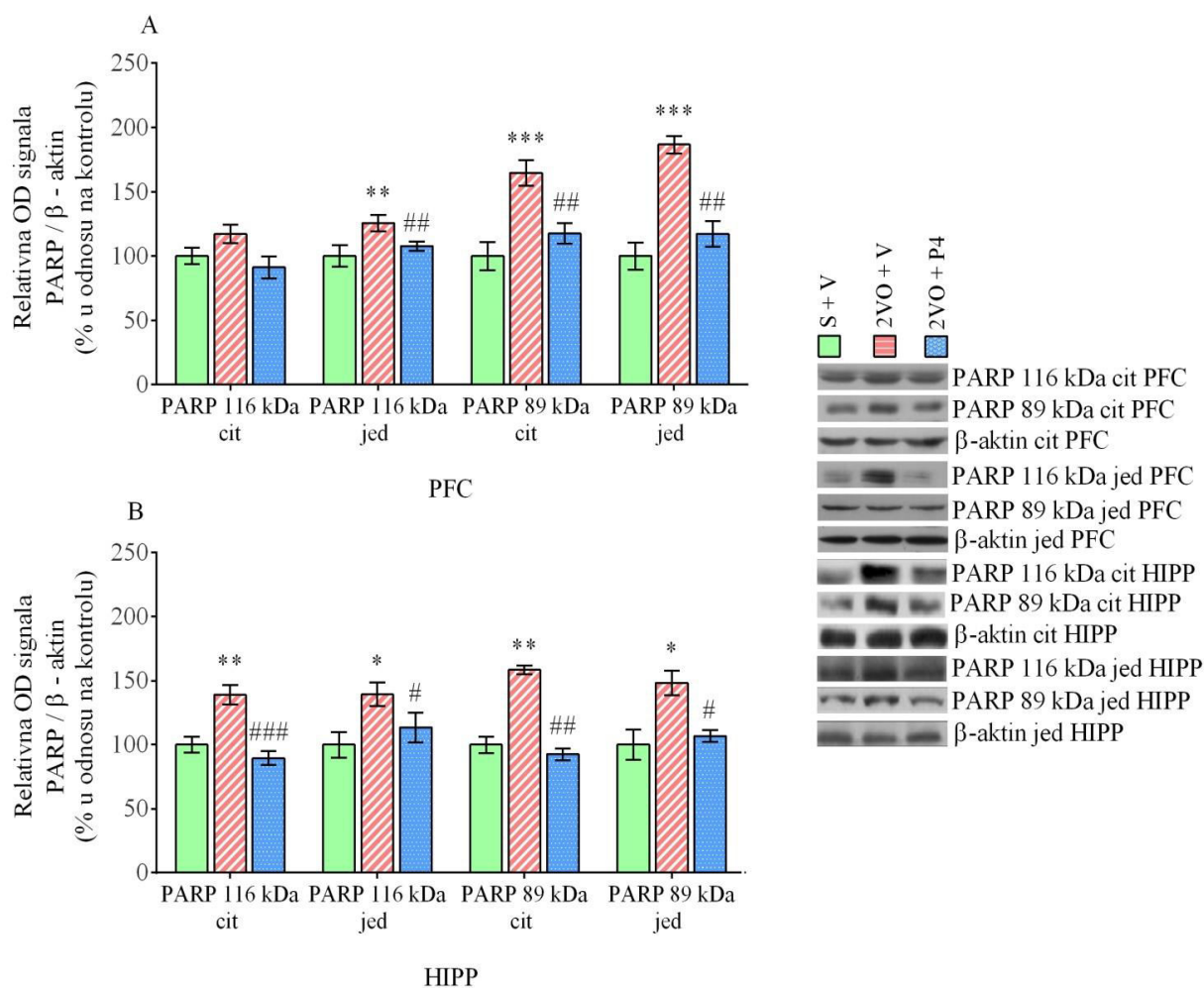
### 4.3.2. Ekspresija proteina citohrom C, kaspaza 3 i PARP

U obe moždane strukture, kod jedinki 2VO + V grupe, primećena je povećana ekspresija CitC, prokaspaze 3 i sećene kaspaze 3 u poređenju sa kontrolnim životinjama ( $p < 0.001$  za CitC i  $p < 0.01$  za prokaspazu 3 i sećenu kaspazu 3 u PFC; i  $p < 0.05$  za CitC i prokaspazu 3, kao i  $p < 0.01$  za sećenu kaspazu 3 u HIPP). Kod 2VO pacova koji su injecirani sa P4 7 dana, ekspresije ovih proteina bile su snižene ( $p < 0.05$  za CitC u PFC i HIPP i sećenu kaspazu 3 u PFC; i  $p < 0.01$  za prokaspazu 3 i sećenu kaspazu 3 u HIPP, kao i  $p < 0.001$  za prokaspazu 3 u PFC) i vraćene na kontrolne vrednosti (*Slika 9*).



**Slika 9.** Imunoblot analiza zastupljenosti pro-apoptotskih proteina (CitC, prokaspaze 3 i sećene kaspaza 3) u cit PFC, odnosno HIPP, nakon hirurških intervencija i tretmana. Rezultati su predstavljani kao srednje vrednosti  $\pm$  SEM za po 6 životinja u kontrolnoj, odnosno po 8 životinja u obe 2VO grupe i izražavani kao procenti od kontrole (sve vrednosti su normalizovane u odnosu na OD traka dobijenih za  $\beta$ -aktin). Statistički značajne razlike, dobijene iz merenja koja su rađena u duplikatu, određivane su testovima one-way ANOVA i Tukey post hoc. Simbol \* označava statistički značajnu razliku između S + V i obe 2VO grupe (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ), dok simbol # označava statistički značajnu razliku između 2VO grupa (# $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$ ).

Dobijeni rezultati ukazuju da, u poređenju sa kontrolama, u PFC trajno podvezivanje karotidnih arterija i tretman lanenim uljem nisu uticali na nivo PARP 116 kDa u cit, dok je nivo PARP 89 kDa povećan ( $p < 0.001$ ). Paralelno, u jed je uočeno povećanje PARP 116 kDa ( $p < 0.01$ ) i PARP 89 kDa ( $p < 0.001$ ). Tretman P4 smanjio je nivo PARP 89 kDa na kontrolnu vrednost u cit, kao i obe forme u jed ( $p < 0.01$ ) (*Slika 10. A*). U HIPP, nakon nametnute MH i tretmana lanenim uljem, nivo PARP 116 kDa i PARP 89 kDa su bili povećani u cit ( $p < 0.01$ ) i jed ( $p < 0.05$ ) u odnosu na kontrole, dok ih je tretman P4 snizio na kontrolne vrednosti ( $p < 0.05$  za PARP 116 kDa i PARP 89 kDa u jed,  $p < 0.01$  za PARP 89 kDa u cit i  $p < 0.001$  za PARP 116 kDa u cit) (*Slika 10. B*).

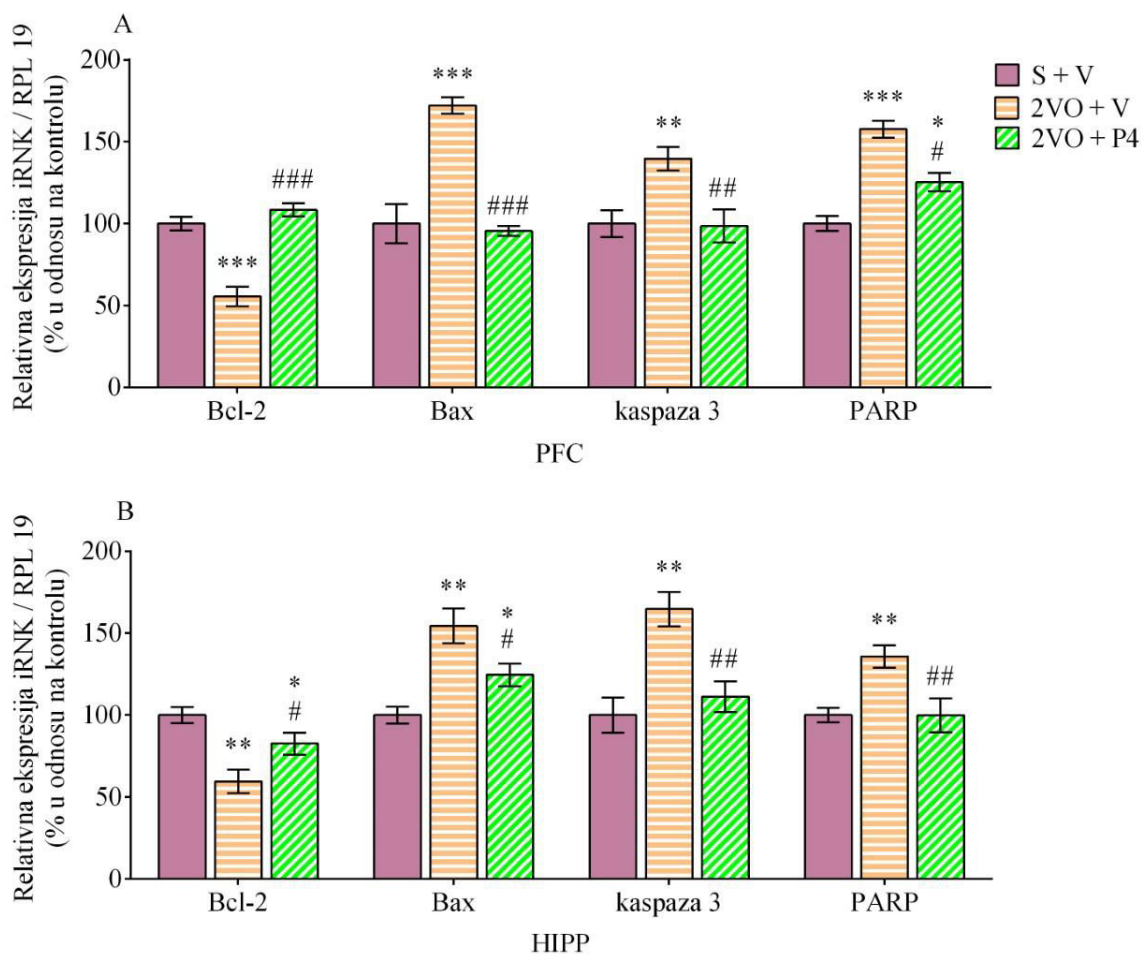


**Slika 10.** Imunoblot analiza zastupljenosti proteina PARP u cit i jed PFC, odnosno HIPP, nakon hirurških intervencija i tretmana. Rezultati su predstavljani kao srednje vrednosti  $\pm$  SEM za po 6 životinja u kontrolnoj, odnosno po 8 životinja u obe 2VO grupe i izražavani kao procenti od kontrole (sve vrednosti su normalizovane u odnosu na OD traka dobijenih za  $\beta$ -aktin). Statistički značajne razlike, dobijene iz merenja koja su rađena u duplikatu, određivane su testovima one-way ANOVA i Tukey post hoc. Simbol \* označava statistički značajnu razliku između S + V i obe 2VO grupe ( $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ), dok simbol # označava statistički značajnu razliku između 2VO grupa (#  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ , ###  $p < 0.001$ ).



### 4.3.3. Ekspresija apoptotskih gena

Na **Slici 11. A** ilustrovan je promena ekspresije gena u PFC. Uočeno je smanjenje nivoa *Bcl-2*, kao i povećanje *Bax*, *kaspaze 3* i *PARP* nakon nametnute MH i tretmana lanenim uljem u odnosu na kontrolne životinje ( $p < 0.01$  za *kaspazu 3* i  $p < 0.001$  za *Bcl-2*, *Bax* i *PARP*). Tretman P4 vratio je vrednosti ekspresije ispitivanih gena na kontrolni nivo ( $p < 0.01$  za *kaspazu 3*,  $p < 0.001$  za *Bcl-2* i *Bax*) osim za *PARP* ( $p < 0.05$ ). Kao što je prikazano na **Slici 11 B**, u HIPP, nametanje MH i tretman lanenim uljem snizili su nivo *Bcl-2* i povećali nivo *Bax*, *kaspaze 3* i *PARP* u odnosu na kontrolne životinje ( $p < 0.01$ ). Tretman P4 je povećao nivo *Bcl-2* i smanjio nivo *Bax* u odnosu na 2VO + V životinje ( $p < 0.05$ ), ali ne do kontrolne vrednosti ( $p < 0.05$ ). Nivo *kaspaze 3* i *PARP* vraćen je na kontrolnu vrednost nakon P4 tretmana ( $p < 0.01$ ).



**Slika 11.** Ekspresija apoptotskih gena (*Bcl-2*, *Bax*, *kaspaza 3* i *PARP*) u PFC, odnosno HIPP, nakon hirurških intervencija i tretmana određena RTqPCR metodom. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti  $\pm$  SEM za po 6 životinja u kontrolnoj, odnosno po 8 u 2VO grupama i izražavani kao procenti od kontrole (sve vrednosti su normalizovane u odnosu na RPL19). Statistički značajne razlike, dobijene iz merenja koja su rađena u duplikatu, određivane su testovima one-way ANOVA i Tukey post hoc. Simbol \* označava statistički značajnu razliku između S + V i obe 2VO grupe (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ), dok simbol # označava statistički značajnu razliku između 2VO grupa (#  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ , ###  $p < 0.001$ ).

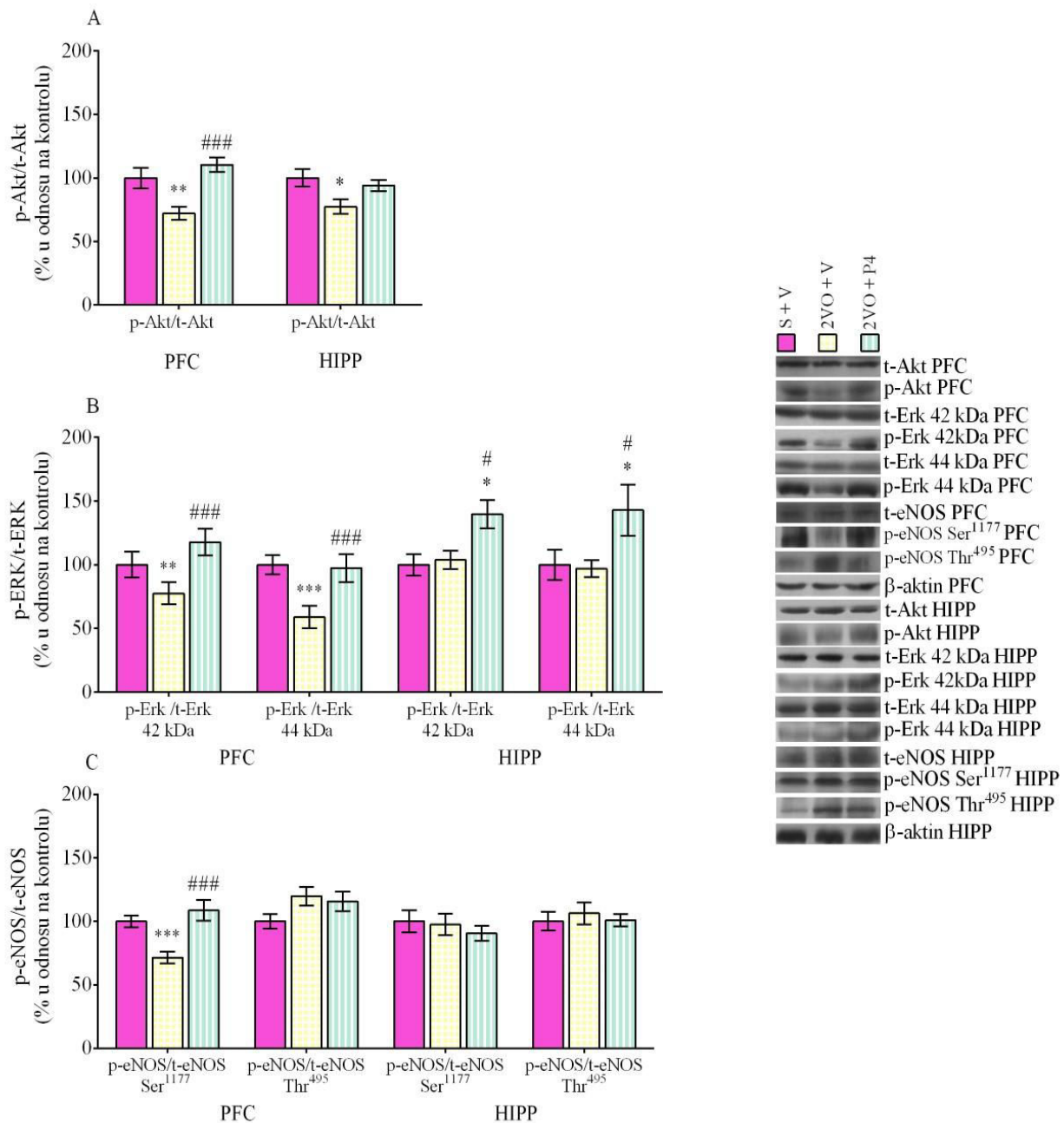
#### 4.3.4. Akt/Erk/eNOS/NO signalni put i ekspresija i distribucija PRA i PRB

Nivo proteinske ekspresije totalne i fosforilisane forme proteina Akt i Erk prikazan je u **Tabeli 8.**, dok je na **Slici 12.** prikazan relativni odnos totalnih i fosforilisanih formi koji ukazuje na aktivaciju/inaktivaciju ispitivanih molekula. Odnos p-Akt/t-Akt, je pokazao značajno smanjenje aktivnosti ove kinaze kao odgovor na trajno podvezivanje karotidnih arterija i tretman lanenim uljem u obe ispitivane strukture ( $p < 0.01$  u PFC i  $p < 0.05$  u HIPP) i povećanje fosforilacije nakon P4 tretmana koje je bilo statistički značajno u PFC ( $p < 0.001$ ) (**Slika 12. A**). Kao što je prikazano na **Slici 12. B**, u PFC je zapažena inaktivacija ispitivane kinaze predstavljena kroz smanjenje relativnog odnosa p-Erk/t-Erk obe izoforme kod jedinki 2VO + V grupe u odnosu na S + V ( $p < 0.01$  za p-Erk 42 kDa, odnosno  $p < 0.001$  za p-Erk 44 kDa), dok je ovaj odnos vraćen na kontrolni nivo nakon P4 tretmana ( $p < 0.001$ ). Paralelno, u HIPP, p-Erk/t-Erk bio je statistički značajno povećan kod obe izoforme samo u 2VO + P4 grupi ( $p < 0.05$ ).

Nivo proteinske ekspresije totalne i fosforilisanih formi eNOS proteina, kao nishodnog molekula Akt i/ili Erk, takođe je prikazan u **Tabeli 8.** U PFC, zapažene promene nivoa p-eNOS<sup>Ser1177</sup> su dovele do smanjenja relativnog odnosa p-eNOS<sup>Ser1177</sup>/t-eNOS ( $p < 0.001$ ), dok je p-eNOS<sup>Thr495</sup>/t-eNOS bio povećan, ali ne statistički, što ukazuje da trajno podvezivanje karotidnih arterija može dovesti do inaktivacije ispitivanog molekula u PFC (**Slika 12. C**). Kod 2VO + P4 životinja, odnos fosfo/total forme bile su na istom nivou kao kod kontrolnih jedinki ( $p < 0.001$ ) (**Slika 12. C**). S druge strane, bez obzira na detektovane promene pojedinačnih proteina, odnosi p-eNOS<sup>Ser1177</sup>/t-eNOS i eNOS<sup>Thr495</sup>/t-eNOS u HIPP bili su nepromenjeni u svim eksperimentalnim grupama (**Slika 12. C**). Upravo, praćenje promena eNOS bilo je od značaja budući da su prethodno predstavljeni rezultati za nivo NO u ukupnom ćelijskom ekstraktu pokazali regionalno-specifičan odgovor moždanih struktura na hirurške intervencije i tretman. Analiza nivoa NO u cit pokazala je isti obrazac ponašanja (**Tabela 8.**), potvrđujući ranije detektovane promene. Predstavljeni rezultati ukazuju na regionalno-specifičan odgovor moždanih struktura u zavisnosti od hirurške intervencije i tretmana ne samo za eNOS, već i za nivo NO kako u ukupnom ćelijskom ekstraktu (**Slika 12. C**), tako i u cit (**Tabela 8.**).

**Tabela 8.** Imunoblot analiza zastupljenosti totalne, nefosforilisane, i fosforilisane forme molekula uključenih u apoptotske signalne puteve (Akt, Erk 42/44 kDa i eNOS), kao i nivo NO određivan pomoću Griess-ove metode u cit PFC i HIPP nakon hirurških intervencija i tretmana. Rezultati su predstavljani kao srednje vrednosti  $\pm$  SEM za po 6 životinja u kontrolnoj, odnosno po 8 životinja u obe 2VO grupe i izražavani kao procenti od kontrole (za imunoblot analizu OD vrednosti pojedinačnih proteina su normalizovane u odnosu na OD traka dobijenih za  $\beta$ -aktin). Statistički značajne razlike, dobijene iz merenja koja su rađena u duplikatu, određivane su testovima one-way ANOVA i Tukey post hoc. Simbol \* označava statistički značajnu razliku između S + V i obe 2VO grupe (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ), dok simbol # označava statistički značajnu razliku između 2VO grupa (# $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$ ).

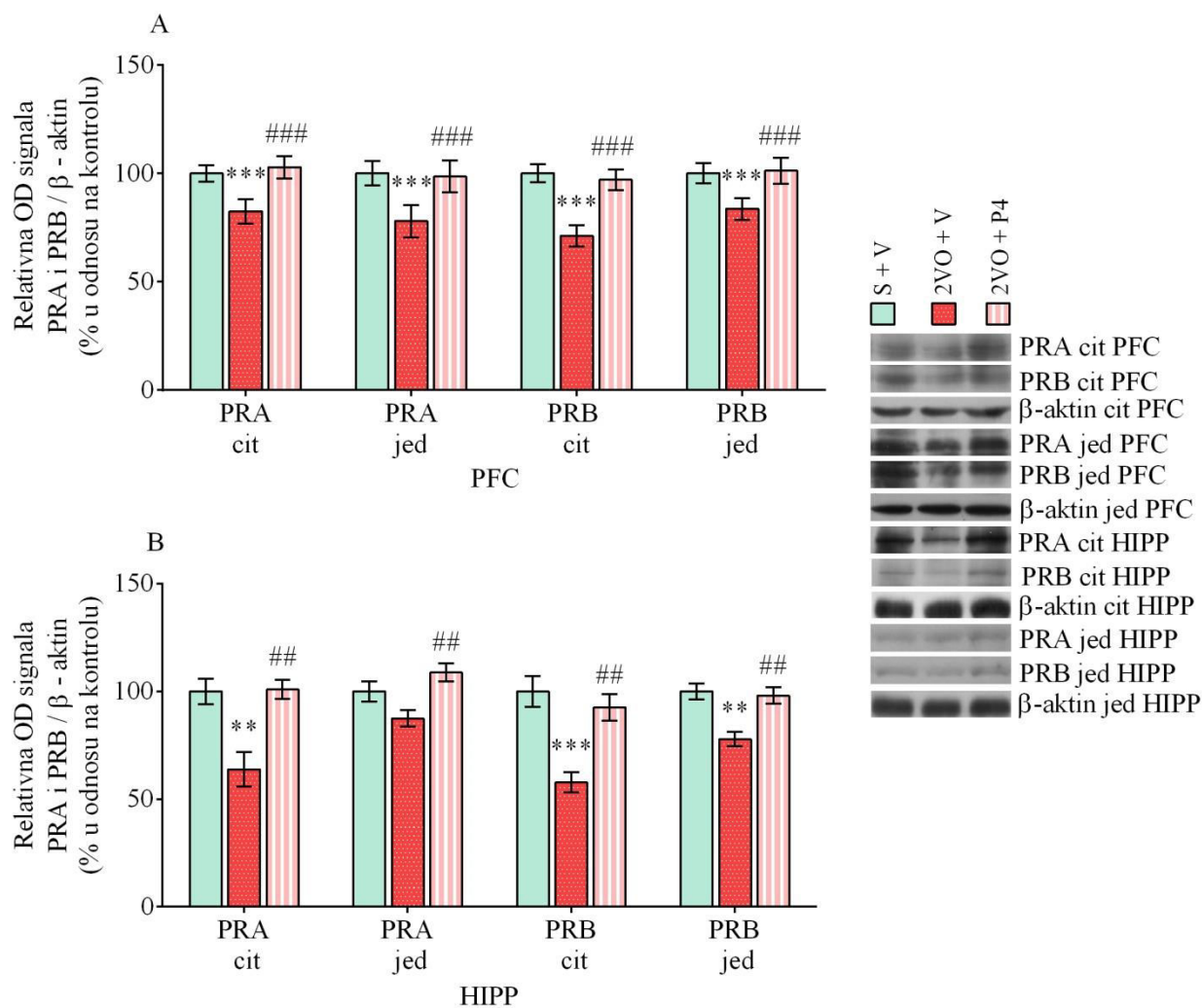
Protein/ $\beta$ -aktin	PFC			HIPP		
	S + V	2VO + V	2VO + P4	S + V	2VO + V	2VO + P4
t-Akt	100 $\pm$ 8.75	105.63 $\pm$ 7.93	95.11 $\pm$ 8.34	100 $\pm$ 3.19	99.4 $\pm$ 4.78	115.10 $\pm$ 6.73
p-Akt	100 $\pm$ 6.15	76.26 $\pm$ 5.66**	105.03 $\pm$ 9.35###	100 $\pm$ 7.09	76.45 $\pm$ 5.25*	107.30 $\pm$ 5.51##
t-Erk 42kDa	100 $\pm$ 5.30	96.09 $\pm$ 7.54	90.34 $\pm$ 6.83	100 $\pm$ 6.52	99.63 $\pm$ 3.53	92.28 $\pm$ 9.21
p-Erk 42kDa	100 $\pm$ 6.64	74.48 $\pm$ 4.87*	106.42 $\pm$ 7.82###	100 $\pm$ 6.29	104.59 $\pm$ 7.44	125.8 $\pm$ 8.36*#
t-Erk 44kDa	100 $\pm$ 4.45	95.42 $\pm$ 8.37	97.45 $\pm$ 5.7	100 $\pm$ 8.64	89.62 $\pm$ 9.35	103.36 $\pm$ 11.36
p-Erk 44kDa	100 $\pm$ 6.9	56.21 $\pm$ 9.45***	94.96 $\pm$ 9.02##	100 $\pm$ 10.13	87.73 $\pm$ 7.32	138.46 $\pm$ 7.75*##
t-eNOS	100 $\pm$ 4.01	104.35 $\pm$ 5.31	96.01 $\pm$ 5.28	100 $\pm$ 6.43	111.71 $\pm$ 7.97	115.70 $\pm$ 5.42
p-eNOS Ser1177	100 $\pm$ 2.22	72.40 $\pm$ .40***	97.87 $\pm$ 4.46###	100 $\pm$ 5.15	108.52 $\pm$ 6.90	105.84 $\pm$ 5.35
p-eNOS Thr495	100 $\pm$ 3.19	119.88 $\pm$ 3.46**	105.49 $\pm$ 3.78#	100 $\pm$ 4.63	116.11 $\pm$ 4.18*	117.14 $\pm$ 2.46*
NO	100 $\pm$ 4.95	54.66 $\pm$ 8.05***	104.70 $\pm$ 7.41###	100 $\pm$ 4.68	149.27 $\pm$ 6.42***	128.44 $\pm$ 5.15*##



**Slika 12.** Imunoblot analiza relativnog odnosa totalne, nefosforilisanе, i fosforilisanе forme molekula uključenih u apoptotske signalne puteve (Akt, Erk 42/44 kDa i eNOS) u cit PFC, odnosno HIPP, nakon hirurških intervencija i tretmana. Rezultati su predstavljani kao srednje vrednosti ± SEM za po 6 životinja u kontrolnoj, odnosno po 8 životinja u obe 2VO grupe i izražavani kao procenti od kontrole (sve vrednosti su normalizovane u odnosu na OD traka dobijenih za β-aktin). Statistički značajne razlike, dobijene iz merenja koja su rađena u duplikatu, određivane su testovima one-way ANOVA i Tukey post hoc. Simbol \* označava statistički značajnu razliku između S + V i obe 2VO grupe (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ), dok simbol # označava statistički značajnu razliku između 2VO grupa (#  $p < 0.05$ , ###  $p < 0.001$ ).



Kao što je prikazano na *Slici 13.*, kod 2VO jedinki tretiranih lanenim uljem zapaža se smanjenje ekspresije obe izofome PR (PRA i PRB) u obe subćelijske frakcije PFC ( $p < 0.001$ ), dok je P4 tretman doveo do povećanja ekspresije ovih proteina ( $p < 0.001$ ) i vratio ih na kontrolnu vrednost (*Slici 13. A*). Paralelno, u HIPP 2VO + V grupe, ekspresije PRA i PRB su bile smanjene u obe ispitivane frakcije ( $p < 0.01$ , za PRA u cit i PRB u jed, odnosno,  $p < 0.001$ , za PRB u cit), mada PRA u jed nije bila statistički značajno promenjena. U 2VO + P4 grupi, ekspresija obe izoforme PR je povećana u odnosu na 2VO + V ( $p < 0.01$ ), odnosno, vraćena je na nivo kod lažno operisanih životinja tretiranih lanenim uljem (*Slika 13. B*).

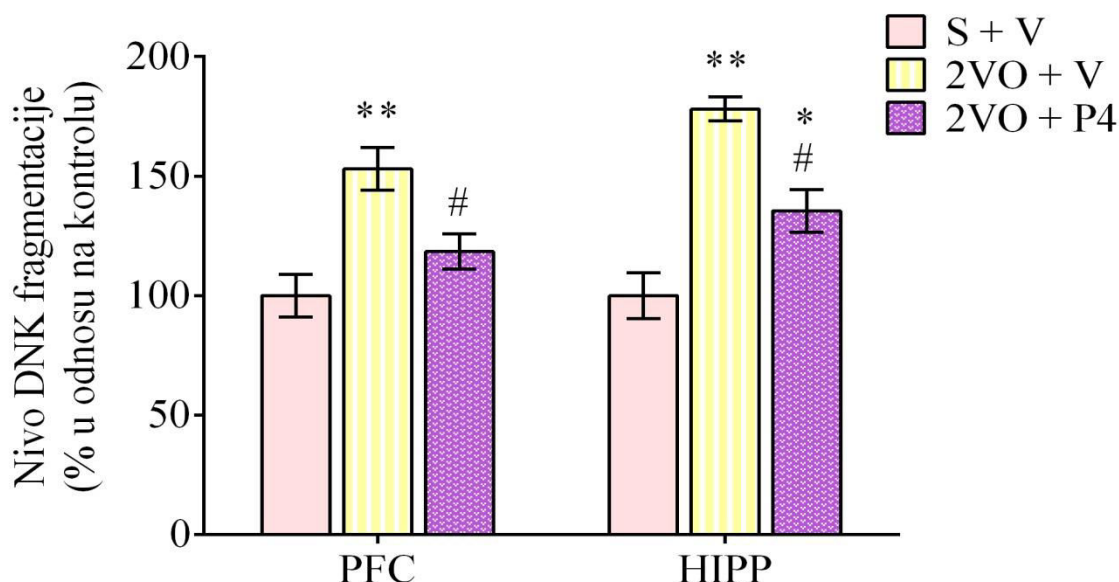


**Slika 13.** Imunoblot analiza zastupljenosti proteina PRA i PRB u cit i jed PFC, odnosno HIPP, nakon hirurških intervencija i tretmana. Rezultati su predstavljani kao srednje vrednosti  $\pm$  SEM za po 6 životinja u kontrolnoj, odnosno po 8 životinja u obe 2VO grupe i izražavani kao procenti od kontrole (sve vrednosti su normalizovane u odnosu na OD traka dobijenih za  $\beta$ -aktin). Statistički značajne razlike, dobijene iz merenja koja su rađena u duplikatu, određivane su testovima one-way ANOVA i Tukey post hoc. Simbol \* označava statistički značajnu razliku između S + V i obe 2VO grupe (\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ), dok simbol # označava statistički značajnu razliku između 2VO grupa (##  $p < 0.01$ , ###  $p < 0.001$ ).

### 4.3.5. Procena nivoa ćelijske smrti, kao i morfoloških karakteristika ćelija PFC i HIPP

#### DNK fragmentacija

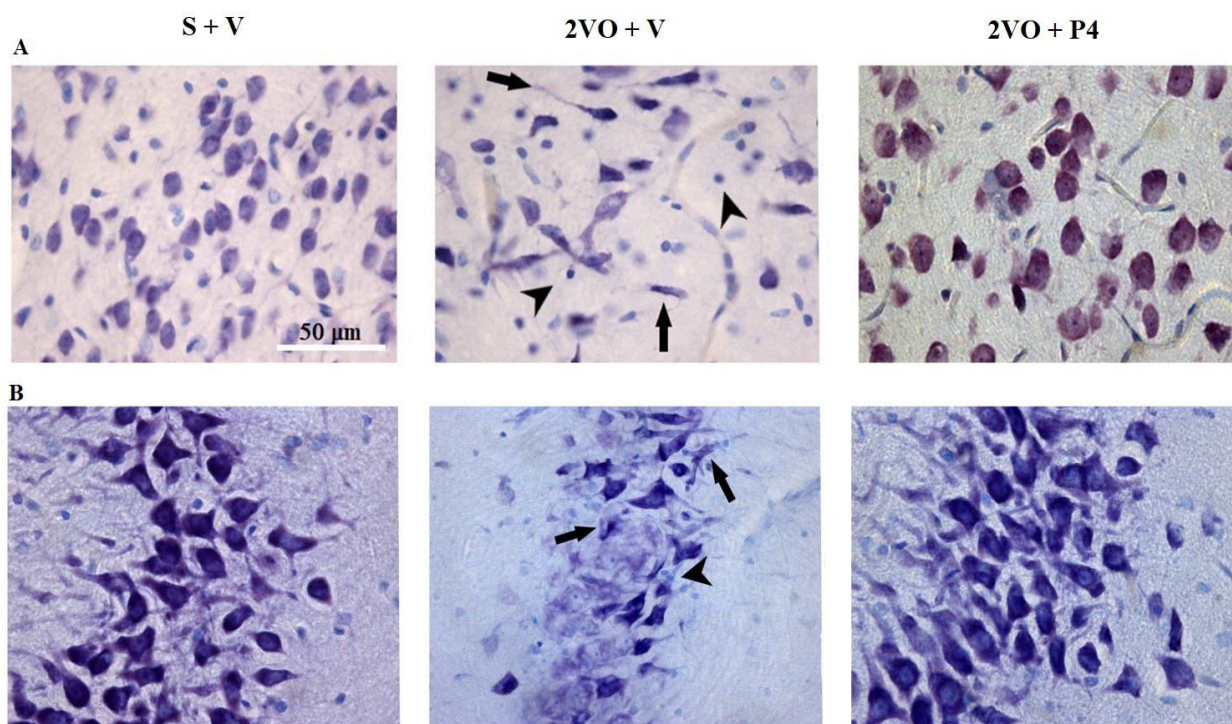
Nivo fragmentacije DNK u obe ispitivane moždane strukture bio je znatno viši u odnosu na kontrolne životinje ( $p < 0.01$ ), dok je tretman P4 snizio nivo fragmentacije u odnosu na 2VO + V životinje ( $p < 0.05$ ). Ipak, u HIPP, nivo DNK fragmentacije je i dalje bio statistički značajno povećan u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0.05$ ) (*Slika 14.*).



**Slika 14.** Nivo DNK fragmentacije u PFC, odnosno HIPP, nakon hirurških intervencija i tretmana praćen DNK fragmentacionim esejom. Rezultati su predstavljani kao srednje vrednosti  $\pm$  SEM za po 6 životinja u kontrolnoj, odnosno po 8 životinja u obe 2VO grupe i izražavani kao procenti od kontrole. Statistički značajne razlike, dobijene iz merenja koja su rađena u duplikatu, određivane su testovima one-way ANOVA i Tukey post hoc. Simbol \* označava statistički značajnu razliku između S + V i obe 2VO grupe ( $* p < 0.05$ ,  $** p < 0.01$ ), dok simbol # označava statistički značajnu razliku između 2VO grupa ( $# p < 0.05$ ).

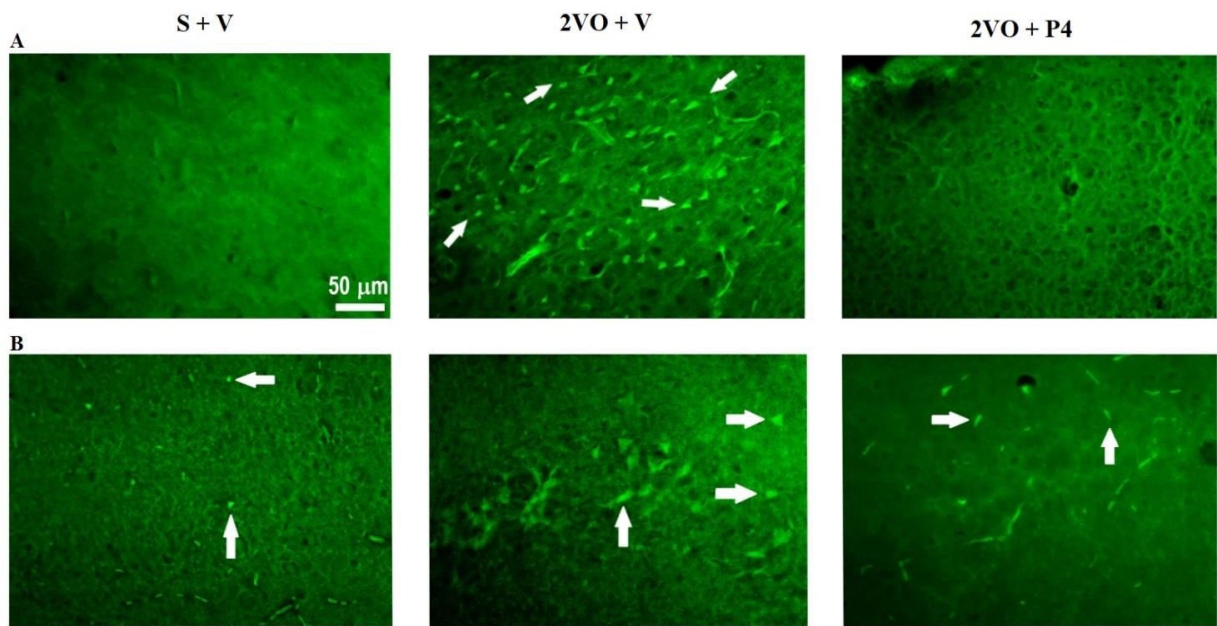
#### Histološke analize

Bojenje tioninom ukazalo je na morfološke promene nervnih ćelija obe moždane strukture nakon podvezivanja zajedničkih karotidnih arterija i tretmana lanenim uljem u odnosu na lažno operisane pacove i one koji su injecirani sa P4. Naime, jedinke S + V grupe imale su nenarušene strukture ćelija PFC i HIPP, koje su se ogledale u jasno definisanim ćelijskim telima, sa okruglim jedrima, istaknutim nukleolusom i vidljivim Nissl-ovim telima (*Slika 15.*, levi panel). S druge strane, u 2VO + V grupi uočeni su neuroni sa nepravilno raspoređenom Nissl-ovom supstancom u sloju III PFC i CA3 sektoru HIPP (*Slika 15.*, srednji panel). Kao što je prikazano na desnom panelu *Slike 15.* u PFC 2VO + P4 grupe, primećeni su neuroni sa pravilnom morfologijom ćelija i vidljivom, pravilno raspoređenom Nissl-ovom supstancom, iako su neki neuroni bili tamnije boje, nalik onim opaženim u 2VO + V, dok je u CA3 sektoru HIPP i dalje bile su prisutne ćelije sa izmenjenom morfologijom.



**Slika 15.** Reprezentativne mikrografije PFC (A) i HIPP (B) pacova podvrgnutih hirurškoj proceduri i tretmanu za po 3 životinje po eksperimentalnoj grupi dobijene tioninskim bojenjem, pri uveličanju od 630  $\times$ . Lažno operisane životinje tretirane lanenim uljem (S + V, levi panel), životinje sa trajno podvezanim karotidnim arterijama tretirane lanenim uljem (2VO + V, srednji panel), životinje sa trajno podvezanim karotidnim arterijama tretirane progesteronom (2VO + P4, desni panel). Čelije sa izmenjenom morfologijom su obeležene strelicama, a glavama strelica gliške ćelije.

Kao što je prikazano na **Slici 16. A**, FJC-pozitivne ćelije bile su retke u PFC kontrolnih životinja (gornji panel, levo), dok je svetlo zeleni signal (ćelije pozitivne na FJC bojenje) uočen u sloju III u PFC 2VO + V grupe (gornji panel, sredina). Kod životinja podvrgnutih trajnoj MH i tretmanu sa P4, FJC-pozitivne ćelije su ipak bile detektovane, s tim da treba istaći da su bile mnogo manje zastupljene u odnosu na drugu 2VO grupu tretiranu lanenim uljem, odnosno, da su bile na istom nivou kao kod lažno operisanih jedinki u PFC (gornji panel, desno). S druge strane, kod kontrolnih jedinki u HIP, FJC-pozitivne ćelije su bile retke (donji panel, levo), dok su se FJC-pozitivne ćelije češće pojavljivale u obe 2VO grupe (donji paneli, sredina i desno). Primena P4 terapije je uzrokovala smanjenje pojavljivanja FJC-pozitivnih ćelija u odnosu na drugu 2VO grupu.



**Slika 16.** Reprezentativne mikrografije PFC (A) i HIPP (B) pacova podvrgnutih hirurškoj proceduri i tretmanu za po 3 životinje u eksperimentalnoj grupi dobijene FJC bojenjem, pri uveličanju od 200 ×. Lažno operisane životinje tretirane lanenim uljem (S + V, levi panel), životinje sa trajno podvezanim karotidnim arterijama tretirane lanenim uljem (2VO + V, srednji panel), životinje sa trajno podvezanim karotidnim arterijama tretirane progesteronom (2VO + P4, desni panel). Čelije sa izmenjenom morfologijom su obeležene strelicama.

***DISKUSIJA***



Prethodne studije imale su za cilj proučavanje efekata trajne MH praćenjem tkivno-specifičnog i vremenski-zavisnog odgovora (Stanojlović i sar., 2014a,b,c). Naime, potvrđeno je da su PFC i HIPP strukture osetljive na narušavanje moždanog krvotoka što se ogleda u izraženom regionalno-specifičnom odgovoru 3. i 7. dan nakon primenjenog hirurškog zahvata. S druge strane, 90 dana nakon podvezivanja karotida uspostavljaju se adaptivni i kompenzatorni mehanizmi, usled kojih se svi praćeni parametri vraćaju na kontrolni nivo. Upravo zbog činjenice da je 7. dan nakon operacije prepoznat kao vremenska tačka u kojoj je pokazana najviša podudarnost sa oštećenjima koja nastaju usled dugotrajne MH kod ljudi (Farkas i sar., 2007; Stanojlović i sar., 2014a,b,c), u ovoj doktorskoj disertaciji je proučavan regionalno-specifičan odgovor na tretman P4 nakon nametanja MH. Ovaj neurosteroid je izabran s obzirom na to da je u različitim eksperimentalnim model sistemima pokazao širok spektar delotvornih dejstava. Na primer, primećeno je ograničeno oštećenje tkiva i poboljšanje funkcionalnog ishoda nakon TPM, moždanog udara, povreda kičmene moždine, dijabetičke neuropatije i drugih tipova akutnih povreda neurona kod nekoliko životinjskih vrsta (Stein, 2008). Upravo u tim modelima je pokazano da P4 štiti i/ili obnavlja KMB, smanjuje otok mozga, upalnu kaskadu, kao i OS i apoptozu (Roof i sar., 1997; Wright i sar., 2001; He i sar., 2004; Pettus i sar., 2005; Guo i sar., 2006; Leonelli i i sar., 2007; Stein, 2008). S obzirom na oskudnost literaturnih podataka o učinku P4 nakon MH, istraživanja ove doktorske disertacije bila su fokusirana na promene koje se dešavaju kod mužjaka pacova koji imaju nizak i stabilan nivo cirkulišućeg P4 što ih dodatno čini pogodnim za ispitivanje uticaja hormona (Stein, 2008; Liu i sar., 2012).

### **5.1. Regionalno-specifične promene parametara oksidativnog/nitrozativnog stresa i komponenti anti-oksidativne zaštite**

Smanjenje protoka krvi kroz moždano tkivo može dovesti do oštećenja u različitim moždanim regionima, uključujući koru i HIPP. Jedan od mogućih razloga nastanka tih oštećenja može biti i OS/NS koji se u ćeliji javlja usled povećanog stvaranja ROS/RNS (i drugih) i njihovog neadekvatnog uklanjanja. Upravo je OS/NS široko prihvaćen kao važna karakteristika mnogih neuroloških poremećaja poput AB, PB, multiple skleroze i shizofrenije (Yao i sar., 2004; Cenini i sar., 2008; Tsang i Chung, 2009; Singh i sar., 2019), jer mozak pokazuje visoku osetljivost na dejstvo reaktivnih vrsta usled velike potrebe za kiseonikom, niskog kapaciteta AO zaštite i visokog nivoa PUFAs (Cenini i sar., 2019). Oksidativni disbalans u ćeliji može se detektovati primenom relativno novog PAB eseja. Ovaj parametar ravnoteže između pro- i anti-oksidanata, odabran je u ovoj doktorskoj disertaciji s obzirom na to da su ranija istraživanja pokazala znatno povećanje njegovog nivoa kod stanja akutne moždane ishemije, kao i da se može koristiti kao prediktivni marker ishoda bolesti (Kotur-Stevuljevic i sar., 2015). Štaviše, utvrđeno je da uvećanje PAB za samo jednu jedinicu povećava 1028 puta mogućnost za smrtni ishod, a primećeno je i da je u pozitivnoj korelaciji sa drugim parametrima OS, poput MDA (Kotur-Stevuljevic i sar., 2015). Treba istaći da trenutno ne postoje podaci o regionalno-specifičnom dejstvu P4 na PAB u stanju nametnute trajne MH, te su ovi rezultati za sada prvi koji ukazuju na sposobnost P4 da održi pro-/anti-oksidativnu ravnotežu, makar u PFC, dok povišena vrednost PAB u HIPP sugeriše da je ova moždana struktura i dalje izložena dejstvu OS/NS.

Primećeni pomeraj ka pro-oksidativnom stanju u moždanoj ishemiji je najverovatnije izazvan nastankom većih količina reaktivnih vrsta (Phaniendra i sar., 2015) u obe moždane strukture od interesa. Pokazano je da se tokom moždane ishemije aktivira XDH i konvertuje u XOD, jedan od glavnih izvora ROS, odnosno  $O_2^-$  (Ganesana i sar., 2012). Pored povećanja nivoa reaktivnih vrsta, literaturni podaci ukazuju na vezu povećane aktivnosti XOD i povrede tkiva hipoksičnih organa i usled intenzivirane hidrolize adeninskih nukleotida posredovane ovim enzimom. XOD je odgovorna i za nastanak mokraćne kiseline koja ispoljava značajna AO svojstva, a čije je povećanje opisano kao sporedni efekat pro-oksidativnog delovanja XOD u modelima ishemije-reperfuzije i hipoksije kada dolazi do intenzivne ATP hidrolize i prekomernog nastanka reaktivnih vrsta (Nikolić i sar., 2006). Primećeno je i da aktivnost XOD može biti indukovana niskim dozama estrogena u

endotelnim ćelijama i da se među polovima mogu primetiti razlike u nivou mokraćne kiseline, nastale njenim radom (Malorni i sar., 2007), iako nije poznat tačan mehanizam dejstva koji ispoljavaju polni hormoni na ovaj enzim. U ovoj eksperimentalnoj postavci, u PFC nisu zapažene promene aktivnosti XOD ni u stanju ishemije, ni nakon tretmana P4. Uzimajući u obzir da su nivoi PAB i produkata LPO bili povišeni, ali i ostale rezultate, jedan od razloga za pojavu OS i nishodno aktiviranje pro-apoptotske kaskade u stanju nametnute MH u PFC, je mogućnost da neki drugi enzim uzrokuje stvaranje reaktivnih vrsta, poput NADPH-oksidaze čija je i jedina, do sada, poznata uloga u ćeliji da stvara ROS (Wind i sar., 2010). Pokazano je da OS koji uzrokuje NADPH-oksidaza u neurodegenerativnim bolestima, poput VAD (Choi i Lee, 2017) i AB (Salvadores i sar., 2017), igra ključnu ulogu u patofiziologiji smanjenja kognicije izazvane ishemijom i oštećenjem mozga (Dong i sar., 2011). Suprotno, u HIPP je nakon nametanja trajne MH primećena povećana aktivnost XOD. Ona, sa jedne strane, može samostalno ili zajedno sa drugim pro-oksidativnim enzimima doprineti pojavi oksidativnog miljea koji, iako smanjen, nije dostigao kontrolni nivo 7-dnevnim tretmanom P4. Povećana aktivnost XOD, s druge strane, može biti posledica i AO svojstva ovog enzima čime on doprinosi pojačanom intenzitetu biohemijske odbrane ćelija i uklanjanju reaktivnih vrsta koje nastaju njegovim radom. Iako o smeru ka kome uočena povišena aktivnost XOD u HIPP vodi ćeliju svedoče i rezultati ostalih ispitivanih parametara, potrebne su dodatne analize kojima bi se definisala tačna uloga XOD u zadatim eksperimentalnim uslovima.

Proizvodnja reaktivnih vrsta usko je povezana sa stvaranjem NO, što se može primetiti i u endotelnim ćelijama izloženim poremećenom protoku krvi (Hsieh i sar., 2014). Kod pacijenata obolelih od AB i onih koji su preživeli akutnu moždanu ishemiju, primećeno je da se količina NO menja (Dawson i Dawson, 1996; Iadecola, 1997). I u ovoj doktorskoj disertaciji je uočena regionalno-specifična promena nivoa NO, odnosno, smanjena je količina NO u PFC, dok je u HIPP detektovano povećanje njegovog nivoa nakon nametanja MH. Dodatno, literaturni podaci ukazuju i da nivo NO može varirati pod uticajem steroidnog hormona P4 (Chang i sar., 2014; Simoncini i sar., 2007). Interesantno je da je nakon aplikacije P4 količina NO dovedena na kontrolni nivo samo u PFC, ali ne i u HIPP, gde je ona bila i dalje povećana u odnosu na kontrolne jedinice ukazujući na postojanje i NS u ovoj moždanoj strukturi i nakon primene potencijalnog terapeutika. Razlog za ovakvu razliku odgovora među strukturama može proisticati iz razlike u ćelijskom metabolizmu i neurotransmitterskom profilu moždanih struktura (Kumari Naga i sar., 2007), kao i iz činjenice da NO ima dualnu prirodu, ispoljava i protektivna, ali i štetna dejstva, te da balans između dva načina delovanja zavisi od količine i trajanja NO proizvodnje, ali i izoforme NOS koja ga proizvodi i lokalizacije te izoforme u ćeliji (Mracsó i sar., 2010). Naime, NO potekao od eNOS štiti KMB, uspostavlja post-ishemični krvotok vazodilatacijom i inhibicijom agregacije trombocita i adhezije leukocita, a može i prekinuti lančane reakcije tokom peroksidacije lipida, ublažiti OS/NS, čime doprinosi neuroprotektivnim efektima nakon ishemije mozga (Moro i sar., 2004; Moore i sar., 2011; Pang i sar., 2015; Chen i sar., 2017). S druge strane, literaturni podaci ukazuju na to da smanjena aktivnost kod eNOS-deficijentnih miševa (eNOS<sup>-/-</sup>) ili korišćenje eNOS-specifičnih inhibitora, snižava nivo NO i dovodi do hipertenzije, značajno smanjujući protok krvi kroz mozak, što uzrokuje obimniji infarkt i teže ishemijske povrede (Chen i sar., 2017; Wang i sar., 2017). Treba istaći da aktivnost eNOS zavisi od mesta fosforilacije. Tako, izlaganje ćelija vaskularnom endotelnom faktoru rasta, insulinu, bradikininu, ali i estrogenu i P4 dovodi do fosforilacije na Ser<sup>1177</sup> i aktivacije eNOS i povećane sinteze protektivnog NO, dok fosforilacija na Thr<sup>495</sup>, obično pokrenuta OS, izaziva inhibiciju sinteze NO (Chen i sar., 2008; Khorram i Han, 2009; Forstermann i Sessa, 2012; Yousuf i sar., 2017). Uzimajući u obzir da je u PFC nakon narušavanja protoka krvi kroz mozak primećeno smanjenje nivoa NO koje se podudaralo sa smanjenjem fosforilacije eNOS na Ser<sup>1177</sup> i odsustvom promena na Thr<sup>495</sup>, a da je tretman P4 doveo do vraćanja na kontrolnu vrednost promenjenih parametara, može se pretpostaviti da P4 ima potencijalno protektivno dejstvo u PFC, usled pokušaja da uspostavi ishemijom narušenu cirkulaciju. S druge strane, u HIPP je pokazano povećanje nivoa NO u obe 2VO grupe bez obzira na tretman, koje ne potiče od eNOS budući da su njegova ekspresija i nivo fosforilacije bili nepromenjeni. Sličan trend ekspresije

totalne forme eNOS kod odraslih mužjaka pacova nakon nametanja trajne MH u HIPP detektovali su i Mracskó i saradnici (2010), koji su pokazali da 7 dana nakon nametanja trajne MH nivo ovog proteina, iako promenjen, nije statistički značajno povećan (Mracskó i sar., 2010). Osim eNOS i drugi članovi NOS familije mogu generisati NO. Primećeno je da NO poreklom od iNOS ili nNOS uzrokuje oksidativna oštećenja formiranjem reaktivnih vrsta koje dovode do proteinske nitracije i disfunkcionalnosti ćelije, kao i endotelnog narušavanja u zavisnosti od primenjenog eksperimentalnog modela, ali i vremena posmatranja (Mracskó i sar., 2010; Matsubara i sar., 2015; Chen i sar., 2017). Kod pacova, ekspresija iNOS u kori i HIPP je bila nepromenjena nedelju dana nakon nametanja trajne MH (Mracskó i sar., 2010), dok je nakon TPM, iNOS eksprimiran maksimalno 1 do 2 dana (Garry i sar., 2015). Imajući u vidu da P4 ima sposobnost da reguliše ekspresiju pojedinih izoformi NOS nakon moždane ishemije (Gibson i sar., 2005), ali i uz činjenicu da je nNOS konstitutivno eksprimiran, te da se tokom MH njegova proizvodnja indukuje transkripcionim faktorima aktiviranim ishemijom (Wang i sar., 1999), može se naslutiti da je u HIPP, upravo, nNOS odgovoran za produkciju NO u obe 2VO grupe. Sumiranjem rezultata, može se pretpostaviti da je u zadatim eksperimentalnim uslovima PFC izložen dejstvu OS, a da je HIPP nakon nametanja trajne MH izložen ne samo prekomerno produkovanim ROS, već i RNS.

Literaturni podaci ističu da peroksidacija lipida dejstvom reaktivnih vrsta dovodi do samopropagacije njihove reakcije što vodi nastanku lipidnih radikala. Dva lipidna radikala reaguju i formiraju jedne od najčešće proučavanih produkata LPO, aldehide. Najpoznatiji aldehidi su 4-hidroksi-2-nonenal (4-HNE) i malondialdehid (MDA) (Frijhoff i sar., 2015; Gaschler i Stockwell, 2017). Produkti kao što su MDA i nesaturisani aldehidi inaktiviraju mnoge ćelijske proteine (Hagihara i sar., 1984), dok 4-HNE izaziva brzo smanjenje unutarćelijskog GSH, što takođe dovodi do stvaranja peroksida (Kelly i Mudway, 2003). Povišen nivo produkata LPO je primećen kod ljudi nakon moždanog udara (Selaković i sar., 2002; Ferretti i sar., 2008), kao i u modelu moždane ishemije kod pacova (Yamamoto i sar., 1983; Bromont i sar., 1989), te se smatra da ima važnu ulogu u ćelijskoj smrti izazvanoj ishemijom. U ovoj doktorskoj disertaciji je pokazano da povišena LPO izazvana trajnim podvezivanjem karotidnih arterija može biti smanjena delovanjem P4, makar u PFC, što je u skladu sa literaturnim podacima o neuroprotektivnim svojstvima P4 kako u modelima globalne moždane ishemije (Aggarwal i sar., 2008; Ozacmak i Sayan, 2009; Ishihara i sar., 2015), tako i u drugim eksperimentalnim modelima, poput TPM i subarahnoidne hemoragije (SAH) (Roof i sar., 1997; Djebaili i sar., 2005; Stein, 2008; Cai i sar., 2015). Iako P4 nema karakterističnu hemijsku strukturu anti-oksidanta visok nivo ovog hormona smanjuje oštećenja izazvana slobodnim radikalima i produktima LPO u homogenatima mozga i mitohondrija (Roof i sar., 1997; Goodman i sar., 2002), što može objasniti dejstvo P4 primećeno u PFC nakon nametanja trajne MH. Wei i Xiao (2013) su sugerisali da P4 može smanjiti LPO blokiranjem stvaranja slobodnih radikala i povećanjem efikasnosti njihove eliminacije regulacijom enzima AO zaštite što može pomoći u održavanju integriteta membrane i stabilnosti KMB povećavajući preživljavanje ćelija nakon povrede mozga (Wei i Xiao, 2013). S druge strane, povišene vrednosti produkata LPO u HIPP i nakon tretmana hormonom ukazuju na regionalno-specifičan odgovor ispitivanih moždanih struktura usled štetnog dejstva MH i nemogućnost potpunog uklanjanja reaktivnih vrsta primenom P4. Dobijeni rezultati za HIPP su, pak, u skladu sa studijama u kojima je primećeno ne samo odsustvo efekta P4, nego i negativni uticaj ovog hormona u uslovima povećanog nivoa OS/NS. Naime, primećeno je da P4 ne menja intenzitet ishemijskog OS kod pacova u modelu ishemije izazvane dekapitacijom (Ishihara i sar., 2015). Osim toga, pokazano je da klinički primenjivan, sintetički progestinski hormon (medroksiprogesteron) ispoljava negativne efekte na AO učinke 17 $\beta$ -estradiola, poput narušavanja 17 $\beta$ -estradiolom-indukovane ekspresije MnSOD i peroksiredoksina V, smanjenja LPO i pojačavanja respiracije mitohondrija u primarnim kulturama HIPP neurona i glijskih ćelija (Irwin i sar., 2011). Dodatno, Ozacmak i saradnici (2009) su primetili da polni hormoni pokazuju regionalno-specifičan odgovor na LPO u mozgu pacova (Ozacmak i sar., 2009), što bi možda moglo objasniti primećeni različiti odgovor dve strukture na dejstvo P4 nakon MH, ali i ukazati na adaptivni biohemijski odgovor tih struktura.



Kao što je prethodno istaknuto, reaktivne vrste, ali i produkti LPO, mogu uticati na strukturu proteina na više načina: stupanjem u interakciju sa aminokiselinama izazivajući njihovu modifikaciju ili degradaciju, reagovanjem sa bočnim lancima i okosnicom proteina čime se uzrokuje njihova oksidacija, ukrštanje, agregacija, sečenje peptidnih veza i degradacija (Gray i sar., 2015). Ovi procesi mogu uzrokovati funkcionalne promene, poput modifikacije aktivnosti enzima (Fucci i sar., 1983) ili aktivnosti jonskih kanala (Aizenman i sar., 1990) i drugo. Pokazano je da ishemijski moždani udar izaziva intenzivnu oksidaciju proteina plazme u humanom (Domínguez i sar., 2010) i životinjskom modelu moždanog udara (Li i sar., 2005). Povećan stepen oksidativnog oštećenja proteina primećen je i kod pacijenata sa AB, kao i kod pacijenata sa VAD i narušenim nivoom kardiovaskularnih faktora rizika (Altunoglu i sar., 2015). Prema dostupnim literaturnim podacima, AOPP esejom je ovom doktorskom disertacijom prvi put ukazano na povišenu oksidaciju proteina uzrokovanu nametanjem MH u HIPP koju tretman P4 smanjuje na kontrolni nivo, dok je u PFC, primećen istovetan trend, iako bez statističke značajnosti. Ipak, treba imati u vidu da AOPP detektuje oksidativna oštećenja proteina, a da tretman P4 nije uspeo da smanji LPO u HIPP, ne treba isključiti mogućnost drugih vrsta oštećenja proteina, poput karbonilacije (Gryszczyńska i sar., 2017).

S obzirom na to da su uočene regionalno-specifične promene ispitivanih parametara OS/NS, dalje je bilo od interesa da se istraži da li su poremećene i komponente AO zaštite. Iako se smanjenje aktivnosti AO enzima i povišen intenzitet OS prvenstveno dovode u vezu sa reperfuzijom nakon ishemije (Saxena i sar., 2015), i u MH modelu je pokazano da se narušava nivo AO enzima u različitim vremenskim intervalima nakon početka MH kod pacova (Saxena i sar., 2015). Ipak, različitim modelima povreda mozga su uočene nedoslednosti promena aktivnosti izoformi SOD (Sutherland i sar., 1991; Bayır i sar., 2006). Dodatno, kompleksnosti regulacije SOD doprinosi i to da je različitim studijama pokazana specifična modulacija polnim hormonima (Cai i sar., 2015; Yin i sar., 2015). Kod jedinki podvrgnutih trajnoj ligaciji karotidnih arterija tretiranih lanenim uljem, u PFC je zapažen porast CuZnSOD aktivnosti, kao i njeno smanjenje na kontrolni nivo nakon tretmana P4. Paralelno, porast aktivnosti u HIPP je zapažen kod obe 2VO grupe, bez obzira na tretman, u odnosu na kontrolne životinje, ali sa statističkom značajnošću jedino između kontrolnih i P4 tretiranih životinja. Dobijeni rezultati sugerisu na povećan intenzitet OS kod MH jedinki tretiranih lanenim uljem u PFC i OS/NS kod obe 2VO grupe u HIPP sa kojima se ove strukture bore, te da se primećeni porast aktivnosti može povezati sa adaptivnim mehanizmima kojima se sprečava povećanje proizvodnje superoksidnih radikala (de Farias i sar., 2016), s obzirom na to da povećanje aktivnosti SOD poboljšava uklanjanje  $O_2^-$ , ali uz stvaranje  $H_2O_2$ . Groleau i saradnici (2010) su, takođe, predložili da povećana aktivnost CuZnSOD može delovati kao odbrambeni mehanizam protiv OS imajući u vidu da CuZnSOD deficitarni miševi pokazuju narušenu neovaskularizaciju (Groleau i sar., 2010). Ipak, Aytac i saradnici (2006) nisu primetili porast, već smanjenje CuZnSOD aktivnosti 10 dana nakon nametanja MH (Aytac i sar., 2006). Razlog za nepodudaranje rezultata prethodno navedene studije sa podacima predstavljenim u ovoj doktorskoj disertaciji, najverovatnije leži u činjenici da aktivnost nije proučavana u jednom regionu mozga, nego u čitavom mozgu, kao i u različitim vremenskim tačkama posmatranja, te promene u pro-/anti-oksidativnom statusu jednog regiona ne moraju nužno odgovarati promenama u drugom regionu i imaju sebi svojstven vremenski tok, što je zapaženo i od strane drugih autora (Saxena i sar., 2015). Na regulaciju CuZnSOD dejstvom P4 ukazuju i studije koje su pokazale da je njegova aktivnost regulisana estradiol benzoatom i P4 u jetri ženki i samo P4 u jetri mužjaka pacova (Kasapović i sar., 1997). Kasapović i saradnici (1997) su, pak, primetili da u jetri gonadektomisanih pacova tretman estradiol benzoatom, P4 ili estradiolom ne menja aktivnost MnSOD i sugerisali su da je aktivnost ovog enzima regulisana dejstvom gonadotropina (Kasapović i sar., 1997). Treba istaći da u ovoj disertaciji nije primećena statistički značajna promena aktivnosti enzima MnSOD ni u jednoj ishemičnoj grupi ni u jednoj moždanoj strukturi, iako su aktivnosti bile povećane, što bi dodatno moglo ukazati na odsustvo regulacije aktivnosti ovog enzima kako ishemijom i tretmanom lanenim uljem, tako i tretmanom P4, kao i na glavnu ulogu CuZnSOD u skupljanju  $O_2^-$  u stanju MH bez

obzira na primenjeni tretman. Osim toga, dobijeni rezultati ukazuju i na prekomerno stvaranje  $H_2O_2$ , koji pored  $O_2^-$  i produkata LPO, može izazvati dodatna oštećenja molekula u ćeliji.  $H_2O_2$  može biti uklonjen pomoću CAT, čija je aktivnost u ovoj eksperimentalnoj postavci bila povišena u obe moždane strukture kod obe ishemične grupe. Predstavljeni podaci su u skladu sa studijama drugih autora koji su takođe pokazali povišenu aktivnost CAT u različitim modelima povrede mozga, ali i nakon tretmana hormonom (İşlekel i sar., 1999; Pajović i sar., 2003; Aggarwal i sar., 2008), što može ukazati na pojačan intenzitet biohemijske odbrane ćelija i uklanjanja reaktivnih vrsta.

Pored proučavanja aktivnosti navedenih enzima prve linije odbrane nakon hirurških zahvata i tretmana, praćena je i aktivnost GST, enzima koji katalizuje reakcije konjugacije kojima se visoko-reaktivne vrste proizvedene tokom metabolizma, poput  $H_2O_2$  i 4-HNE (Ålin i sar., 1985), pretvaraju u manje reaktivne proizvode. Ovaj enzim ima ulogu i u prenosu signala kroz ćeliju, ekspresiji gena, apoptozi, metabolizmu NO i upalnim procesima (Röth i sar., 2011). Prethodne studije ukazale su na modulaciju aktivnosti GST u mozgu starih pacova (Martínez-Lara, 2003) kod kojih je moždana cirkulacija narušena, kao i da se njegova aktivnost može promeniti usled smanjenja pH, odnosno, acidoze i izloženosti SH grupa enzima ROS i produktima LPO koji utiču na njegovo aktivno mesto (Kumari Naga i sar., 2007). Osim toga, pokazano je i odustvo promene aktivnosti ovog enzima nakon terapije steroidnim hormonima (Pajović i Saičić, 2008). Dobijeni rezultati u ovoj doktorskoj disertaciji mogu ukazati da je aktivnost ovog enzima u obe strukture regulisana MH, i to u suprotnom maniru, a ne sa P4. Naime, uočeno smanjenje GST aktivnosti, zajedno sa povećanjem aktivnosti CAT, sugeriše na glavnu ulogu CAT u skupljanju  $H_2O_2$  u stanju MH u PFC. U HIPP, paralelno povećanje aktivnosti oba enzima koji katalizuju degradaciju  $H_2O_2$  sugeriše pokušaj smanjenja intenziteta OS/NS putem intenziviranja biohemijske odbrane i sakupljanja prekomerno produkovanih kako ROS, tako i RNS.

Treba istaći da su dobijeni rezultati promena aktivnosti ispitivanih parametara OS/AO zaštite u skladu sa literaturnim podacima koji ukazuju da pH senzitivni enzimi lako podležu promenama aktivnog mesta u stanju OS/NS, kao i da modulacija njihove aktivnosti nastaje usled narušenog stvaranja supstrata u patofiziološkim stanjima (Kumari Naga i sar., 2007). Osim promena aktivnosti, nisu primećene promene proteinske ekspresije komponenti AO zaštite (MnSOD, CuZnSOD, CAT i GST) 7 dana nakon MH ni u jednoj grupi u odnosu na kontrole. Podaci o uticaju P4 na proteinsku ekspresiju ispitivanih komponenti AO zaštite nakon nametanja MH oskuduju, i stoga prikazani rezultati predstavljaju jedinstvene podatke u svetskoj literaturi. Mada, imajući u vidu da su primećene promene efikasnosti ispitivanih enzima, odnosno njihovih aktivnosti, a da nisu praćene promenama proteinske ekspresije, može se pretpostaviti da MH i P4 ne utiču na njihovu *de novo* sintezu, već da ispoljavaju ne-genomsko delovanje, tako što modulišu aktivno mesto ovih enzima.

Pored efekata na lipide i proteine, poznato je da reaktivne vrste uzrokuju i strukturne i funkcionalne promene DNK, razbijaju njenu dvolančanu strukturu, uzrokuju intra- i inter-lančane veze, narušavaju povezivanje proteina i DNK i uzrokuju mutacije (Jena, 2012), što rezultuje prisustvom fragmentisane DNK izazvane internukleozomnim sečenjem hromatina u patološkim stanjima (Yakovlev i sar., 2001). Prethodne studije su pokazale da trajna MH dovodi do fragmentacije karakteristične za apoptozu (Stanojlović i sar., 2015, 2016), a za koju se može pretpostaviti da je, na osnovu ostalih predstavljenih rezultata u ovoj doktorskoj disertaciji, povezana sa prekomernom produkcijom reaktivnih vrsta. Anuliranje fragmentacije u PFC nakon P4 tretmana ukazuje na značaj primene ovog hormona, makar u toj moždanoj strukturi, dok njegova nepotpuna efikasnost u HIPP, s jedne strane, ukazuje na povećan intenzitet OS/NS sa kojima se ova struktura bori povećanjem aktivnosti komponenti AO zaštite. S druge strane, može se pretpostaviti da, upravo, povećani nivoi NO i produkata LPO, u HIPP, mogu samostalno izazivati fragmentaciju DNK koja nema veći značaj za ćeliju s obzirom na to da je ekspresija sečene kaspaze 3 i ostalih ispitivanih apoptotskih molekula, vraćena na kontrolni nivo nakon P4 tretmana.

## 5.2. Regionalno-specifične promene parametara apoptotske signalne kaskade nishodno od progesteronskih receptora

Istraživanja su pokazala da je nakon različitih povreda mozga nivo P4 povećan u serumu ljudi (Wagner i sar., 2012), u serumu i mozgu miša (Liu i sar., 2012), kao i u mozgu pacova (Meffre i sar., 2007). Ubrzo nakon povrede, endogeni P4 štiti mozak usled steroidogeneze i aktivacije PR koji deluju kao transkripcioni faktori i regulišu ekspresiju ciljnih gena (Mani, 2008). Upravo to je pokazala i studija Liu i saradnika (2012) koji su još uočili i da ovo povećanje pruža zaštitu do 48 h (Liu i sar., 2012). Naime, nakon ovog perioda nije bila detektovana razlika u veličini oštećenja mozga i motorne koordinacije između PR<sup>+/+</sup> i PR<sup>-/-</sup> miševa podvrgnutih prolaznoj ishemiji mozga, što ukazuje na to da povećanje steroidogeneze u mozgu i endogena aktivacija PR kao odgovor na moždani udar nisu dovoljne za zaštitu. Mada, ukazano je da je za dugotrajnu neuroprotekciju nakon povreda mozga neophodan i tretman egzogenim P4, ali i prisustvo, odnosno odgovarajući nivo PR (Liu i sar., 2012), što je i pokazano studijama na PR deficijntnim i heterozigotnim miševima (Allen i sar., 2016). Rezultati ove doktorske disertacije su u skladu sa rezultatima pomenutih studija i pokazuju da egzogeno dodat P4 vraća MH narušenu ekspresiju PRA i PRB na kontrolni nivo u obe moždane strukture i u obe subćeljske frakcije.

Kod sisara brojni promotori gena sadrže regulatorne sekvence upravo za PRA i PRB, koji pokazuju regionalno specifičan obrazac ekspresije (Brinton i sar., 2008; Mani, 2008). Imajući u vidu da je P4 posredstvom PRA i PRB sposoban da moduliše gene uključene u različite procese (Chakrabarti i sar., 2009), u ovoj disertaciji je, praćena modulacija ćelijske signalizacije u stanju nametnute MH posredovana PR u PFC i HIPP, uključujući ekspresiju nekolicine apoptotskih gena čija promena može biti posledica OS. Naime, primećeno je da je P4 u PFC i HIPP 2VO životinja najverovatnije pokrenuo transkripcionu aktivaciju odnosno inaktivaciju pojedinih ispitivanih gena što odgovara povećanju nivoa *Bcl-2* i smanjenju nekoliko drugih, kao što su *Bax*, *kaspaza 3* i *PARP*, koji su bili povišeni nakon podvezivanja karotida. Osim toga, na proteinskom nivou, tretman P4 je doprineo vraćanju odnosa *Bcl-2/Bax* proteina u ravnotežu, što ukazuje na neutralizaciju pro-apoptotskih procesa koji su pokrenuti usled MH. Primećeno je, takođe, smanjenje nivoa *CitC*, prokaspaze 3/sećene kaspaze 3 i *PARP* u citosolu kako u PFC tako i u HIPP. Ovakvi efekti tretmana P4 u ovde primenjenom modelu su u skladu sa studijama drugih eksperimentalnih modela koje su pokazale smanjenje apoptoze u neuronima i učešće anti-apoptotskih molekula *Bcl-2* familije u sprečavanju oslobađanja *CitC* iz mitohondrijske membrane i naknadnu supresiju štetne aktivnosti kaspaze 3 nakon tretmana P4 (Djebaili i sar., 2004, 2005; Yao i sar., 2004; Kaur i sar., 2007; Stein, 2008; Guerra-Araiza i sar., 2009; Ishrat i sar., 2012; Yousuf i sar., 2017).

Literaturni podaci ukazuju da se nishodno od PR modulišu različiti signalni putevi nakon povrede mozga usled narušavanja krvotoka, ali i nakon primene steroidnih hormona u tim uslovima (Furuchi i Anderson, 1998; Bonni, 1999; Nilsen i Brinton, 2003a,b; Singh, 2001; Williams i sar., 2006; Zhao i sar., 2006; Ishrat i sar., 2012). Tako, uočeno je da Erk signalizacija može poboljšati preživljavanje neurona fosforilacijom i aktivacijom CREB, što pokreće transkripciju gena uključenih u preživljavanje, poput *BDNF* (Furuchi i Anderson, 1998) i inaktivacijom pro-apoptotskih proteina (Bonni, 1999). Dalje, aktivacija Erk je neophodna za neuroprotekciju pokrenutu estradiolom (Singer i sar., 1999), kao i P4 nakon ekscitotoksičnih povreda (Nilsen i Brinton, 2003b). Pored aktivacije MAPK/Erk signalnog puta, steroidni hormoni aktiviraju i alternativni put preživljavanja neurona, Akt (Singh, 2001). Fosforilacija Akt štiti moždano tkivo od ishemijske povrede inhibiranjem ekspresije gena koji podstiču vaskularnu propustljivost, apoptozu i upalu (Williams i sar., 2006; Zhao i sar., 2006). Naime, pokazano je da moždana ishemija aktivira Akt, što zauzvrat blokira premeštanje Bad i Bax u mitohondrijsku membranu, čime se sprečava oslobađanje *CitC* iz mitohondrija i pokretanje štetnih aktivnosti kaspaze (Noshita i sar., 2001; Zhao i sar., 2006). Osim toga, putevi PI3K/Akt su direktno povezani sa zaštitom posredovanom P4 nakon povreda CNS (Kaur i sar., 2007; Guerra-Araiza i sar., 2009). Progesteron povećava nivo p-Akt, utišava nishodnu metu Bad i smanjuje ekspresiju kaspaze 3 redukujući obim oštećenja (Ishrat i sar., 2012), dok

inhibiranje PI3K/Akt signalnog puta vortmaninom onemogućava aktivaciju Akt i neuroprotektivne efekte P4 nakon moždane ishemije (Ishrat i sar., 2012). Odnosi fosfo i total formi kako Akt, tako i Erk, koji ukazuju na aktivnost ovih kinaza, bili su sniženi u ovoj doktorskoj disertaciji nakon nametanja MH u PFC, dok je tretman P4 vratio vrednosti na kontrolni nivo. S druge strane, u HIPP, p-Akt/t-Akt je pratio ovaj trend, dok MH nije izazvala promene fosforilisanosti obe izofrome Erk, ali tretman P4 jeste povećao nivo p-Erk/t-Erk u odnosu na kontrole. Ovi rezultati, zajedno sa ostalim ispitivanim molekulima apoptotske kaskade ukazuju na potencijalno regionalno-specifičan efekat MH praćen protektivnim dejstvom P4 u obe moždane strukture. Naime, opaženo dejstvo MH i tretmana P4 u ovoj doktorskoj disertaciji bi moglo nastati upravo nezavisnom ili paralelnom modifikacijom aktivnosti kinaza Akt i Erk za koje je poznato da utiču na post-translacione modifikacije, nivo i lokalizaciju PR (Eaton i sar., 2013), čime bi se kontrolisalo aktiviranje komponenti ćelijske smrti i transkripcija gena uključenih u preživljavanje (Yao i sar., 2004; Ishrat i sar., 2012). U prilog ovoj pretpostavci ide i činjenica da, kao što je već pomenuto, aktivacija ovih kinaza zadržava Bax u citosolu usled inhibicije njegovih konformacionih promena potrebnih za premeštanje u mitohondrije. Dodatno, ove kinaze povećavaju ekspresiju Bcl-2 i smanjuju propustljivost mitohondrijske membrane, zadržavajući CitC unutar mitohondrijskog međumembranskog prostora, i inhibirajući aktivaciju kaspaze 3 i sečenje PARP, sprečavaju apoptozu i druge tipove smrti neurona (Djebaili i sar., 2004, 2005; Yao i sar., 2004; Stein 2008; Ishrat i sar., 2012; Yousuf i sar., 2017). S obzirom na to da su ekspresija i fosforilacija obe ispitivane kinaze istovetno „pogođene“ u 2VO grupama u PFC, može se pretpostaviti da u ovim eksperimentalnim uslovima Akt i Erk pokazuju kooperativan odgovor koji je prethodno opažen u modelu fokalne (Tang i sar., 2014) i modelu globalne moždane ishemije pacova (Friguls i sar., 2002). Ipak, odsustvo odgovora Erk na trajno podvezivanje karotidnih arterija i tretman lanenim uljem u HIPP može ukazati ili na to da ova kinaza nije uključena u odgovor na ovako izazvanu MH i tretman, ili da postoji različita osetljivost i vremenski profil njene aktivacije u odnosu na Akt, imajući u vidu da je sedmodnevni tretman P4 podigao nivo aktivacije Akt u citosolu na kontrolne vrednosti, dok je nivo fosforilacije Erk bio iznad njih. Osim toga, fosforilacija Akt, ali i Erk, je neophodna i za aktivnost eNOS koji ima ulogu u vaskularnoj homeostazi (Chang i sar., 2014). Pokazano je da Akt fosforiliše eNOS protein na Ser<sup>1177</sup> što povećava aktivnost eNOS, dok inhibicija ovog puta dovodi do sprečavanja aktivacije eNOS (Fulton i sar., 1999) i modulacije nivoa NO. Studije su pokazale da tretman steroidnim hormonom ublažava vazospazam smanjenjem ekspresije iNOS i reguliše ekspresiju eNOS koja smanjuje sekundarne povrede mozga nakon SAH (Shih i sar., 2006) povećavajući ekspresiju proteina p-Akt i p-Erk u dentatnom girusu (Kao i sar., 2013). Khorram i Han (2009) su pokazali da, upravo, P4 stimuliše fosforilaciju eNOS na Ser<sup>1177</sup> posredstvom PI3K/Akt i Erk, kao i da inhibitori ovih signalnih puteva, vortmanin i UO126 imaju sposobnost da ponište ovakav efekat (Khorram i Han, 2009). Dalje, pokazano je da i NO može biti povezan sa supresijom apoptoze inhibiranjem sečenja Bcl-2 kaspazama i oslobađanja CitC, kao i nitrozilacijom kaspaza (Kim i sar., 1998, 1999).

Opažena regulacija PR i modulacija Akt/Erk/eNOS/NO signalnog puta su, može se pretpostaviti, barem delimično odgovorne za uočene ne-genomske akcije P4 u modelu 2VO pacova, s obzirom na to da su povišeni nivoi PR transkripata i fosforilacije kinaza otkriveni u povređenom mozgu. Zanimljivo, primećen je daleko skromniji učinak P4 u HIPP u ovoj studiji. Povećani nivoi NO i ostalih parametara OS/NS zajedno sa individualnim odgovorom kinaza, ukazuju na OS/NS milje, praćen povećanjem aktivnosti komponenti AO zaštite u kojem se i dalje nalazi i sa kojim se i dalje bori HIPP 7 dana nakon ishemije i tretmana P4.

### **5.3. Morfološke karakteristike ćelija i nivo ćelijske smrti, kao i kognitivne i lokomotorne sposobnosti**

Imajući u vidu da su prethodno predstavljeni rezultati ove disertacije ukazali na regionalno-specifičan odgovor moždanih struktura na povećan intenzitet OS/NS i modulaciju aktivnosti komponenti AO zaštite i ekspresije apoptotskih molekula, od interesa je bilo ispitati da li se kao posledica uočenih promena javljaju i promene morfoloških karakteristika ćelija PFC i HIPP u obe 2VO grupe u odnosu na kontrolne jedinke, kao i promene kognitivnih i lokomotornih sposobnosti jedinki.

Literaturni podaci ukazuju da MH uzrokuje narušavanje struktura i funkcija ćelija različitih regiona mozga poput HIPP, amigdale i PFC koji prvi podležu promenama. Biohemijski, ovi regioni trpe najveće promene koje dalje određuju sudbinu veza među neuronima i njihovu funkciju, a neuroni različitih regiona nemaju istu osetljivost na stanje ishemije (Farkas i sar., 2007). U ovoj doktorskoj disertaciji, izmenjena ćelijska morfologija detektovana je pomoću Nislovog bojenja u sloju III PFC, kao i u CA3 sektoru HIPP kod jedinki sa trajno podvezanim karotidnim arterijama tretiranim lanenim uljem, dok je FJC bojenjem pokazano prisustvo mrtvih ćelija u istim slojevima. Upravo, izuzetna podložnost OS/NS ćelija III sloja PFC i CA3 sektoru HIPP može narušiti ćelijsku proliferaciju, umanjiti remodelirajući kapacitet, narušiti plastičnost, prekinuti neurogenezu i sinaptičku transmisiju i biti uzrok uočenog smanjenja kognitivnih i motornih sposobnosti. U studijama trajne globalne ishemije uočeno je da neuroni pacijenata obolelih od AB najviše umiru u CA3 sektoru, ali ne i u CA1 (Heikkinen i sar., 2014), kao i da pacovi sa lezijama CA3 sektora pokazuju poremećaj obrade informacija, spojeva predmeta-mesta i pokazuju nedostatak obrade prostorne memorije i da je upravo CA3 sektor uključen u obradu stimulusa ili objekata povezanih sa prostorom (Ji i Maren, 2008), što je u skladu sa rezultatima ove doktorske disertacije. Treba istaći i da osim narušavanja strukture i funkcije postojećih ćelija, primećeno je da neki tipovi oštećenja mozga poput ishemije i TPM stimulišu neurogenezu u mozgu (Marques i sar., 2019), kao i da se može javiti proliferacija nervnih prekursora iz ventrikularne-subventrikularne zone u blizini lateralnih komora (najaktivnije proliferativne zone mozga), odnosno, prekursorske ćelije mogu migrirati sa mesta nastanka do povređenog mesta (Nakatomi i sar., 2002; Yamashita i sar., 2006). Dodatno, mnoge studije su pokazale da se, kada je mozak oštećen, novi neuroni stvaraju iz lokalnih nervnih stem ćelija na mestu povrede (Nemirovich-Danchenko i Khodanovich, 2019). Nakatomi i saradnici (2002) su primetili da populacija nervnih progenitorskih ćelija koje naseljavaju kaudalne delove subventrikularne zone stvara neuroblaste koji migriraju do povređenog HIPP nakon globalne ishemije koja oštećuje piramidne ćelije HIPP i time se smanjuje nivo i obim ćelijske smrti (Nakatomi i sar., 2002). S druge strane, u ovoj doktorskoj disertaciji, tretman P4 je uspeo da vrati morfologiju na „normalno“ stanje, a umiruće ćelije su bile jedva primetne u obe moždane strukture. Predstavljeni rezultati dobijeni Nissl-ovim i FJC bojenjem, za obe strukture, su u skladu sa studijama drugih autora koje ukazuju na protektivni efekat P4 u drugim modelima povrede mozga (Djebaili i sar., 2004, 2005; Ishrat i sar., 2012), ali drugih steroidnih hormona u MH (Stanojlović i sar., 2015, 2016). Li i saradnici (2012) primetili da P4 povećava broj cirkulišućih endotelnih progenitorskih ćelija i omogućava regeneraciju neurona nakon TPM kod starih pacova (Li i sar., 2012), što može biti i slučaj u ovoj eksperimentalnoj postavci.

Jednu od odlika neurodegeneracije predstavlja i progresivno smanjenje kognitivnih sposobnosti sa poremećajima u kratkoročnom/radnom pamćenju, koje može biti suprimirano primenom potencijalnih terapeutika. Kod glodara kratkoročna i dugoročna memorija, pažnja i sklonost ka istraživanju novih predmeta (Goulart i sar., 2010) mogu biti proučavane NOR testom (Esbenshade i sar., 2008) kroz manipulaciju količine vremena koju životinje mogu zadržati u memoriji ispitivani predmet (Tagalata i sar., 2009). U zadatim eksperimentalnim uslovima, NOR test je pokazao da su životinje iz svih eksperimentalnih grupa provodile podjednako vreme istražujući predmete u test fazi ukazujući da ni obostrano podvezivanje karotidnih arterija i tretman lanenim uljem, kao ni hormonski tretman nisu promenili motivaciju i želju za istraživanjem predmeta. Međutim,

primećeno je da su, nakon zamene jednog (starog/poznatog) predmeta novim, životinje iz grupe tretirane P4 pokazale veću zainteresovanost za novi objekat, kao i da su ga češće obilazile, za razliku od 2VO životinja koje su primale laneno ulje što može ukazati na sposobnost ovog hormona da očuva i/ili poboljša pamćenje. Dobijeni rezultati su u skladu sa prethodno publikovanim rezultatima NOR testa koji svedoče da oštećenja kore velikog mozga i HIPP utiču na kognitivne sposobnosti (Clark i sar., 2000; Buckmaster, 2004), kao i primena potencijalnih terapeutika, uključujući steroidne hormone (Ebrahimzadeh i sar., 2015). Na protektivno dejstvo ovog hormona ukazuju i studije u kojima endogeno povećanje P4 tokom estrusnog ciklusa ili trudnoće poboljšava kognitivne efekte u mnogim testovima kojima se istražuje prostorno, emotivno pamćenje, kao i pamćenje objekata, dok gonadektomija stvara nedostatke u obavljanju memorijskih zadataka koji se mogu otkloniti primenom P4 ili alopregnanolona (Macbeth i Luine, 2010). Dodatno, dokazano je da administracija P4 utiče na performanse u memorijskim zadacima posredovanim dorzalnim HIPP, te on može imati kritičnu ulogu u mnemoničkim efektima P4 (Orr i sar., 2009). Baterija testova korišćena u ovoj disertaciji se, pored NOR, sastojala i od OF i EPM testa koji su korišćeni za proučavanje lokomotorne sposobnosti pacova nakon hirurške intervencije i tretmana. Naime, OF test ukazao je da podvezivanje karotidnih arterija i tretman lanenim uljem smanjuju broj prolazaka preko kvadrata arene, dok je EPM pokazano smanjenje ulazaka u krake aparature. S druge strane, oba testa pokazala su da je sedmodnevni tretman P4 u stanju da popravi lokomotornu aktivnost pacova nakon nametanja trajne MH. Slične rezultate su dobili i Wali i saradnici (2014) koji su primetili da P4 nakon nametanja moždanog udara trajnim podvezivanjem središnje moždane arterije ne samo da poboljšava lokomotornu aktivnost, nego i motornu koordinaciju, prostornu navigaciju, jačinu hvatanja, kao i da smanjuje poremećaj hoda (Wali i sar., 2014).

Uočena sposobnost P4 da poboljša kognitivne i lokomotorne sposobnosti u različitim modelima i vrstama, ali i kod pacova u stanju nametnute MH mogla bi biti postignuta angažovanjem PR i/ili drugih receptora i aktivnošću njihovih nishodnih molekula. Naime, pokazano je da se PR mogu naći u dorzalnom HIPP (Guerra-Araiza i sar., 2002; Guerra-Araiza i sar., 2003), te P4 brzo menja narušenu morfologiju HIPP i prenos signala kroz ćeliju (Orr i sar., 2009). Upravo jedna od hipoteza ove disertacije bila je pretpostavka da su ispitivani efekti P4 uzrokovani modulacijom proteinske ekspresije PR. Međutim, ovakav efekat je najverovatnije postignut u kombinaciji i sa ostalim ispitanim parametrima, uključujući Akt/Erk/eNOS. Shu i saradnici (2013) su sugerisali da i PI3K/Akt signalni put može biti uključen u modulaciju ne-prostornih i prostornih kognitivnih oštećenja izazvanih MH (Shu i sar., 2013). Dodatno, poznato je da polni hormoni mogu regulisati procese učenja i pamćenja kod oba pola pacova (Frick i sar., 2015), kao i da tretman estradiolom dorzalnog HIPP ili ventrikule ovarijektomisanih pacova aktivira Erk i Akt signalni put, kao i da to uzrokuje Erk zavisno poboljšanje konsolidacije pamćenja, odnosno, prepoznavanja (Fernandez i sar., 2008; Yang i sar., 2010).

\*\*\*

Iako predstavljeni rezultati ukazuju na to da bi P4 tretman mogao biti terapijski održiv kod trajno, blago smanjenog, moždanog protoka krvi, potrebno je razmotriti neka ograničenja ove studije. Jedno od njih je odsustvo lažno operisane grupe tretirane P4 kako bi se ispitali nespecifični efekti kod životinja čije karotidne arterije nisu podvezane. U ovoj doktorskoj disertaciji lažno operisana grupa tretirana P4 nije korišćena s obzirom na to da je u različitim modelima oštećenja mozga životinja otkriveno da je upotreba ovog hormona sigurna i bez negativnog ishoda na većinu ispitivanih parametara, čak i kada je on primenjen u višim dozama, u različitom režimu primene, kod različitih sojeva i/ili vrsta, i drugo (Mani 2008; Singh i sar., 2013; Watts i sar., 2014). Drugo, iako se u ovoj doktorskoj disertaciji spekulira o povećanju ROS nakon nametanja trajne MH i njegovog smanjenja nakon primene P4, nije meren njegov nivo. Do pretpostavke o promeni nivoa produkcije ROS u zadatim eksperimentalnim uslovima se došlo na osnovu prezentovanih rezultata, ali i na osnovu drugih studija koje su potvrdile da u prekomerno generisan ROS može biti otklonjen dejstvom P4, makar u drugim modelima moždane ishemije (Li i Zhang, 2015; Zhang i sar., 2015; Andrabi i sar., 2017).

Dalje, jedna od hipoteza ove disertacije je da su regulacija PR i ponovno uspostavljanje kompromitovanog Akt/Erk/eNOS/NO signalnog puta barem delimično odgovorne za uočene neuroprotektivne efekte P4 u primenjenom modelu. Procena njihove uključenosti u odgovor indukovani P4 bi trebala bi biti ispitana upotrebom specifičnih inhibitora ili antagonista. Kao što je već napomenuto, prethodne studije su dokazale da vortmanin može blokirati pozitivan uticaj P4 (Ishrat i sar., 2012) i njegovog nishodnog efektor, eNOS (Khorram i Han, 2009). U0126, blokator Erk signalnog puta, smanjuje njegovu fosforilaciju kada su dve linije PR<sup>-/-</sup> ćelija epitela dojke tretirane P4 i njegovim metabolitima (Salazar i sar., 2016) i potpuno blokira efekat P4 na fosforilaciju eNOS (Khorram i Han, 2009). S druge strane, neophodno bi bilo upotrebiti i PR antagoniste, inhibitore sinteze proteina i RNA, antisens-oligonukleotide na PR i mutirane miševske sa ciljanom delecijom PR gena (Mani, 2008; Khorram i Han, 2009), koji bi potencijalno modifikovali ćelijski odgovor nakon tretmana P4 u zadatim eksperimentalnim uslovima.

Stoga, u ovom modelu novi eksperimenti kojima bi se proverio uticaj ponovljenog tretmana P4 na druge receptore, ali i na pojedinačne komponente Akt/Erk/eNOS/NO signalizacije, pokazali bi i jasno definisali stepen njihove uključenosti u neuroprotektivne akcije P4 unutar oštećenog mozga. Takođe, dodatna testiranja su neophodna kako bi se potvrdili dobijeni rezultati na životinjama različite starosti, na (ne)ovarijektomisanim ženjkama u određenim fazama ciklusa i kod viših životinjskih vrsta.

***ZAKLJUČAK***



Iako je intenzivno izučavana u laboratorijama širom sveta, patofiziologija MH, opažena kod starih ljudi i obolelih od staračke demencije i VAD, je samo delimično proučena. Takođe, treba istaći da u ovom momentu ne postoji adekvatan tretman kojim bi se odstranile ili ublažile njene posledice. Iz tih razloga, od izuzetne važnosti je proučavanje kompleksnih promena karakterističnih za nastanak i progresiju MH, ali i ispitivanje potencijalno protektivnih učinaka supstanci/jedinjenja na animalnim modelima. Doprinos ove doktorske disertacije ogleda se, upravo, u pružanju mogućnosti boljeg razumevanja mehanizama nastanka i progresije trajne MH, kao i mehanizama dejstva koje sedmodnevni tretman P4 ostvaruje kod mužjaka pacova nakon njenog nametanja. To je ostvareno kroz proučavanje kognitivnih i lokomotornih sposobnosti, morfoloških karakteristika i obima ćelijske smrti, ali i molekularnih promena komponenti ćelijskog odgovora, koje su, po svoj prilici, regionalno-specifične.

U skladu sa postavljenim ciljevima ove doktorske disertacije i dobijenim rezultatima, generalno, može se zaključiti da P4 u stanju nametnute trajne MH:

- ❖ poboljšava kognitivne i lokomotorne sposobnosti mužjaka pacova;
- ❖ na regionalno-specifičan način rekonstruiše morfologiju ćelija i obim ćelijske smrti u PFC i HIPP.

Osim toga, primećeno je da u PFC aplikovani hormon:

- ❖ umanjuje DNK fragmentaciju do kontrolnih vrednosti;
- ❖ uspostavlja pro-/anti-oksidativnu ravnotežu na šta ukazuje nivo PAB koji je pomećen ka vrednostima detektovanim kod kontrola. Ovakvo stanje je najverovatnije postignuto kompenzatornom aktivnošću enzima CAT, povećanjem nivoa protektivnog NO nastalog aktivnošću eNOS i smanjenjem obima lipidne peroksidacije;
- ❖ poništava MH-posredovano smanjenje ekspresije PRA i PRB moduliše ekspresiju gena i proteina uključenih u apoptotske procese;
- ❖ reguliše Akt/Erk/eNOS/NO signalni put uspostavljajući sličnu signalnu transdukciju kao kod kontrolnih jedinki što bi, barem delimično, moglo biti odgovorno za uočene neuroprotektivne efekte P4 u PFC u korišćenom modelu.

S druge strane, u HIPP uočeno je da P4:

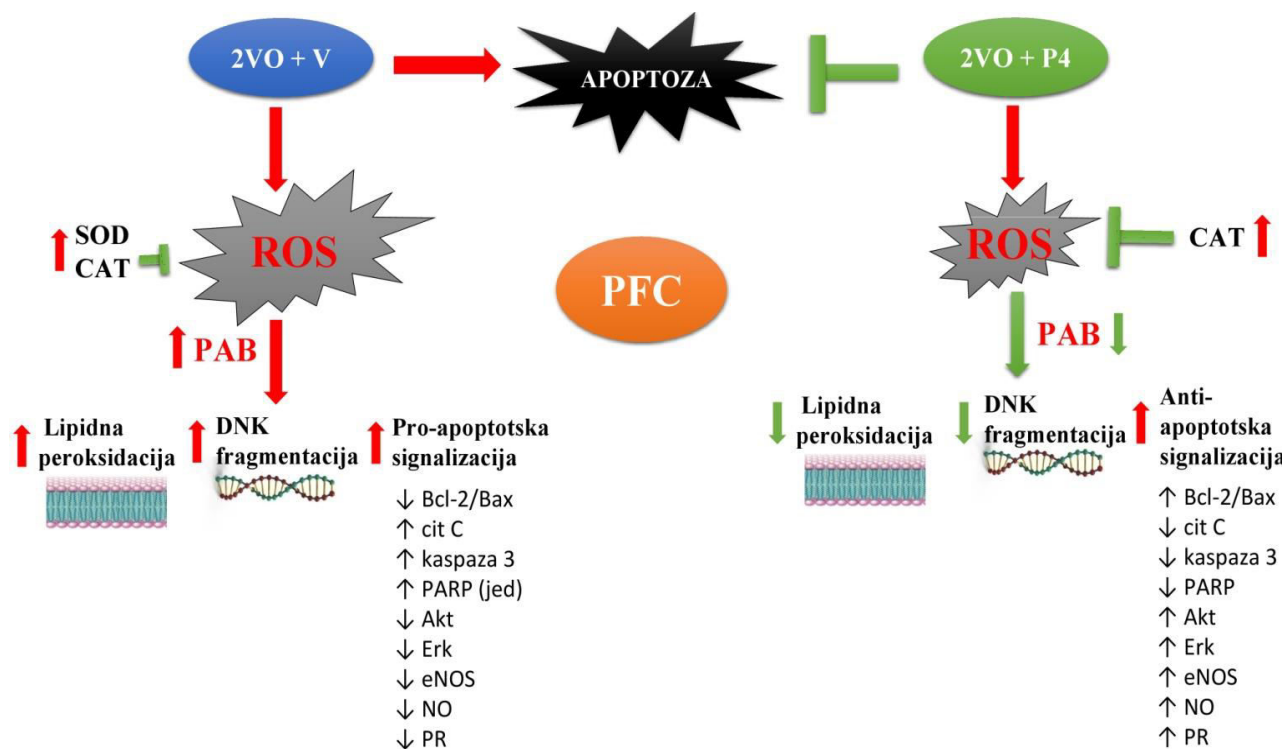
- ❖ smanjuje intenzitet OS/NS povećanjem aktivnosti komponenti AO zaštite (poput CuZnSOD i GST, ali i u manjoj meri CAT);
- ❖ poništava MH-posredovano smanjenje ekspresije PRA i PRB;
- ❖ moduliše ekspresiju gena i proteina uključenih u apoptotske procese i time smanjuje obim ćelijske smrti;
- ❖ ne reguliše Akt/Erk/eNOS/NO signalni put, kao što to čini u PFC, odnosno, ograničava MH-narušen Akt signalni put i nivo NO nastao, najverovatnije, delovanjem nNOS.

Stoga, predstavljeni rezultati ukazuju na regionalno-specifičan neuroprotektivan efekat P4 7 dana nakon nametanja trajne MH. Naime, u zadatim eksperimentalnim uslovima pokazano je da primenjeni tretman P4 u PFC može pružiti zaštitu od pro-oksidativnih uticaja, koji, po svoj prilici, širenjem signala kroz ćeliju pokreću apoptotsku kaskadu nakon trajnog podvezivanja obe zajedničke karotidne arterije. Ova zaštita se ogleda u povećanju aktivnosti pojedinih enzima AO zaštite, pokretanju genske i proteinske ekspresije molekula koji učestvuju u suprimiranju apoptoze, što za rezultat ima očuvanje DNK integriteta, smanjenje obima ćelijske smrti i vraćanje izgleda ćelija na „normalnije“ stanje. U poređenju sa PFC, u HIPP pokrenut je ne samo OS, već i NS, a ćelije nakon tretmana P4 se bore sa nastalim stanjem što se ogleda povećanjem aktivnosti pojedinih komponenti AO zaštite, poput CuZnSOD, CAT i GST i vraćanjem vrednosti nivoa apoptotskih molekula na kontrolni nivo.

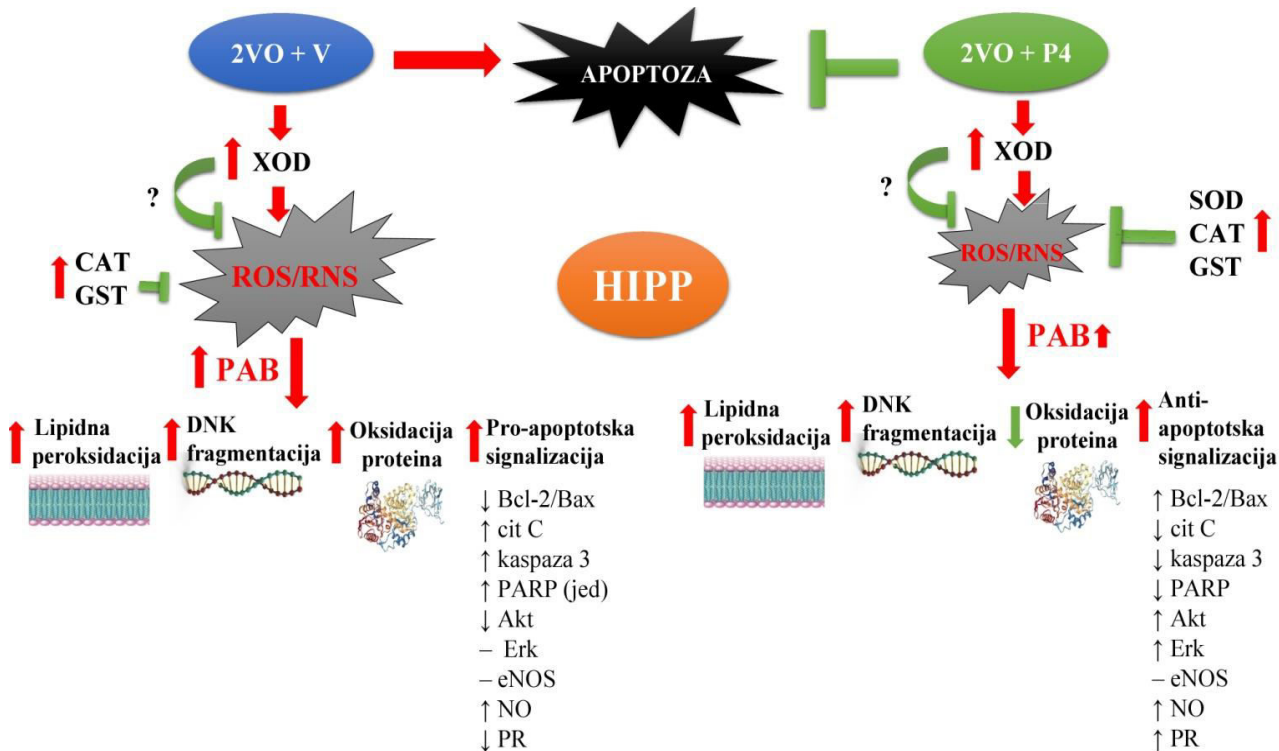
\*\*\*

Predstavljeni rezultati ukazuju na značaj sedmodnevnog tretmana P4 u stanju nametnute trajne MH. Duža upotreba/veća doza/drugačiji vid aplikacije samog P4 ili/i u kombinaciji sa drugim agensima bila bi vredna daljih ispitivanja regionalno-specifičnih odgovora različitih moždanih struktura i mogla bi poslužiti kao jedan od potencijalnih tretmana u ublažavanju simptoma MH kod ljudi.

Predložena signalna transdukcija u moždanim strukturama od interesa na osnovu dobijenih rezultata



Slika 17. Predložena signalna transdukcija u PFC na osnovu dobijenih rezultata



Slika 18. Predložena signalna transdukcija u HIPP na osnovu dobijenih rezultata

# *LITERATURA*

- Aggarwal, R., Medhi, B., Pathak, A., Dhawan, V., Chakrabarti, A. (2008). Neuroprotective effect of progesterone on acute phase changes induced by partial global cerebral ischaemia in mice. *J. Pharm. Pharmacol.* *60*, 731–737.
- Aizenman, E., Hartnett, K.A., Reynolds, I.J. (1990). Oxygen free radicals regulate NMDA receptor function via a redox modulatory site. *Neuron*. *5*, 841–846.
- Alamdari, D.H., Ghayour-Mobarhan, M., Tavallaie, S., Parizadeh, M.R., Moohebati, M., Ghafoori, F., Kazemi-Bajestani, S.M.R., Paletas, K., Pegiou, T., Koliakos, G. (2008). Prooxidant–antioxidant balance as a new risk factor in patients with angiographically defined coronary artery disease. *Clin. Biochem.* *41*, 375–380.
- Allen, R.S., Sayeed, I., Oumarbaeva, Y., et al (2016). Progesterone treatment shows greater protection in brain vs. retina in a rat model of middle cerebral artery occlusion: Progesterone receptor levels may play an important role. *Restor Neurol Neurosci.* *34*, 947–963.
- Alessi, D.R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., Hemmings, B.A. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* *15*, 6541–6551.
- Ålin, P., Danielson, U.H., Mannervik, B. (1985). 4-Hydroxyalk-2-enals are substrates for glutathione transferase. *FEBS Lett.* *179*, 267–270.
- Altunoglu, E., Guntas, G., Erdenen, F., Akkaya, E., Topac, I., Irmak, H., Derici, H., Yavuzer, H., Gelisgen, R., Uzun, H. (2015). Ischemia-modified albumin and advanced oxidation protein products as potential biomarkers of protein oxidation in Alzheimer’s disease: Alzheimer’s disease and protein oxidation. *Geriatr. Gerontol. Int.* *15*, 872–880.
- Andrabi, S.S., Parvez, S., Tabassum, H. (2017). Progesterone induces neuroprotection following reperfusion-promoted mitochondrial dysfunction after focal cerebral ischemia in rats. *Dis. Model. Mech.* *10*, 787–796.
- Arai, K., Lo, E.H. (2009). Astrocytes protect oligodendrocyte precursor cells via MEK/ERK and PI3K/Akt signaling. *J. Neurosci. Res.* *88*: 758–763.
- Attia, A.A., ElMazoudy, R.H., El-Shenawy, N.S. (2012). Antioxidant role of propolis extract against oxidative damage of testicular tissue induced by insecticide chlorpyrifos in rats. *Pestic. Biochem. Physiol.* *103*, 87–93.
- Aytac, E., Oktay Seymen, H., Uzun, H., Dikmen, G., Altug, T. (2006). Effects of iloprost on visual evoked potentials and brain tissue oxidative stress after bilateral common carotid artery occlusion. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* *74*, 373–378.
- Bafana, A., Dutt, S., Kumar, S., Ahuja, P.S. (2011). Superoxide dismutase: an industrial perspective. *Crit. Rev. Biotechnol.* *31*, 65–76.
- Bagchi, D., Carryl, O.R., Tran, M.X., Bagchi, M., Garg, A., Milnes, M.M., Williams, C.B., Balmoori, J., Bagchi, D.J., Mitra, S., et al. (1999). Acute and chronic stress-induced oxidative gastrointestinal mucosal injury in rats and protection by bismuth subsalicylate. *Mol. Cell. Biochem.* *196*, 109–116.
- Bahnasy, W.S., El-Heneedy, Y.A., El-Seidy, E.A. (2018). Sex hormones and alzheimer’s disease. in sex hormones in neurodegenerative processes and diseases, G. Drevenšek, ed. (InTech), 145–169.
- Bayır, H., Kochanek, P.M., Kagan, V.E. (2006). Oxidative stress in immature brain after traumatic brain injury. *Dev. Neurosci.* *28*, 420–431.
- Belhadj Slimen, I., Najar, T., Ghram, A., Dabbebi, H., Ben Mrad, M., Abdrabbah, M. (2014). Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review. *Int. J. Hyperthermia* *30*, 513–523.
- Bennett, S.A., Tenniswood, M., Chen, J.H., Davidson, C.M., Keyes, M.T., Fortin, T., Pappas, B.A. (1998). Chronic cerebral hypoperfusion elicits neuronal apoptosis and behavioral impairment. *Neuroreport* *9*, 161–166.

- Berent-Spillson, A., Briceno, E., Pinsky, A., Simmen, A., Persad, C.C., Zubieta, J.-K., Smith, Y.R. (2015). Distinct cognitive effects of estrogen and progesterone in menopausal women. *Psychoneuroendocrinology* 59, 25–36.
- Beutler, E. (1975). Red cell metabolism: a manual of biochemical methods. *Yale J Biol Med.* 49, 310–311.
- Boonyaratanakornkit, V., Scott, M.P., Ribon, V., Sherman, L., Anderson, S.M., Maller, J.L., Miller, W.T., Edwards, D.P. (2001). Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 Domains and activates c-Src family tyrosine kinases. *Mol. Cell* 8, 269–280.
- Brinton, R.D., Thompson, R.F., Foy, M.R., Baudry, M., Wang, J., Finch, C.E., Morgan, T.E., Pike, C.J., Mack, W.J., Stanczyk, F.Z., et al. (2008). Progesterone receptors: Form and function in brain. *Front. Neuroendocrinol.* 29, 313–339.
- Brodbeck, D., Cron, P., Hemmings, B.A. (1999). A Human protein kinase with regulatory phosphorylation sites in the activation loop and in the C-terminal hydrophobic domain. *J. Biol. Chem.* 274, 9133–9136.
- Bonni, A. (1999). Cell Survival Promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* 286, 1358–1362.
- Bromont, C., Marie, C., Bralet, J. (1989). Increased lipid peroxidation in vulnerable brain regions after transient forebrain ischemia in rats. *Stroke* 20, 918–924.
- Buckmaster, C.A. (2004). Entorhinal cortex lesions disrupt the relational organization of memory in monkeys. *J. Neurosci.* 24, 9811–9825.
- Cai, J., Cao, S., Chen, J., Yan, F., Chen, G., Dai, Y. (2015). Progesterone alleviates acute brain injury via reducing apoptosis and oxidative stress in a rat experimental subarachnoid hemorrhage model. *Neurosci. Lett.* 600, 238–243.
- Cao, D., Bai, Y., and Li, L. (2018). Common Carotid Arteries Occlusion Surgery in Adult Rats as a Model of Chronic Cerebral Hypoperfusion. *BIO-Protoc.* 8, e2704.
- Cenini, G., Sultana, R., Memo, M., Butterfield, D.A. (2008). Effects of oxidative and nitrosative stress in brain on p53 proapoptotic protein in amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 81–85.
- Cenini, G., Lloret, A., Cascella, R. (2019). Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From a Mitochondrial Point of View. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019, 1–18.
- Cervantes, M., González-Vidal, M.D., Ruelas, R., Escobar, A., Morali, G. (2002). Neuroprotective Effects of Progesterone on Damage Elicited by Acute Global Cerebral Ischemia in Neurons of the Caudate Nucleus. *Arch. Med. Res.* 33, 6–14.
- Chaitanya, G.V., Babu, P.P. (2008). Activation of calpain, cathepsin-b and caspase-3 during transient focal cerebral ischemia in rat model. *Neurochem. Res.* 33, 2178–2186.
- Chakrabarti, A., Prakash, A., Hota, D. Naharsaikia, U. (2009). A Study on Progesterone and Curcumine on Cerebral Ischemia in Mice Model. *Conference Abstract: 41st European Brain and Behaviour Society Meeting* [https://www.frontiersin.org/10.3389/conf.neuro.08.2009.09.110/event\\_abstract](https://www.frontiersin.org/10.3389/conf.neuro.08.2009.09.110/event_abstract).
- Chang, C.-M., Su, Y.-F., Chang, C.-Z., Chung, C.-L., Tsai, Y.-J., Loh, J.-K., Lin, C.-L. (2014). Progesterone attenuates experimental subarachnoid hemorrhage-induced vasospasm by upregulation of endothelial nitric oxide synthase via akt signaling pathway. *BioMed Res. Int.* 2014, 1–6.
- Che, M., Wang, R., Li, X., Wang, H.-Y., Zheng, X.F.S. (2016). Expanding roles of superoxide dismutases in cell regulation and cancer. *Drug Discov. Today* 21, 143–149.
- Chen, Z.L., Strickland, S. (1997). Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin. *Cell* 91, 917–925.
- Chen, A., Xiong, L.-J., Tong, Y., Mao, M. (2013). The neuroprotective roles of BDNF in hypoxic ischemic brain injury. *Biomed. Rep.* 1, 167–176.

- Chen, C.-A., Druhan, L.J., Varadharaj, S., Chen, Y.-R., Zweier, J.L. (2008). Phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase regulates superoxide generation from the enzyme. *J. Biol. Chem.* 283, 27038–27047.
- Chen, J., Chopp, M., Li, Y. (1999). Neuroprotective effects of progesterone after transient middle cerebral artery occlusion in rat. *J. Neurol. Sci.* 171, 24–30.
- Chen, M.J., Ramesha, S., Weinstock, L.D., Gao, T., Ping, L., Xiao, H., Dammer, E.B., Duong, D.D., Levey, A.I., Lah, J.J., et al. (2019). Microglial ERK signaling is a critical regulator of pro-inflammatory immune responses in Alzheimer's disease (Neuroscience).
- Chen, Q., Wang, Q., Zhu, J., Xiao, Q., Zhang, L. (2018). Reactive oxygen species: key regulators in vascular health and diseases: ROS in vascular diseases. *Br. J. Pharmacol.* 175, 1279–1292.
- Chen, Z., Mou, R., Feng, D., Wang, Z., Chen, G. (2017). The role of nitric oxide in stroke. *Med. Gas Res.* 7, 194–203.
- Cheng, J.Q., Godwin, A.K., Bellacosa, A., Taguchi, T., Franke, T.F., Hamilton, T.C., Tschlis, P.N., Testa, J.R. (1992). AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 9267–9271.
- Choi, D.-H., Lee, J. (2017). A Mini-Review of the NADPH Oxidases in vascular dementia: Correlation with NOXs and risk factors for VaD. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 2500.
- Chung, C.G., Lee, H., Lee, S.B. (2018). Mechanisms of protein toxicity in neurodegenerative diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* 75, 3159–3180.
- Clark, R.E., Zola, S.M., Squire, L.R. (2000). Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 8853–8860.
- Cohen, R., Adachi, T. (2006). Nitric-oxide-induced vasodilatation: regulation by physiologic S-glutathiolation and pathologic oxidation of the sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium ATPase. *Trends Cardiovasc. Med.* 16, 109–114.
- Contrò, V., R. Basile, J., Proia, P. (2015). Sex steroid hormone receptors, their ligands, and nuclear and non-nuclear pathways. *AIMS Mol. Sci.* 2, 294–310.
- Cummings, J.L. (1993). Frontal-Subcortical Circuits and Human Behavior. *Arch. Neurol.* 50, 873–880.
- Danial, N.N., Korsmeyer, S.J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205–219.
- David, K.K., Andrabi, S.A., Dawson, T.M., Dawson, V.L. (2009). Parthanatos, a messenger of death. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 14, 1116–1128.
- Dawson, V.L., Dawson, T.M. (1996). Nitric oxide neurotoxicity. *J. Chem. Neuroanat.* 10, 179–190.
- Djebaili, M., Hoffman, S.W., Stein, D.G. (2004). Allopregnanolone and progesterone decrease cell death and cognitive deficits after a contusion of the rat pre-frontal cortex. *Neuroscience* 123, 349–359.
- Djebaili, M., Guo, Q., Pettus, E.H., Hoffman, S.W., Stein, D.G. (2005). The neurosteroids progesterone and allopregnanolone reduce cell death, gliosis, and functional deficits after traumatic brain injury in rats. *J. Neurotrauma* 22, 106–118.
- Domínguez, C., Delgado, P., Vilches, A., Martín-Gallán, P., Ribó, M., Santamarina, E., Molina, C., Corbeto, N., Rodríguez-Sureda, V., Rosell, A., et al. (2010). Oxidative stress after thrombolysis-induced reperfusion in human stroke. *Stroke* 41, 653–660.
- Donepudi, M., Grütter, M.G. (2002). Structure and zymogen activation of caspases. *Biophys. Chem.* 101–102, 145–153.
- Dong, Y.-F., Kataoka, K., Toyama, K., Sueta, D., Koibuchi, N., Yamamoto, E., Yata, K., Tomimoto, H., Ogawa, H., Kim-Mitsuyama, S. (2011). Attenuation of brain damage and cognitive impairment by direct renin inhibition in mice with chronic cerebral hypoperfusion. *Hypertension* 58, 635–642.
- Drew, P.D., Chavis, J.A. (2000). Female sex steroids: effects upon microglial cell activation. *J. Neuroimmunol.* 111, 77–85.

- Du, S.-Q., Wang, X.-R., Xiao, L.-Y., Tu, J.-F., Zhu, W., He, T., Liu, C.-Z. (2017). Molecular mechanisms of vascular dementia: what can be learned from animal models of chronic cerebral hypoperfusion? *Mol. Neurobiol.* *54*, 3670–3682.
- Đorđević, B.V., Pavlović, D.D., Kocić, M.G. (2000). *Biohemija slobodnih radikala*, Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu, Niš, Republika Srbija.
- Eaton, J.L., Unno, K., Caraveo, M., Lu, Z., Kim, J.J. (2013). Increased AKT or MEK1/2 activity influences progesterone receptor levels and localization in endometriosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *98*, E1871–E1879.
- Ebrahimzadeh, M., Shahabi, P., Mohaddes, G., Babri, S., Mohammadi, M., Moslem, A., Mohammad-zadeh, M. (2015). Effect of testosterone on memory and BDNF levels of hippocampus in gonadectomized diabetic rats. *Biosci. Biotechnol. Res. Asia* *12*, 2433–2440.
- Ehara, A., Ueda, S. (2009). Application of Fluoro-Jade C in Acute and chronic neurodegeneration models: utilities and staining differences. *ACTA Histochem. Cytochem.* *42*, 171–179.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* *35*, 495–516.
- Esbenshade, T.A., Browman, K.E., Bitner, R.S., Strakhova, M., Cowart, M.D., Brioni, J.D. (2008). The histamine H<sub>3</sub> receptor: an attractive target for the treatment of cognitive disorders. *Br. J. Pharmacol.* *154*, 1166–1181.
- Espinosa-Diez, C., Miguel, V., Mennerich, D., Kietzmann, T., Sánchez-Pérez, P., Cadenas, S., Lamas, S. (2015). Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol.* *6*, 183–197.
- de Farias, C.C., Maes, M., Bonifácio, K.L., Bortolasci, C.C., de Souza Nogueira, A., Brinholi, F.F., Matsumoto, A.K., do Nascimento, M.A., de Melo, L.B., Nixdorf, S.L., et al. (2016). Highly specific changes in antioxidant levels and lipid peroxidation in Parkinson's disease and its progression: Disease and staging biomarkers and new drug targets. *Neurosci. Lett.* *617*, 66–71.
- Farkas, E., Luiten, P.G.M., Bari, F. (2007). Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: A model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain Res. Rev.* *54*, 162–180.
- Feld, M., Krawczyk, M.C., Sol Fustiñana, M., Blake, M.G., Baratti, C.M., Romano, A., Boccia, M.M. (2014). Decrease of ERK/MAPK overactivation in prefrontal cortex reverses early memory deficit in a mouse model of Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* *40*, 69–82.
- Fernandez, S.M., Lewis, M.C., Pechenino, A.S., Harburger, L.L., Orr, P.T., Gresack, J.E., Schafe, G.E., Frick, K.M. (2008). Estradiol-Induced Enhancement of Object Memory Consolidation Involves Hippocampal Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation and Membrane-Bound Estrogen Receptors. *J. Neurosci.* *28*, 8660–8667.
- Ferretti, G., Bacchetti, T., Masciangelo, S., Nanetti, L., Mazzanti, L., Silvestrini, M., Bartolini, M., Provinciali, L. (2008). Lipid peroxidation in stroke patients. *Clin. Chem. Lab. Med.* *46*, 113–117.
- Frick, K.M., Kim, J., Tuscher, J.J., Fortress, A.M. (2015). Sex steroid hormones matter for learning and memory: estrogenic regulation of hippocampal function in male and female rodents. *Learn. Mem.* *22*, 472–493.
- Fleming, I., Busse, R. (2003). Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* *284*, R1–R12.
- Forstermann, U., Sessa, W.C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart J.* *33*, 829–837.
- Fridovich, I., Freeman, B. (1986). Antioxidant defenses in the lung. *Annu. Rev. Physiol.* *48*, 693–702.
- Friguls, B., Petegnief, V., Justicia, C., et al (2002). Activation of ERK and Akt signaling in focal cerebral ischemia: modulation by TGF- $\alpha$  and involvement of NMDA receptor. *Neurobiol Dis.* *11*, 443–456.



- Frijhoff, J., Winyard, P.G., Zarkovic, N., Davies, S.S., Stocker, R., Cheng, D., Knight, A.R., Taylor, E.L., Oettrich, J., Ruskovska, T., et al. (2015). Clinical relevance of biomarkers of oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* *23*, 1144–1170.
- Fucci, L., Oliver, C.N., Coon, M.J., Stadtman, E.R. (1983). Inactivation of key metabolic enzymes by mixed-function oxidation reactions: Possible implication in protein turnover and ageing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *80*, 1521–1525.
- Fulton, D., Gratton, J.-P., McCabe, T.J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T.F., Papapetropoulos, A., Sessa, W.C. (1999). Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* *399*, 597–601.
- Furuchi, T., Anderson, R.G.W. (1998). Cholesterol depletion of caveolae causes hyperactivation of extracellular signal-related kinase (ERK). *J. Biol. Chem.* *273*, 21099–21104.
- Ganesana, M., Erlichman, J.S., Andreescu, S. (2012). Real-time monitoring of superoxide accumulation and antioxidant activity in a brain slice model using an electrochemical cytochrome c biosensor. *Free Radic. Biol. Med.* *53*, 2240–2249.
- Garg, D., Ng, S.S.M., Baig, K.M., Driggers, P., Segars, J. (2017). Progesterone-mediated non-classical signaling. *Trends Endocrinol. Metab.* *28*, 656–668.
- Garry, P.S., Ezra, M., Rowland, M.J., Westbrook, J., Pattinson, K.T.S. (2015). The role of the nitric oxide pathway in brain injury and its treatment — From bench to bedside. *Exp. Neurol.* *263*, 235–243.
- Gaschler, M.M., Stockwell, B.R. (2017). Lipid peroxidation in cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *482*, 419–425.
- Gérard-Monnier, D., Erdelmeier, I., Régnard, K., Moze-Henry, N., Yadan, J.C., Chaudière, J. (1988). Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem. Res. Toxicol.* *11*, 1176–83.
- Gibson, C.L., Constantin, D., Prior, M.J.W., Bath, P.M.W., Murphy, S.P. (2005). Progesterone suppresses the inflammatory response and nitric oxide synthase-2 expression following cerebral ischemia. *Exp. Neurol.* *193*, 522–530.
- Gonzalez Deniselle, M.C., Lopez Costa, J.J., Gonzalez, S.L., Labombarda, F., Garay, L., Guennoun, R., Schumacher, M., De Nicola, A.F. (2002). Basis of progesterone protection in spinal cord neurodegeneration. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *83*, 199–209.
- González-Vidal, M.D., Cervera-Gaviria, M., Ruelas, R., Escobar, A., Morali, G., Cervantes, M. (1998). Progesterone: protective effects on the cat hippocampal neuronal damage due to acute global cerebral ischemia. *Arch. Med. Res.* *29*, 117–124.
- Goodman, Y., Bruce, A.J., Cheng, B., Mattson, M.P. (2002). Estrogens attenuate and corticosterone exacerbates excitotoxicity, oxidative injury, and amyloid  $\beta$ -peptide toxicity in hippocampal neurons. *J. Neurochem.* *66*, 1836–1844.
- Goulart, B.K., de Lima, M.N.M., de Farias, C.B., Reolon, G.K., Almeida, V.R., Quevedo, J., Kapczinski, F., Schröder, N., Roesler, R. (2010). Ketamine impairs recognition memory consolidation and prevents learning-induced increase in hippocampal brain-derived neurotrophic factor levels. *Neuroscience* *167*, 969–973.
- Gray, W.A., Feiring, A., Cioppi, M., Hibbard, R., Gray, B., Khatib, Y., Jessup, D., Bachinsky, W., Rivera, E., Tauth, J., et al. (2015). S.M.A.R.T. Self-expanding nitinol stent for the treatment of atherosclerotic lesions in the superficial femoral artery (STROLL): 1-Year outcomes. *J. Vasc. Interv. Radiol.* *26*, 21–28.
- Groleau, J., Dussault, S., Haddad, P., Turgeon, J., Ménard, C., Chan, J.S., Rivard, A. (2010). Essential role of copper-zinc superoxide dismutase for ischemia-induced neovascularization via modulation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *30*, 2173–2181.
- Gryszczyńska, B., Formanowicz, D., Budzyń, M., Wanic-Kossowska, M., Pawliczak, E., Formanowicz, P., Majewski, W., Strzyżewski, K.W., Kasprzak, M.P., Iskra, M. (2017).

- Advanced oxidation protein products and carbonylated proteins as biomarkers of oxidative stress in selected atherosclerosis-mediated diseases. *BioMed Res. Int.* 2017, 1–9.
- Guerra-Araiza, C., Coyoy-Salgado, A., Camacho-Arroyo, I. (2002). Sex differences in the regulation of progesterone receptor isoforms expression in the rat brain. *Brain Res. Bull.* 59, 105–109.
- Guerra-Araiza, C., Villamar-Cruz, O., González-Arenas, A., Chavira, R., Camacho-Arroyo, I. (2003). Changes in progesterone receptor isoforms content in the rat brain during the oestrous cycle and after oestradiol and progesterone treatments. *J. Neuroendocrinol.* 15, 984–990.
- Guerra-Araiza, C., Amorim, MAR., Pinto-Almazán, R., et al (2009). Regulation of the phosphoinositide-3 kinase and mitogen-activated protein kinase signaling pathways by progesterone and its reduced metabolites in the rat brain. *J Neurosci Res.* 87, 470–481.
- Guo, Q., Sayeed, I., Baronne, L.M., Hoffman, S.W., Guennoun, R., Stein, D.G. (2006). Progesterone administration modulates AQP4 expression and edema after traumatic brain injury in male rats. *Exp. Neurol.* 198, 469–478.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
- Hagihara, M., Nishigaki, I., Maseki, M., Yagi, K. (1984). Age-dependent changes in lipid peroxide levels in the lipoprotein fractions of human serum. *J. Gerontol.* 39, 269–272.
- Hagiwara, A., Ogiwara, K., Takahashi, T. (2016). Expression of membrane progesterin receptors (mprs) in granulosa cells of medaka preovulatory follicles. *Zoolog. Sci.* 33, 98–105.
- Harukuni, I., Bhardwaj, A. (2006). Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia. *Neurol. Clin.* 24, 1–21.
- Hayyan, M., Hashim, M.A., AlNashef, I.M. (2016). Superoxide Ion: generation and chemical implications. *Chem. Rev.* 116, 3029–3085.
- He, J., Evans, C., Hoffman, S., Oyesiku, N., Stein, D. (2004). Progesterone and allopregnanolone reduce inflammatory cytokines after traumatic brain injury. *Exp. Neurol.* 189, 404–412.
- Heikkinen, R., Malm, T., Heikkilä, J., Muona, A., Tanila, H., Koistinaho, M., Koistinaho, J. (2014). Susceptibility to focal and global brain ischemia of alzheimer mice displaying a $\beta$  deposits: effect of immunoglobulin. *Aging Dis.* 5, 76–87.
- Hemmens, B., Mayer, B. (1998). Enzymology of nitric oxide synthases. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 100, 1–32.
- Hossmann, K.-A. (2006). Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cell. Mol. Neurobiol.* 26, 1057–1083.
- Hsieh, H.-J., Liu, C.-A., Huang, B., Tseng, A.H., Wang, D.L. (2014). Shear-induced endothelial mechanotransduction: the interplay between reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) and the pathophysiological implications. *J. Biomed. Sci.* 21, 3.
- Iadecola, C. (1997). Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci.* 20, 132–139.
- Ibanez, C., Shields, S.A., El-Etr, M., Leonelli, E., Magnaghi, V., Li, W.-W., Sim, F.J., Baulieu, E.-E., Melcangi, R.C., Schumacher, M., et al. (2003). Steroids and the reversal of age-associated changes in myelination and remyelination. *Prog. Neurobiol.* 71, 49–56.
- Irwin, R.W., Yao, J., Ahmed, S.S., Hamilton, R.T., Cadenas, E., and Brinton, R.D. (2011). Medroxyprogesterone Acetate Antagonizes Estrogen Up-Regulation of Brain Mitochondrial Function. *Endocrinology* 152, 556–567.
- Ishihara, Y., Takemoto, T., Ishida, A., Yamazaki, T. (2015). Protective actions of 17  $\beta$  -estradiol and progesterone on oxidative neuronal injury induced by organometallic compounds. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015, 1–16.
- Ishrat, T., Sayeed, I., Atif, F., Hua, F., Stein, D.G. (2012). Progesterone is neuroprotective against ischemic brain injury through its effects on the phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B signaling pathway. *Neuroscience* 210, 442–450.

- İşlekel, S., İşlekel, H., Güner, G., and Özdamar, N. (1999). Alterations in superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase activities in experimental cerebral ischemia-reperfusion. *Res. Exp. Med. (Berl.)* 199, 167–176.
- Jena, N.R. (2012). DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair. *J. Biosci.* 37, 503–517.
- Ji, J., Maren, S. (2008). Differential roles for hippocampal areas CA1 and CA3 in the contextual encoding and retrieval of extinguished fear. *Learn. Mem.* 15, 244–251.
- Jiang, N., Chopp, M., Stein, D., Feit, H. (1996). Progesterone is neuroprotective after transient middle cerebral artery occlusion in male rats. *Brain Res.* 735, 101–107.
- Jones, P.F., Jakubowicz, T., Hemmings, B.A. (1991). Molecular cloning of a second form of rac protein kinase. *Cell Regul.* 2, 1001–1009.
- Karlsson, S.A., Studer, E., Kettunen, P., Westberg, L. (2016). Neural androgen receptors modulate gene expression and social recognition but not social investigation. *Front. Behav. Neurosci.* 10, 41.
- Kasapović, J., Pajović, S.B., Kanazir, D.T., Martinović, J.V. (1997). Effects of estradiol benzoate and progesterone on superoxide dismutase activity in the rat liver. *J. Endocrinol. Invest.* 20, 203–206.
- Kašparová, S., Brezová, V., Valko, M., Horecký, J., Mlynárik, V., Liptaj, T., Vančová, O., Uličná, O., Dobrota, D. (2005). Study of the oxidative stress in a rat model of chronic brain hypoperfusion. *Neurochem. Int.* 46, 601–611.
- Katsura, K., Kristián, T., Siesjö, B.K. (1994). Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. *Biochem. Soc. Trans.* 22, 991–996.
- Kaur, P., Jodhka, P.K., Underwood, W.A., Bowles, C.A., de Fiebre, N.C., de Fiebre, C.M., Singh, M. (2007). Progesterone increases brain-derived neurotrophic factor expression and protects against glutamate toxicity in a mitogen-activated protein kinase- and phosphoinositide-3 kinase-dependent manner in cerebral cortical explants. *J. Neurosci. Res.* 85, 2441–2449.
- Kelly, F.J., Mudway, I.S. (2003). Protein oxidation at the air-lung interface. *Amino Acids* 25, 375–396.
- Khorram, O., Han, G. (2009). Influence of progesterone on endometrial nitric oxide synthase expression. *Fertil. Steril.* 91, 2157–2162.
- Kim, E.K., Choi, E.-J. (2010). Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1802, 396–405.
- Kim, Y.-M., Chung, H.-T., Kim, S.-S., Han, J.-A., Yoo, Y.-M., Kim, K.-M., Lee, G.-H., Yun, H.-Y., Green, A., Li, J., et al. (1999). Nitric Oxide Protects PC12 Cells from Serum Deprivation-Induced Apoptosis by cGMP-Dependent Inhibition of Caspase Signaling. *J. Neurosci.* 19, 6740–6747.
- Kim, Y.-M., Kim, T.-H., Seol, D.-W., Talanian, R.V., Billiar, T.R. (1998). Nitric oxide suppression of apoptosis occurs in association with an inhibition of bcl-2 cleavage and cytochrome c release. *J. Biol. Chem.* 273, 31437–31441.
- Kao, C.-H., Chang, C.-Z., Su, Y.-F., Tsai, Y.-J., Chang, K.-P., Lin, T.-K., Hwang, S.-L., Lin, C.-L. (2013). 17 $\beta$ -Estradiol attenuates secondary injury through activation of Akt signaling via estrogen receptor alpha in rat brain following subarachnoid hemorrhage. *J. Surg. Res.* 183, e23–e30.
- Kotur-Stevuljevic, J., Bogavac-Stanojevic, N., Jelic-Ivanovic, Z., Stefanovic, A., Gojkovic, T., Joksic, J., Sopic, M., Gulan, B., Janac, J., Milosevic, S. (2015). Oxidative stress and paraoxonase 1 status in acute ischemic stroke patients. *Atherosclerosis* 241, 192–198.
- Kumari Naga, K., Panigrahi, M., and Prakash Babu, P. (2007). Changes in endogenous antioxidant enzymes during cerebral ischemia and reperfusion. *Neurol. Res.* 29, 877–883.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.

- Leist, M., Fava, E., Montecucco, C., Nicotera, P. (1997). Peroxynitrite and nitric oxide donors induce neuronal apoptosis by eliciting autocrine excitotoxicity. *Eur. J. Neurosci.* 9, 1488–1498.
- Leonelli, E., Bianchi, R., Cavaletti, G., Caruso, D., Crippa, D., Garcia-Segura, L.M., Lauria, G., Magnaghi, V., Roglio, I., Melcangi, R.C. (2007). Progesterone and its derivatives are neuroprotective agents in experimental diabetic neuropathy: A multimodal analysis. *Neuroscience* 144, 1293–1304.
- Levine, A.B., Punihaole, D., Levine, T.B. (2012). Characterization of the Role of Nitric Oxide and Its Clinical Applications. *Cardiology* 122, 55–68.
- Li, Y., Zhang, Z. (2015). Gastrodin improves cognitive dysfunction and decreases oxidative stress in vascular dementia rats induced by chronic ischemia. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 14099–14109.
- Li, S., Zheng, J., Carmichael, S.T. (2005). Increased oxidative protein and DNA damage but decreased stress response in the aged brain following experimental stroke. *Neurobiol. Dis.* 18, 432–440.
- Li, Z., Wang, B., Kan, Z., Zhang, B., Yang, Z., Chen, J., Wang, D., Wei, H., Zhang, J.N., Jiang, R. (2012) Progesterone increases circulating endothelial progenitor cells and induces neural regeneration after traumatic brain injury in aged rats. *J Neurotrauma* 20; 29,343–53.
- Li, S., Zheng, J., Carmichael, S.T. (2005). Increased oxidative protein and DNA damage but decreased stress response in the aged brain following experimental stroke. *Neurobiol. Dis.* 18, 432–440.
- Lin, C.-S., Polsky, K., Nadler, J.V., Crain, B.J. (1990). Selective neocortical and thalamic cell death in the gerbil after transient ischemia. *Neuroscience* 35, 289–299.
- Liu, H., Zhang, J., Yang, Y., Zhang, L., Zeng, X. (2012). Decreased cerebral perfusion and oxidative stress result in acute and delayed cognitive impairment. *Curr. Neurovasc. Res.* 9, 152–158.
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147–157.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif* 25, 402–408.
- Macbeth, A.H., Luine, V.N. (2010). Changes in anxiety and cognition due to reproductive experience: A review of data from rodent and human mothers. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 34, 452–467.
- Malorni, W., Campesi, I., Straface, E., Vella, S., Franconi, F. (2007). Redox Features of the Cell: a gender perspective. *Antioxid. Redox Signal.* 9, 1779–1802.
- Mani, S. (2008). Progestin receptor subtypes in the brain: the known and the unknown. *Endocrinology* 149, 2750–2756.
- Markwell, M.A.K., Haas, S.M., Bieber, L.L., Tolbert, N.E. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* 87, 206–210.
- Marques, B.L., Carvalho, G.A., Freitas, E.M.M., Chiareli, R.A., Barbosa, T.G., Di Araújo, A.G.P., Nogueira, Y.L., Ribeiro, R.I., Parreira, R.C., Vieira, M.S., et al. (2019). The role of neurogenesis in neurorepair after ischemic stroke. *Semin. Cell Dev. Biol.* 95, 98–110.
- Martínez-Lara, E. (2003). Glutathione S-transferase isoenzymatic response to aging in rat cerebral cortex and cerebellum. *Neurobiol. Aging* 24, 501–509.
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., and Giovannini, C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem.* 16, 577–586.
- Matsubara, K., Higaki, T., Matsubara, Y., Nawa, A. (2015). Nitric oxide and reactive oxygen species in the pathogenesis of preeclampsia. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 4600–4614.

- Matsushita, K., Morrell, C.N., Cambien, B., Yang, S.X., Yamakuchi, M., Bao, C., Hara, M.R., Quick, R.A., Cao, W., O'Rourke, B., et al. (2003). Nitric oxide regulates exocytosis by S-nitrosylation of N-ethylmaleimide-sensitive factor. *Cell* 115, 139–150.
- Meffre, D., Labombarda, F., Delespierre, B., Chastre, A., De Nicola, A.F., Stein, D.G., Schumacher, M., Guennoun, R. (2013). Distribution of membrane progesterone receptor alpha in the male mouse and rat brain and its regulation after traumatic brain injury. *Neuroscience* 231, 111–124.
- Misra, H.P., Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247, 3170–3175.
- Moore, C., Sanz-Rosa, D., Emerson, M. (2011). Distinct role and location of the endothelial isoform of nitric oxide synthase in regulating platelet aggregation in males and females in vivo. *Eur. J. Pharmacol.* 651, 152–158.
- Moro, M.A., Cárdenas, A., Hurtado, O., Leza, J.C., Lizasoain, I. (2004). Role of nitric oxide after brain ischaemia. *Cell Calcium* 36, 265–275.
- Mracsó, É., Hügyecz, M., Instítóris, Á., Farkas, E., Bari, F. (2010). Changes in pro-oxidant and antioxidant enzyme levels during cerebral hypoperfusion in rats. *Brain Res.* 1321, 13–19.
- Nakatomi, H., Kuriu, T., Okabe, S., Yamamoto, S., Hatano, O., Kawahara, N., Tamura, A., Kirino, T., Nakafuku, M. (2002). Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 110, 429–441.
- Namura, S., Iihara, K., Takami, S., Nagata, I., Kikuchi, H., Matsushita, K., Moskowitz, M.A., Bonventre, J.V., Alessandrini, A. (2001). Intravenous administration of MEK inhibitor U0126 affords brain protection against forebrain ischemia and focal cerebral ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 11569–11574.
- Nemirovich-Danchenko, N.M., Khodanovich, M.Yu. (2019). New Neurons in the post-ischemic and injured brain: migrating or resident? *Front. Neurosci.* 13, 588.
- Nikolić, A., Mijalković, D., Nikolić-Kokić, A., Kastratović, D., Blagojević, D., Davidović, B., Spasić, M. (2006). Elevated serum uric acid reduce heart damage in patients undergoing open-heart surgery. *Acta Chir. Yugosl.* 53, 29–33.
- Nikolić-Kokić, A., Tatalović, N., Nestorov, J., Mijović, M., Mijusković, A., Miler, M., Oreščanin-Dušić, Z., Nikolić, M., Milošević, V., Blagojević, D., et al. (2018). Clozapine, ziprasidone, and sertindole-induced morphological changes in the rat heart and their relationship to antioxidant enzymes function. *J. Toxicol. Environ. Health A* 81, 844–853.
- Nilsen, J., Brinton, R.D. (2002a). Impact of progestins on estradiol potentiation of the glutamate calcium response. *Neuroreport* 13, 825–830.
- Nilsen, J., Brinton, R.D. (2002b). Impact of progestins on estrogen-induced neuroprotection: synergy by progesterone and 19-norprogesterone and antagonism by medroxyprogesterone acetate. *Endocrinology* 143, 205–212.
- Noshita, N., Lewén, A., Sugawara, T., and Chan, P.H. (2001). Evidence of phosphorylation of akt and neuronal survival after transient focal cerebral ischemia in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21, 1442–1450.
- Orr, P.T., Lewis, M.C., Frick, K.M. (2009). Dorsal hippocampal progesterone infusions enhance object recognition in young female mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 93, 177–182.
- Ozacmak, V.H., Sayan, H. (2009). The effects of 17beta estradiol, 17alpha estradiol and progesterone on oxidative stress biomarkers in ovariectomized female rat brain subjected to global cerebral ischemia. *Physiol. Res.* 58, 909–912.
- Pajović, S.B., Sačić, Z.S., Spasić, M.B., Petrović, V.M. (2003). The effect of ovarian hormones on antioxidant enzyme activities in the brain of male rats. *Physiol. Res.* 52, 189–194.
- Pajović, S.B., Sačić, Z.S. (2008). Modulation of antioxidant enzyme activities by sexual steroid hormones. *Physiol. Res.* 57, 801–811.
- Pang, Y., Dong, J., Thomas, P. (2015). Progesterone increases nitric oxide synthesis in human vascular endothelial cells through activation of membrane progesterone receptor- $\alpha$ . *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 308, E899–E911.

- Peso, L.D. (1997). Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278, 687–689.
- Pettus, E.H., Wright, D.W., Stein, D.G., Hoffman, S.W. (2005). Progesterone treatment inhibits the inflammatory agents that accompany traumatic brain injury. *Brain Res.* 1049, 112–119.
- Phaniendra, A., Jestadi, D.B., Periyasamy, L. (2015). Free Radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J. Clin. Biochem.* 30, 11–26.
- Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C.J., Valko, M. (2017). Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* 38, 592–607.
- Preilowski, B. (2009). Erinnerung an einen amnestiker (und ein halbes jahrhundert gedächtnisforschung). *Fortschritte Neurol. Psychiatr.* 77, 568–576.
- Pulsinelli, W.A., Buchan, A.M. (1988). The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. *Stroke* 19, 913–914.
- Rahman, T., Hosen, I., Islam, M.M.T., Shekhar, H.U. (2012). Oxidative stress and human health. *Adv. Biosci. Biotechnol.* 03, 997–1019.
- Rajendran, P., Nandakumar, N., Rengarajan, T., Palaniswami, R., Gnanadhas, E.N., Lakshminarasiah, U., Gopas, J., Nishigaki, I. (2014). Antioxidants and human diseases. *Clin. Chim. Acta* 436, 332–347.
- Roher, A.E., Debbins, J.P., Malek-Ahmadi, M., Chen, K., Pipe, J.G., Maze, S., Belden, C., Maarouf, C.L., Thiyyagura, P., Mo, H., et al. (2012). Cerebral blood flow in Alzheimer's disease. *Vasc. Health Risk Manag.* 8, 599–611.
- Roof, R.L., Hall, E.D. (2000). Gender differences in acute CNS trauma and stroke: neuroprotective effects of estrogen and progesterone. *J. Neurotrauma* 17, 367–388.
- Roof, R.L., Hoffman, S.W., Stein, D.G. (1997). Progesterone protects against lipid peroxidation following traumatic brain injury in rats. *Mol. Chem. Neuropathol.* 31, 1–11.
- Röth, E., Marczin, N., Balatonyi, B., Ghosh, S., Kovács, V., Alotti, N., Borsiczky, B., Gasz, B. (2011). Effect of a glutathione S-transferase inhibitor on oxidative stress and ischemia-reperfusion-induced apoptotic signalling of cultured cardiomyocytes. *Exp. Clin. Cardiol.* 16, 92–96.
- Rutledge, R.G., Côté, C. (2003). Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Res.* 31, e93.
- Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gurp, M., van Loo, G., Vandenabeele, P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23, 2861–2874.
- Salazar, M., Lerma-Ortiz, A., Hooks, G.M., Ashley, A.K., Ashley, R.L. (2016). Progesterone-mediated activation of MAPK and AKT in nuclear progesterone receptor negative breast epithelial cells: The role of membrane progesterone receptors. *Gene* 591, 6–13.
- Salvadores, N., Searcy, J.L., Holland, P.R., Horsburgh, K. (2017). Chronic cerebral hypoperfusion alters amyloid- $\beta$  peptide pools leading to cerebral amyloid angiopathy, microinfarcts and haemorrhages in Tg-SwDI mice. *Clin. Sci.* 131, 2109–2123.
- Saxena, A.K., Abdul-Majeed, S.S., Gurtu, S., Mohamed, W.M.Y. (2015). Investigation of redox status in chronic cerebral hypoperfusion-induced neurodegeneration in rats. *Appl. Transl. Genomics* 5, 30–32.
- Schumacher, M., Guennoun, R., Stein, D.G., De Nicola, A.F. (2007). Progesterone: therapeutic opportunities for neuroprotection and myelin repair. *Pharmacol. Ther.* 116, 77–106.
- Selaković, V.M., Jovanović, M.D., Jovčić, A. (2002). Changes of cortisol levels and index of lipid peroxidation in cerebrospinal fluid of patients in the acute phase of completed stroke. *Vojnosanit. Pregl.* 59, 485–491.
- Shah, N.M., Lai, P.F., Imami, N., Johnson, M.R. (2019). Progesterone-Related Immune Modulation of Pregnancy and Labor. *Front. Endocrinol.* 10, 1–19
- Shih, H.-C., Lin, C.-L., Wu, S.-C., Kwan, A.-L., Hong, Y.-R., Howng, S.-L. (2008). Upregulation of estrogen receptor  $\alpha$  and mediation of 17 $\beta$ -estradiol vasoprotective effects via estrogen receptor  $\alpha$  in basilar arteries in rats after experimental subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosurg.* 109, 92–99.

- Shioda, N., Han, F., Fukunaga, K. (2009). Chapter 26 Role of Akt and Erk signaling in the neurogenesis following brain ischemia. *International Review of Neurobiology*, 85, 375–387.
- Shu, Y., Zhang, H., Kang, T., Zhang, J., Yang, Y., Liu, H., Zhang, L. (2013). PI3K/Akt signal pathway involved in the cognitive impairment caused by chronic cerebral hypoperfusion in rats. *PLoS ONE* 8, e81901.
- Simoncini, T., Fu, X.-D., Caruso, A., Garibaldi, S., Baldacci, C., Giretti, M.S., Mannella, P., Flamini, M.I., Sanchez, A.M., Genazzani, A.R. (2007). Drospirenone increases endothelial nitric oxide synthesis via a combined action on progesterone and mineralocorticoid receptors. *Hum. Reprod.* 22, 2325–2334.
- Singh, M. (2001). Ovarian hormones elicit phosphorylation of akt and extracellular-signal regulated kinase in explants of the cerebral cortex. *Endocrine* 14, 407–416.
- Singh, S. (2015). Cytoprotective and regulatory functions of glutathione S-transferases in cancer cell proliferation and cell death. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 75, 1–15.
- Singh, M., Su, C. (2013). Progesterone and neuroprotection. *Horm. Behav.* 63, 284–290.
- Singh, A., Kukreti, R., Saso, L., Kukreti, S. (2019). Oxidative stress: a key modulator in neurodegenerative diseases. *Molecules* 24, 1583.
- Singh, M., Su, C., Ng, S. (2013). Non-genomic mechanisms of progesterone action in the brain. *Front. Neurosci.* 7, 159.
- Smith, M.-L., Auer, R.N., Siesj, B.K. (1984). The density and distribution of ischemic brain injury in the rat following 2-10 min of forebrain ischemia. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 64, 319–332.
- Soldani, C., Scovassi, A.I. (2002). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 7, 321–328.
- Stamler, J.S. (1994). Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 78, 931–936.
- Stanojlovic, M. (2014a). Efekat estradiola u modulaciji apoptotskih signala u moždanoj kori i hipokampusu pacova tokom hronične moždane hipoperfuzije. Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija
- Stanojlović, M., Horvat, A., Gusevac, I., Grkovic, I., Mitrovic, N., Buzadić, I., Drakulic, D. (2014b) Time course of cerebral hypoperfusion-induced neurodegenerative changes in the cortex of male and female rats. *Folia Biol. (Praha)*, 60, 123–132.
- Stanojlovic, M., Gusevac, I., Grkovic, I., Mitrovic, N., Horvat, A., Drakulic, D. (2014c). Time-related sex differences in cerebral hypoperfusion-induced brain injury. *Arch. Biol. Sci.* 66, 1673–1680.
- Stanojlović, M., Guševac, I., Grković, I., Zlatković, J., Mitrović, N., Zarić, M., Horvat, A., Drakulić, D. (2015a). Effects of chronic cerebral hypoperfusion and low-dose progesterone treatment on apoptotic processes, expression and subcellular localization of key elements within Akt and Erk signaling pathways in rat hippocampus. *Neuroscience* 311, 308–321.
- Stanojlović, M., Zlatković, J., Guševac, I., Grković, I., Mitrović, N., Zarić, M., Horvat, A., Drakulić, D. (2015b). Repeated low-dose 17 $\beta$ -estradiol treatment prevents activation of apoptotic signaling both in the synaptosomal and cellular fraction in rat prefrontal cortex following cerebral ischemia. *Neurochem. Int.* 83–84, 1–8.
- Stanojlović, M., Guševac, I., Grković, I., Mitrović, N., Zlatković, J., Horvat, A., Drakulić, D. (2016). Repeated estradiol treatment attenuates chronic cerebral hypoperfusion-induced neurodegeneration in rat hippocampus. *Cell. Mol. Neurobiol.* 36, 989–999.
- Stanojlović, M., Guševac Stojanović, I., Zarić, M., Martinović, J., Mitrović, N., Grković, I., Drakulić, D. (2019). Progesterone protects prefrontal cortex in rat model of permanent bilateral common carotid occlusion via progesterone receptors and Akt/Erk/eNOS. *Cell. Mol. Neurobiol.*
- Stein, D.G. (2008). Progesterone exerts neuroprotective effects after brain injury. *Brain Res. Rev.* 57, 386–397.

- Subramaniam, S., Unsicker, K. (2010). ERK and cell death: ERK1/2 in neuronal death: ERK1/2 in neuronal death. *FEBS J.* 277, 22–29.
- Sung, Y.-J., Ambron, R.T. (2004). PolyADP-ribose polymerase-1 (PARP-1) and the evolution of learning and memory. *BioEssays* 26, 1268–1271.
- Sutherland, G., Bose, R., Louw, D., Pinsky, C. (1991). Global elevation of brain superoxide dismutase activity following forebrain ischemia in rat. *Neurosci. Lett.* 128, 169–172.
- Szymańska, M., Suska, A., Budziszewska, B., Jaworska-Feil, L., Basta-Kaim, A., Leśkiewicz, M., Kubera, M., Gergont, A., Krocza, S., Kaciński, M., et al. (2009). Prenatal stress decreases glycogen synthase kinase-3 phosphorylation in the rat frontal cortex. *Pharmacol. Rep.* 61, 612–620.
- Tang, H., Zhang, Q., Yang, L., Dong, Y., Khan, M., Yang, F., Brann, D.W., Wang, R. (2014). GPR30 mediates estrogen rapid signaling and neuroprotection. *Mol. Cell. Endocrinol.* 387, 52–58.
- Tagalatela, G., Hogan, D., Zhang, W.-R., and Dineley, K.T. (2009). Intermediate- and long-term recognition memory deficits in Tg2576 mice are reversed with acute calcineurin inhibition. *Behav. Brain Res.* 200, 95–99.
- Terada, L.S., Leff, J.A., Repine, E. (1990). Measurement of xanthine oxidase in biological tissues. In *Methods in Enzymology* 186, 651–656.
- Thomas, A.J., Nockels, R.P., Pan, H.Q., Shaffrey, C.I., Chopp, M. (1999). Progesterone is neuroprotective after acute experimental spinal cord trauma in rats. *Spine* 24, 2134.
- Togashi, H., Sakuma, I., Yoshioka, M., Kobayashi, T., Yasuda, H., Kitabatake, A., Saito, H., Gross, S.S., Levi, R. (1992). A central nervous system action of nitric oxide in blood pressure regulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 262, 343–347.
- Tsang, A.H.K., Chung, K.K.K. (2009). Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1792, 643–650.
- Tsujimoto, Y. (1998). Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells* 3, 697–707.
- Uylings, H.B.M., Groenewegen, H.J., Kolb, B. (2003). Do rats have a prefrontal cortex? *Behav. Brain Res.* 146, 3–17.
- Valko, M., Jomova, K., Rhodes, C.J., Kuča, K., Musílek, K. (2016). Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Arch. Toxicol.* 90, 1–37.
- Vila, J., Gemma, C., Bachstetter, A., Bickford, P. (2007). Oxidative stress and the aging brain: from theory to prevention. In *Brain Aging*, D. Riddle, ed. (CRC Press), pp. 353–374.
- Vladimirov, G.K., Vikulina, A.S., Volodkin, D., Vladimirov, Yu.A. (2018). Structure of the complex of cytochrome c with cardiolipin in non-polar environment. *Chem. Phys. Lipids* 214, 35–45.
- Wagner, G.P., Tong, Y., Emera, D., Romero, R. (2012). An evolutionary test of the isoform switching hypothesis of functional progesterone withdrawal for parturition: humans have a weaker repressive effect of PR-A than mice. *J. Perinat. Med.* 40, 345–51.
- Wali, B., Ishrat, T., Won, S., Stein, D.G., Sayeed, I. (2014). Progesterone in experimental permanent stroke: a dose-response and therapeutic time-window study. *Brain* 137, 486–502.
- Wang, Y., Newton, D.C., Robb, G.B., Kau, C.L., Miller, T.L., Cheung, A.H., Hall, A.V., VanDamme, S., Wilcox, J.N., Marsden, P.A. (1999). RNA diversity has profound effects on the translation of neuronal nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 12150–12155.
- Wang, B., Yang, R.-N., Zhu, Y.-R., Xing, J.-C., Lou, X.-W., He, Y.-J., Ding, Q.-L., Zhang, M.-Y., Qiu, H. (2017). Involvement of xanthine oxidase and paraoxonase 1 in the process of oxidative stress in nonalcoholic fatty liver disease. *Mol. Med. Rep.* 15, 387–395.



- Watts, L., Sprague, S., Fletcher, L., Jimenez, D., Digicaylioglu, M., Garling, R. (2014). Does progesterone show neuroprotective effects on traumatic brain injury through increasing phosphorylation of Akt in the hippocampus? *Neural Regen. Res.* 9, 1891–1896.
- Wei, J., Xiao, G. (2013). The neuroprotective effects of progesterone on traumatic brain injury: current status and future prospects. *Acta Pharmacol. Sin.* 34, 1485–1490.
- Weidinger, A., Kozlov, A. (2015). Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: oxidative stress versus signal transduction. *Biomolecules* 5, 472–484.
- Weight, S.C., Nicholson, M.L. (1998). Nitric oxide and renal reperfusion injury: a review. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 16, 98–103.
- Wind, S., Beuerlein, K., Eucker, T., Müller, H., Scheurer, P., Armitage, M., Ho, H., Schmidt, H., Wingler, K. (2010). Comparative pharmacology of chemically distinct NADPH oxidase inhibitors: Pharmacology of NADPH oxidase inhibitors. *Br. J. Pharmacol.* 161, 885–898.
- Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillère-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A.T., Zingraff, J., Jungers, P., Descamps-Latscha, B. (1996). Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* 49, 1304–1313.
- Williams, D.L., Ozment-Skelton, T., Li, C. (2006). Modulation of the phosphoinositide 3-kinase signaling pathway alters host response to sepsis, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Shock* 25, 432–439.
- Wright, D.W., Bauer, M.E., Hoffman, S.W., Stein, D.G. (2001). Serum progesterone levels correlate with decreased cerebral edema after traumatic brain injury in male rats. *J. Neurotrauma* 18, 901–909.
- Yakovlev, A.G., Di, X., Movsesyan, V., Mullins, P.G., Wang, G., Boulares, H., Zhang, J., Xu, M., Faden, A.I. (2001). Presence of DNA fragmentation and lack of neuroprotective effect in DFF45 knockout mice subjected to traumatic brain injury. *Mol. Med. Camb. Mass* 7, 205–216.
- Yamamoto, M., Shima, T., Uozumi, T., Sogabe, T., Yamada, K., Kawasaki, T. (1983). A possible role of lipid peroxidation in cellular damages caused by cerebral ischemia and the protective effect of alpha-tocopherol administration. *Stroke* 14, 977–982.
- Yamashita, T., Ninomiya, M., Hernandez Acosta, P., Garcia-Verdugo, J.M., Sunabori, T., Sakaguchi, M., Adachi, K., Kojima, T., Hirota, Y., Kawase, T., et al. (2006). Subventricular Zone-Derived Neuroblasts Migrate and Differentiate into Mature Neurons in the Post-Stroke Adult Striatum. *J. Neurosci.* 26, 6627–6636.
- Yang, L., Zhang, Q.-G., Zhou, C., Yang, F., Zhang, Y., Wang, R., Brann, D.W. (2010). Extranuclear Estrogen Receptors Mediate the Neuroprotective Effects of Estrogen in the Rat Hippocampus. *PLoS ONE* 5, e9851.
- Yao, R., Cooper, G. (1995). Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* 267, 2003–2006.
- Yao, D., Gu, Z., Nakamura, T., Shi, Z.-Q., Ma, Y., Gaston, B., Palmer, L.A., Rockenstein, E.M., Zhang, Z., Masliah, E., et al. (2004). Nitrosative stress linked to sporadic Parkinson's disease: S-nitrosylation of parkin regulates its E3 ubiquitin ligase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 10810–10814.
- Yin, F.J., Kang, J., Han, N.N., Ma, H.T. (2015). Effect of dehydroepiandrosterone treatment on hormone levels and antioxidant parameters in aged rats. *Genet. Mol. Res.* 14, 11300–11311.
- Yousuf, S., Brat, D.J., Shu, H.-K., Wang, Y., Stein, D.G., Atif, F. (2017). Progesterone improves neurocognitive outcomes following therapeutic cranial irradiation in mice. *Horm. Behav.* 96, 21–30.
- Yuste, J.E., Tarragon, E., Campuzano, C.M., Ros-Bernal, F. (2015). Implications of glial nitric oxide in neurodegenerative diseases. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 322, 1–13.
- Zhao, H., Sapolsky, R.M., Steinberg, G.K. (2006). Phosphoinositide-3-Kinase/Akt survival signal pathways are implicated in neuronal survival after stroke. *Mol. Neurobiol.* 34, 249–270.

- Zhao, Y., Luo, P., Guo, Q., Li, S., Zhang, L., Zhao, M., Xu, H., Yang, Y., Poon, W., Fei, Z. (2012). Interactions between SIRT1 and MAPK/ERK regulate neuronal apoptosis induced by traumatic brain injury in vitro and in vivo. *Exp. Neurol.* 237, 489–498.
- Zhou, L., Zhu, D.-Y. (2009). Neuronal nitric oxide synthase: Structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide* 20, 223–230.
- Zhao, J., Mysona, B.A., Wang, J., Gonsalvez, G.B., Smith, S.B., Bollinger, K.E. (2017). Sigma 1 receptor regulates ERK activation and promotes survival of optic nerve head astrocytes. *PLOS ONE* 12, e0184421.
- Zhu, X., Castellani, R.J., Takeda, A., Nunomura, A., Atwood, C.S., Perry, G., Smith, M.A. (2001). Differential activation of neuronal ERK, JNK/SAPK and p38 in Alzheimer disease: the “two hit” hypothesis. *Mech. Ageing Dev.* 123, 39–46.
- Zhang, X.-H., Lei, H., Liu, A.-J., Zou, Y.-X., Shen, F.-M., Su, D.-F. (2011). Increased oxidative stress is responsible for severer cerebral infarction in stroke-prone spontaneously hypertensive rats: oxidative stress and stroke in rats. *CNS Neurosci. Ther.* 17, 590–598.

***PRILOG***

## Skraćenice

AB	Alchajmerova bolest
ADP	adenozin-difosfat
AGC	protein kinaza A/protein kinaza G/protein kinaza C superfamilija protein kinaza
AIF	faktor indukcije apoptoze (eng. <i>apoptosis inducing factor</i> )
Akt	protein kinaza B
AMP	adenozin-monofosfat
ANOVA	jednofaktorijalna analiza varijanse (eng. <i>one way analysis of variance</i> )
AO	anti-oksidativno
AOPP	produkti uznapredovale oksidativne modifikacije proteina (eng. <i>advanced oxidation of protein products</i> )
APAF-1	faktor aktivacije apoptotičnih proteaza 1 (eng. <i>apoptotic protease activating factor 1</i> )
Asp	aspartat
ATP	adenozin-trifosfat
B	intaktna DNK
Bad	Bcl-2 antagonista ćelijske smrti (eng. <i>Bcl-2 antagonist of cell death</i> )
Bak	Bcl-2 antagonista ubica (eng. <i>Bcl-2 antagonistic killer</i> )
Bax	protein X asociran sa Bcl-2 (eng. <i>Bcl-2 associated X protein</i> )
Bcl-w	protein 2 nalik na Bcl-2 (eng. <i>Bcl-2-like protein 2</i> )
Bcl-xl	Bcl-ekstra dugačak (eng. <i>Bcl-extra long</i> )
Bcl-2	limfom 2 B-ćelije (eng. <i>B-cell lymphoma 2</i> )
BDNF	neurotrofni faktor koji potiče iz mozga (eng. <i>brain derived neurotrophic factor</i> )
BH	Bcl-2 homologni domen
Bid	agonista domena smrti koji interaguje sa Bcl-2 (eng. <i>Bcl-2 interacting domain death agonist</i> )
Bim	medijator ćelijske smrti koji interaguje sa Bcl-2 (eng. <i>Bcl-2 interacting mediator of cell death</i> )
BSA	goveđi serumski albumin (eng. <i>bovine serum albumin</i> )
CA	ovnov rog (lat. <i>cornu ammonis</i> )
cAMP	ciklični adenozin-monofosfat
CAT	katalaza
CDNB	1-hloro-2,4-dinitrobenzen
cGMP	ciklični guanozin-monofosfat
cit	citosolna frakcija
CitC	citohrom C
CNS	centralni nervni sistem
C <sub>pr</sub>	koncentracija proteina [mg/ml]
CREB	element koji odgovara na cAMP (eng. <i>cAMP responsive element</i> )
Ct	početak detektibilne amplifikacije u funkciji logaritma koncentracije cDNK
CuZnSOD	bakar cink superoksid dismutaza
Cys	cistein
dH <sub>2</sub> O	destilovana voda
ddH <sub>2</sub> O	bidestilovana voda
DEPC	dietil pirokarbonat
DMSO	dimetilsulfoksid
dNTP	miks dezoksinukleotida
DPA	difenilamin
DTT	ditiotreitrol

E	efikasnost amplifikacije
ECL	pojačana hemiluminiscenca (eng. <i>enhanced chemiluminescence</i> )
EDTA	etilendiamino-tetrasirćetna kiselina
EGTA	etilenglikol-bis (2-aminoetiletar)-N,N,N',N'-tetra sirćetna kiselina
eNOS	endotelna azot oksid sintaza (eng. <i>endothelial nitric oxide synthase</i> )
EPM	uzdignuti lavirint u obliku znaka „plus“ (eng. <i>elevated plus maze</i> )
Erk	kinaze regulisane vanćelijskim signalima (eng. <i>Extracellular signal-Regulated Kinases</i> )
FJC	fluoro-Jade C bojenje
GABA	$\gamma$ -amino buterna kiselina
GABA-A	receptori vezani za membranu koji odgovaraju na GABA
Gly	glicin
GPx	fosfolipid-zavisna glutation-peroksidaza
GSH	glutation
GST	glutation S-transferaza
HIPP	hipokampus (lat. <i>hippocampus</i> )
hloramin T	N-hloro-p-toluensulfonamid natrijum
HOCl	hipohlorna kiselina
HSP	protein toplotnog šoka (eng. <i>heat shock protein</i> )
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	vodonik-peroksid
iNOS	inducibilna azot oksid-sintaza (eng. <i>inducible nitric oxide synthase</i> )
jed	jedarna frakcija, nukleosol
LPO	lipidna peroksidacija
KMB	krvno- moždana barijera
MAPK	mitogenom aktivirane protein kinaze
Mcl-1	faktor-1 leukemije mijeloidne ćelije
MDA	malondialdehid
MEK	mitogenom aktivirane protein kinaze
MH	moždana hipoperfuzija
MnSOD	mangan-superoksid dismutaza
mPR	progesteronski receptori vezani za membranu
mth	mitohondrijska frakcija, mitosol
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NAD(P)H oksidaza	nikotin adenindinukleotid fosfat-oksidaza
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaza	natrijum-kalijum adenozin-trifosfataza
NFM	nemasno mleko u prahu (eng. <i>non-fat milk powder</i> )
NO	azot oksid
nNOS	nervna azot oksid-sintaza (eng. <i>neuronal nitric oxide synthase</i> )
NOS	azot oksid-sintaza (eng. <i>nitric oxide synthase</i> )
NOR	test prepoznavanja novog predmeta (eng. <i>novel object recognition</i> )
NS	nitrozativni stres
OD	optička gustina (eng. <i>optical density</i> )
OF	test otvorenog polja (eng. <i>open field</i> )
·OH	hidroksi radikal
ONOO <sup>-</sup>	peroksinitritni anjon
OS	oksidativni stres
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	superoksidni anjon
PAA	poliakrilamid
PAB	pro-oksidativni/anti-oksidativni balans
PARP	poli (ADP-ribozna)-polimeraza (eng. <i>poly (ADP ribose) polymerase</i> )

PAqR	progestin i adipoQ receptori
PB	Parkinsonova bolest
PCA	perhlorna kiselina
PFA	paraformaldehid
PFC	prečeaona moždana kora (lat. <i>cortex praefrontalis</i> )
PGRMC1	komponenta 1 membranskog progesteronskog receptora (eng. <i>progesterone receptor membrane component 1</i> )
PI3K	fosfatidil-inozitol 3-kinaza
PMSF	fenilmetilsulfonil fluorid
PR	progesteronski receptor
PRE	sekvence za koje se vezuje progesteron (eng. <i>progesterone response elements</i> )
PUFAs	polinezasićene masne kiseline (eng. <i>polyunsaturated fatty acids</i> )
PVDF	poliviniliden fluorid
P4	progesteron, pregn-4-en-3,20-dion
R	razblaženje uzorka
RNS	reaktivne azotne vrste (eng. <i>reactive nitrogen species</i> )
ROS	reaktivne kiseonične vrste (eng. <i>reactive oxygen species</i> )
RPL19	gen za ribozomalni protein L19 (eng. <i>60S ribosomal protein L19</i> )
RTqPCR	kvantitativni PCR u realnom vremenu (eng. <i>real time quantitative PCR</i> )
SAH	subarahnoidna hemoragija
SDS	natrijum dodecil sulfat
SEM	standardna greška merenja
Ser	serin
SH	sulfhidril
Sham	lažna operacija
S + V	lažno operisane životinje koje su primale injekcije lanenog ulja
SOD	superoksid dismutaza
SRC	proto-onkogenska tirozinska kinaza
ST	sobna temperatura
T	fragmentisana DNK
TEMED	N,N,N',N'- tetrametiletildiamin
Thr	treonin
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidin
TMOP	1,1,3,3-tetrametoksi propan
TPM	traumatska povreda mozga
Tyr	tirozin
V	zapremina uzorka u kojoj je određena aktivnost enzima
VAD	vaskularna demencija
XDH	ksantin-dehidrogenaza (eng. <i>xanthine dehydrogenase</i> )
XOD	ksantin-oksidaža (eng. <i>xanthine oxidase</i> )
1VO	podvezivanje jednog krvnog suda, obično jedne zajedničke karotidne arterije (eng. <i>one vessel occlusion</i> )
2VO	podvezivanje dva krvna suda, obično obe zajedničke karotidne arterije (eng. <i>two vessel occlusion</i> )
2VO + P4	operisane životinje koje su primale injekcije progesterona rastvorenog u lanenom ulju
2VO + V	operisane životinje koje su primale injekcije lanenog ulja
3VO	podvezivanje tri krvna suda, obično vertebralnih i karotidnih arterija u različitim kombinacijama (eng. <i>three vessel occlusion</i> )
4-HNE	4-hidroksi-2,3-nonanal

4VO	podvezivanje zajedničkih karotidnih i vertebralnih arterija (eng. <i>four vessel occlusion</i> )
$\beta$ NAD <sup>+</sup>	$\beta$ nikotinamid adenin dinukleotid
$\Delta A$	promena vrednosti apsorbance/min pri reakciji sa uzorkom
$\Delta A_{uz}$	srednja promena apsorbance uzorka u min
$\Delta A_{bl}$	srednja promena apsorbance blanka u min
$\Delta K$	promena vrednosti apsorbance/min pri reakciji sa blankom

## **BIOGRAFIJA AUTORA**

Ivana (Dragan) Guševac Stojanović, rođ. Guševac, rođena je 24.07.1983. u Loznici. Prirodno-matematički smer gimnazije „Vuk Karadžić“ u Loznici završila je 2002. i iste godine upisala Biološki fakultet, Univerziteta u Beogradu, odsek Molekularna biologija i fiziologija, smer Eksperimentalna biomedicina. Diplomski rad pod nazivom „Alergijske reakcije i njihovi patogenetski mehanizmi“ urađen je pod rukovodstvom dr Biljane Božić na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu. Diplomirala je 15.06.2011. godine sa završnom ocenom 10 na diplomskom ispitu.

Školske 2012/13. godine upisala je prvu godinu doktorskih studija na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, studijski program Neuronauke (Eksperimentalna neurobiologija - od gena do ponašanja). Od 01.03.2012. zaposlena je u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ - Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, na projektu pod nazivom „Molekularni mehanizmi patofizioloških promena u ćelijama centralnog nervnog sistema i perifernog tkiva kod sisara“ (OI 173044), finansiranom od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. U toku svog istraživačkog rada aktivno se bavi istraživanjima iz oblasti neurobiologije sa fokusom na tretmane steroidnim hormonima u stanju nametnute moždane ishemije.

Autor je 10 radova u vodećim međunarodnim časopisima, kao i brojnih međunarodnih i domaćih kongresnih saopštenja štampanih u celini i izvodu.



Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Ивана Гушевац Стојановић

број индекса Б3039/2012

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Регионално специфичан неуропротективан ефекат прогестерона у моделу хипоперфузије мозга пацова

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

Потпис докторанда

У Београду, \_\_\_\_\_

Ивана Гушевац Стојановић

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ивана Гушевац Стојановић

Број индекса Б3039/2012

Студијски програм Биологија

Наслов рада Регионално специфичан неуропротективан ефекат прогестерона у моделу хиперфузије мозга пацова

Ментор др Дуња Дракулић и проф. др Надежда Недељковић

Потписани/а \_\_\_\_\_

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, \_\_\_\_\_

Ивана Гушевац Стојановић

### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

Регионално специфичан неуропротективан ефекат прогестерона у моделу хипоперфузије мозга пацова

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

*Ивана Тушевац Стојановић*

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.