

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET



Miloš A. Opačić

**Uloga i metabolizam bakra u hipokampusnoj  
sklerozi asociranoj sa epilepsijom  
temporalnog režnja kod čoveka**

doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY



Miloš A. Opačić

**The role and metabolism of copper in human  
hippocampal sclerosis associated with  
temporal lobe epilepsy**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022

## MENTORI

---

**dr Danijela Savić, viši naučni saradnik**

Univerzitet u Beogradu – Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“  
– Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

**dr Danijela Laketa, vanredni profesor**

Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

## ČLANOVI KOMISIJE

---

**dr Sanja Dacić, docent**

Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

**dr Ivan Spasojević, naučni savetnik**

Univerzitet u Beogradu – Institut za multidisciplinarna istraživanja

**dr Aleksandar Ristić, docent**

Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet,  
Univerzitetski klinički centar Srbije – Klinika za neurologiju

DATUM ODBRANE

---



*Ova doktorska disertacija je izrađena u Odseku za nauku o živim sistemima Instituta za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu u okviru Grupe za bioneorgansku hemiju i redoks procese pod rukovodstvom dr Ivana Spasojevića, naučnog savetnika. Eksperimentalni deo ove disertacije je realizovan u okviru plana i programa i ugovora o realizaciji i finansiranju naučnoistraživačkog rada Instituta za multidisciplinarna istraživanja (451-03-9/2021-14/200053) i Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ (451-03-9/2021-14/200007), kao i u okviru projekta bilateralne saradnje sa Republikom Slovenijom (06-00-118/2018-09/22), finansiranih od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.*

## **Želim da se zahvalim,**

Učesnicima istraživanja, prvenstveno pacijentima i njihovim porodicama i starateljima, na hrabrosti, doprinosu razvoju nauke i medicine i unapređenju kvaliteta života ljudi koji žive sa epilepsijom.

Svojoj mentorki, **dr Danijeli Savić**, na pažnji i divnoj saradnji, na trudu, strpljenju, temeljnom podučavanju, za kritike i pohvale koje su značajno povećale kvalitet ove doktorske disertacije i učinile me boljim naučnikom. Hvala za sve naučne i nenaučne razgovore koji su ovaj put učinili prijatnijim. Svojoj mentorki, **prof. dr Danijeli Laketi**, na pažljivom čitanju, na trudu i izdvojenom vremenu, praktičnim i korisnim idejama, savetima i stručnim sugestijama.

Posebno se zahvaljujem **dr Ivanu Spasojeviću** na razumevanju, neograničenom prostoru za naučni i profesionalni razvoj, na datoj slobodi i prijateljskoj podršci, i **dr Jeleni Bogdanović-Pristov** na entuzijazmu, pomoći i svakodnevnom optimizmu, a još više na trudu i nesebično pruženom znanju, i što su me prihvatili kao deo tima. Rukovodiocu projekta, **dr Sonji Veljović-Jovanović**, na ukazanom poverenju i omogućenom naučno-istraživačkom radu. **Dr Jeleni Brkljačić**, na prijateljskim razgovorima, strpljenju i nesebičnom podučavanju. **Prof. dr Vladimiru Baščareviću** se zahvaljujem na izvrsnoj i prijateljskoj saradnji i pružanju šire slike o značaju naučnog rada kojim smo se bavili. **Doc. dr Sanji Dacić** i **doc. dr Aleksandru Ristiću**, na oštrom oku, pažljivom čitanju, efikasnosti, sugestijama i podršci. **Dr Savu Raičeviću**, na svim profesionalnim savetima. Hvala **dr Maji Zorović**, **prof. dr Marku Živinu** i **dr Vidu Simonu Šelihu** na prijatnoj i produktivnoj saradnji u Ljubljani i korisnim sugestijama.

Naročitu zahvalnost dugujem kolegama iz Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, **dr Ivani Bjelobabi**, **dr Ireni Lavrnji**, **Katarini Milošević**, **prof. dr Gordani Matić**, **dr Ani Đorđević**, **dr Danijeli Vojnović-Milutinović**, **dr Sanji Kovačević**, **Ljupki Gligorovskoj**, **prof. dr Mihajlu Spasiću**, **dr Aleksandri Nikolić-Kokić**, **Nikoli Tataloviću**, **dr Vladimiru Ajdžanoviću**, **dr Marku Mileru**, **dr Ani Vuleti** i **dr Sanji Budečević**, zbog svesrdne pomoći i omogućavanju izvođenja dela eksperimentalnih postupaka.

**Prof. dr Nadeždi Nedeljković**, na dobroj organizaciji doktorskih studija eksperimentalne neurobiologije, pravovremenim obaveštenjima i dostupnosti i pomoći u svakom trenutku.

Iskreno se zahvaljujem **prof. dr Ivani Dragičević** na ukazanom poverenju, što me je videla i pružila šansu da uđem u svet nauke u kom danas živim i uživam.

Dragim kolegama iz Instituta za multidisciplinarna istraživanja, kao i Grupi za **bioneorgansku hemiju i redoks procese**, hvala na podršci, ustupcima, strpljenju, kolačima, tortama i svim pozajmljenim pipetama. Dragim kolegama koji su mi pružili prijateljstvo tokom ovih godina i učinili da sve bude mnogo bolje i zabavnije: **Mileni**, **Snežani**, **Jeleni KJ**, **Ani**, **Bojani Ž**, **Sonji**, **Jeleni DL**, **Bojani BC**, **Saški**, i ljudima koje volim i koji mi pružaju prijateljstvo i ljubav: **Nataši**, **Dušanu**, **Miodragu**, **Nemanji**, **Gordani**, **Marjanu**, **Ani**, **Radici**, **Marini**, **Nikoli**, **Bogdanu**, **Dušici**, **Aleksandru**, **Nini**, **Dragani** i **Sanji**, malo je reći da sam zahvalan.

Naposletku, za sve uspehe i za ono što jesam, za ljubav i brigu, beskrajno sam zahvalan svojim roditeljima **Verici** i **Aleksi** i sestri **Aleksandri**. Volim vas i hvala vam.

**Ovaj rad posvećujem Stefanu i Emiliji.**

Miloš Opačić

februar 2022.

# Uloga i metabolizam bakra u hipokampusnoj sklerozi asociranoj sa epilepsijom temporalnog režnja kod čoveka

## Sažetak

Epilepsija mezijalno-temporalnog režnja (mTLE) asocirana sa hipokampusnom sklerozom (HS) je najčešći epileptični sindrom. HS se ogleda u značajnom gubitku neurona hipokampusa. Budući da je HS praćena smanjenim nivoom bakra (Cu), cilj ove disertacije je bio otkriti ulogu ovih promena u patogenezi HS kroz ispitivanje veze narušene koncentracije Cu i gubitka neurona, kao i glavnih puteva unosa, transporta i iskorišćavanja Cu u mitohondrijama u kontekstu energetskeg metabolizma. Ispitivanja su izvršena na humanim uzorcima hipokampusa, a primenjene su analitičke i metode bio-oslikavanja: laserska ablacija uz induktivno spregnutu plazmu i masenu spektrometriju za oslikavanje metala, *in situ* hibridizacija za ispitivanje ekspresije iRNK, histohemijske metode za praćenje neurodegeneracije i ispitivanje tkivne ekspresije ciljnih proteina, kao i metoda imunoblota za ispitivanje zastupljenosti proteina od interesa u tkivnim lizatima.

Rezultati izneseni u ovoj disertaciji pokazali su da kod humanih sklerotičnih hipokampusa postoje patološke promene u koncentraciji Cu koje koreliraju sa propadanjem neurona. Nivo membranskog transportera za Cu, SLC31A1 je bio povećan u izraženoj sklerozi a smanjen u ograničenoj i lokalizovanoj sklerozi, u odnosu na kontrolno tkivo. Smanjeni nivoi iRNK šaperona za transport i umetanje Cu u aktivna mesta enzimskog kompleksa citohom c oksidaze (COX) kao i smanjena aktivnost COX u odnosu na kontrolne uzorke ukazuju na promene u mitohondrijskom transportu Cu. Ustanovljena je pozitivna korelacija između distribucije Cu, brojnosti piramidalnih neurona i aktivnosti COX u sklerotičnim zonama. Rezultati ove disertacije čine korak napred u razumevanju patologije mTLE-HS i predstavljaju osnov za unapređenje tretmana bolesti i istraživanja na polju novih terapeutika čija bi glavna meta bila narušena homeostaza Cu.

**Ključne reči:** Hipokampusna skleroza/HS, epilepsija mezijalno-temporalnog režnja/mTLE, metabolizam metala, bakar/Cu, transporteri bakra, SLC31A1/CTR1, citohrom c oksidaza/COX, LA-ICP-MS, šaperon bakra COX11, šaperon bakra COX17

**Naučna oblast:** Biološke nauke

**Uža naučna oblast:** Eksperimentalna neurobiologija

**UDK broj:**

# **The role and metabolism of copper in human hippocampal sclerosis associated with temporal lobe epilepsy**

## **Abstract**

Mesial temporal lobe epilepsy (mTLE) associated with hippocampal sclerosis (HS) is the single most prevalent epilepsy syndrome. HS is characterized by substantial loss of hippocampal neurons. Regarding diminished copper (Cu) levels detected in HS, the aim of this dissertation was to discover the role of these changes HS pathology by examining the relationship between altered Cu level and neuronal loss, through the main roads of cellular Cu intake and transport and its utilization in mitochondria, in the terms of energy metabolism. Research has been conducted on human hippocampal samples, applying a battery of techniques: laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry for elemental imaging, *in situ* hybridization for mRNA expression analysis, histochemical methods for investigation of protein expression in tissue and neurodegeneration evaluation, and immunoblotting for examination of specific proteins in tissue homogenate.

Results presented herein implied the presence of pathological changes in Cu concentrations in correlation with neuronal deterioration in the human sclerotic hippocampi. The level of membrane Cu importer SLC31A1 was elevated in widespread sclerosis but decreased in less extensive and localized one, compared to controls. Decreased levels of cytochrome c oxidase (COX) copper chaperones' mRNA and reduced COX activity in comparison to controls revealed altered mitochondrial Cu transport. Positive correlation was established for Cu distribution, neuronal count and COX activity in sclerotic regions of the hippocampi. Findings in this dissertation are a step forward towards better understanding mTLE-HS pathology and represent a starting point for the improvement of the disease treatment and development of novel noninvasive therapy approaches which would tackle the impaired copper homeostasis.

**Key words:** Hippocampal sclerosis/HS, mesial temporal lobe epilepsy/mTLE, metals metabolism, copper/Cu, copper transporters, SLC31A1/CTR1, cytochrome c oxidase/COX, LA-ICP-MS, copper chaperone COX11, copper chaperone COX17

**Scientific field:** Biological science

**Scientific subfield:** Experimental neurobiology

**UDC number:**

# Skraćenice

---

A	adenin
AA	akrilamid
AB	Alchajmerova bolest
AED	lek protiv epilepsije, engl. <i>antiepileptic drug</i>
AJ	arbitrarne jedinice
ALV	alveus, lat. <i>alveus</i>
APS	amonijum-persulfat
AR	autoradiografija
ARIS	system za brzo unošenje aerosola, engl. <i>aerosol rapid introduction system</i>
ATOX1	antioksidativni šaperon bakra 1
ATP	adenozin trifosfat, engl. <i>adenosine triphosphate</i>
ATP7A	$\alpha$ ATPaza za transport bakra
ATP7B	$\beta$ ATPaza za transport bakra
bisAA	bisakrilamid
BPB	bromfenol plavo, engl. <i>bromophenol blue</i>
BSA	albumin iz seruma govečeta, engl. <i>bovine serum albumin</i>
C	citozin
CA	Amonov rog, engl. <i>cornu Ammonis</i>
CAT	katalaza, engl. <i>catalase</i>
CBB	Kumasi plavo, engl. <i>Coomassie brilliant blue</i>
CCD	engl. <i>charge-coupled device</i>
CCS	šaperon bakra za superoksid dismutazu, engl. <i>copper chaperone for superoxide dismutase</i>
CK1 $\gamma$	kazein kinaza 1 $\gamma$ , engl. <i>casein kinase 1<math>\gamma</math></i>
CLSM	laserska skenirajuća konfokalna mikroskopija, engl. <i>confocal laser scanning microscopy</i>
CNS	centralni nervni sistem
COA6	faktor sklapanja citohrom c oksidaze 6
COX	citohrom c oksidaza
COX11	citohrom c oksidaza šaperon bakra COX11
COX17	citohrom c oksidaza šaperon bakra COX17
COX19	faktor sklapanja citohrom c oksidaze COX19
COX20	faktor sklapanja citohrom c oksidaze COX20
COX411	citohrom c oksidaza subjedinica 411
COX5A	citohrom c oksidaza subjedinica 5A
COX5B	citohrom c oksidaza subjedinica 5B
COX6A1	citohrom c oksidaza subjedinica 6A1
COX6B1	citohrom c oksidaza subjedinica 6B1
COX6C	citohrom c oksidaza subjedinica 6C
COX7A2	citohrom c oksidaza subjedinica 7A2
COX7B	citohrom c oksidaza subjedinica 7B
COX7C	citohrom c oksidaza subjedinica 7C
COX8A	citohrom c oksidaza subjedinica 8A
CT	komputerizovana tomografija, engl. <i>computed tomography</i>
CTR1	transporter bakra, engl. <i>copper transporter 1</i>
CuL	nepoznati ligand za transport bakra, engl. <i>Cu ligand</i>
CV	krezil ljubičasto, engl. <i>cresyl violet</i>
Cys	cistein
cyt c	citohrom c, engl. <i>cytochrome c</i>
DAB	3,3'-diamino-benzidin
DEPC	dietil-pirokarbonat, engl. <i>diethyl pyrocarbonate</i>
DMSO	dimetil-sulfoksid
DMT1	divalentni metalni transporter 1
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
dNMP	dezoksinukleozid monofosfat, engl. <i>deoxynucleoside monophosphate</i>
DNTT	DNK nukleotidilegtransferaza
DPX	rastvor smola za čuvanje, engl. <i>dibutylphthalate polystyrene xylene</i>
DR	Denhartov rastvor
DTT	ditiotritol
EDS	spektroskopija disperzije energije, engl. <i>energy-dispersive spectroscopy</i>
EDTA	etilendiamintetrakisirćetna kiselina, engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EEG	elektroencefalografija
EELS	spektroskopija gubitka energije elektrona, engl. <i>electron-energy loss spectroscopy</i>
EM	elektronska mikroskopija
engl.	engleski
EPRI	oslikavanje elektron paramagnetnom rezonancijom, engl. <i>electron paramagnetic resonance imaging</i>
EtOH	etanol

---



---

fiziol.	fiziologija
FTIR	infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom, engl. <i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>
G	guanin
GABA	$\gamma$ -aminobuterna kiselina, engl. <i><math>\gamma</math>-aminobutyric acid</i>
GAPDH	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza, engl. <i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GD	zubata vijuga, lat. <i>gyrus dentatus</i>
grč.	grčki
GS	glutamin sintetaza
GSH	glutation
His	histidin
HRP	peroksidaza iz rena, engl. <i>horseradish peroxidase</i>
HS	hipokampusna skleroza
IB	imunoblot
ICP	induktivno spregnuta plazma, engl. <i>inductively coupled plasma</i>
IgG	immunoglobulin G
IHH	imunohistohemija
ILAE	Međunarodna liga za borbu protiv epilepsije, engl. <i>International League Against Epilepsy</i>
IMP	intermembranski prostor
iRNK	informaciona ribonukleinska kiselina
ISH	<i>in situ</i> hibridizacija
KPI	koktel proteaznih inhibitora
LA	laserska ablacija
lat.	latinski
MALDI	laserska desorpcija/ionizacija potpomognuta matricom, engl. <i>matrix assisted laser desorption/ionisation</i>
MB	Menkesova bolest
MBO	multi-bakarne oksidaze
MeOH	metanol
med.	medicina
Met	metionin
MRI	oslikavanje magnetnom rezonancijom, engl. <i>magnetic resonance imaging</i>
MS	masena spektrometrija
MSI	oslikavanje masenom spektrometrijom, engl. <i>mass spectrometry imaging</i>
MT	metalotionein
MT-CO1	mitohondrijski kodirana citohrom c oksidaza subjedinica I
MT-CO2	mitohondrijski kodirana citohrom c oksidaza subjedinica II
MT-CO3	mitohondrijski kodirana citohrom c oksidaza subjedinica III
mTLE	epilepsija mezijalnog dela temporalnog režnja, engl. <i>mesial temporal lobe epilepsy</i>
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid (redukovani oblik)
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (redukovani oblik), engl. <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NCBI	Nacionalni centar za biotehnoške informacije
NDS	normalni serum magarca, engl. <i>normal donkey serum</i>
NDUFA4	engl. <i>NDUFA4 mitochondrial complex associated</i>
NeuN	neuronski jedarni protein, engl. <i>neuronal nuclear protein</i>
NFP	natrijum-fosfatni pufer
NMDA	N-metil-D-aspartat
OES	optička emisiona spektrometrija, engl. <i>optical emission spectrometry</i>
PAGE	elektroforeza na poliakrilamidnom gelu, engl. <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PB	Parkinsonova bolest
PBS	fosfatni fiziološki rastvor, engl. <i>phosphate-buffered saline</i>
PET	pozitron emisiona tomografija
PFA	paraformaldehid
PGN	potpuni gubitak neurona
PIXE	emisija rendgenskih zraka indukovana česticama, engl. <i>particle-induced X-ray emission</i>
PoliA	poliadenilna kiselina
POP	2,5-difeniloksazol
POPOP	1,4-Bis-2-(5-feniloksazolil)-benzen
PUZ	pufer za obradu uzorka
PVDF	poliviniliden-fluorid
RBFOX3	engl. <i>RNA binding fox-1 homolog 3</i>
RIPA	radioimunoprecipitacioni esej, engl. <i>radioimmunoprecipitation assay</i>
RS	Ramanova spektroskopija
SAD	Sjedinjene američke države
SCO1	sinteza citohrom c oksidaze 1
SCO2	sinteza citohrom c oksidaze 2
SDS	natrijum-dodecil-sulfat, engl. <i>sodium dodecylsulphate</i>
SEM	standardna greška, engl. <i>standard error of the mean</i>
SG	granularni sloj, lat. <i>stratum granulosum</i>
SIMS	masena spektrometrija sa sekundarnim jonima, engl. <i>secondary ion mass spectrometry</i>

---

---

SL	lakunarni sloj, lat. <i>stratum lacunosum</i>
SLC	membranski transportni protein, engl. <i>solute carrier</i>
SLu	svetli sloj, lat. <i>stratum lucidum</i>
SM	molekularni sloj, lat. <i>stratum moleculare</i>
SO	orijens sloj, lat. <i>stratum oriens</i>
SOD1	superoksid dismutaza 1
SOD2	superoksid dismutaza 2
SP	piramidalni sloj, lat. <i>stratum pyramidale</i>
SR	radijalni sloj, lat. <i>stratum radiatum</i>
SRL	radijalni i lakunarni sloj, lat. <i>stratum radiatum, lacunosum</i>
SRM	super rezoluciona mikroskopija
SSC	slani natrijum-citratni pufer, engl. <i>saline-sodium citrate buffer</i>
SSDNA	DNK iz sperme lososa, engl. <i>salmon sperm deoxyribonucleic acid</i>
STXM	skenerajuća transmisiona mikroskopija rendgenskim zracima, engl. <i>scanning transmission X-ray microscopy</i>
SUB	subikulum, lat. <i>subiculum</i>
SXRF	sinhrotronska fluorescentna mikroskopija rendgenskim zracima, engl. <i>synchrotron X-ray fluorescence microscopy</i>
SXT	tomografija slabim rendgenskim zracima, engl. <i>soft X-ray tomography</i>
SZO	Svetska zdravstvena organizacija
T	timin
TBP	protein koji se vezuje za TATA sekvencu, engl. <i>TATA-binding protein</i>
TEMED	tetrametil-etilen-diamin
TENS	Tris-EDTA-NaCl-SDS pufer
TIF	format označenih slika, engl. <i>tagged-image format</i>
titr.	titracija
TLE	epilepsija temporalnog režnja, engl. <i>temporal lobe epilepsy</i>
TM	transmembranski
TOF	analizator sa vremenom preleta, engl. <i>time-of-flight</i>
TOFMS	masena spektrometrija sa razdvajanjem na osnovu vremena preleta, engl. <i>time-of-flight mass spectrometry</i>
TRA	analiza vremenskim razdvajanjem, engl. <i>transient resolved analysis</i>
Tris	tris(hidroksimetil)-aminometan
UVC	ultraljubičasto c, engl. <i>ultraviolet c</i>
VB	Vilsonova bolest
XANES	apsorpciona rendgenska spektroskopija za detalje strukture, engl. <i>X-ray absorption near edge spectroscopy</i>
XAS	apsorpciona spektroskopija rendgenskim zracima, engl. <i>X-ray absorption spectroscopy</i>
ZIP	engl. <i>Zrt/IRT-like protein</i>

---

# Sadržaj

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. EPILEPSIJE I EPILEPTIČNI NAPADI .....	2
1.1.1. <i>Epilepsija temporalnog režnja</i> .....	3
1.1.2. <i>Dijagnoza i lečenje mTLE-HS</i> .....	5
1.2. HIPOKAMPUSNA SKLEROZA U EPILEPSIJI TEMPORALNOG REŽNJA .....	6
1.2.1. <i>Hipokampusna formacija</i> .....	6
1.2.2. <i>Podtipovi hipokampusne skleroze</i> .....	10
1.3. MOZAKI I METALI .....	13
1.3.1. <i>Gvožđe</i> .....	14
1.3.2. <i>Cink</i> .....	14
1.3.3. <i>Mangan</i> .....	15
1.3.4. <i>Bakar</i> .....	16
1.3.4.1. Homeostaza u citoplazmi.....	16
1.3.4.2. Homeostaza u mitohondrijama.....	19
1.3.4.3. Kompleks citohrom c oksidaza– metaloenzim bakra .....	21
1.3.4.4. Poremećena homeostaza bakra u nervnom sistemu .....	23
1.4. BIO-OSLIKAVANJE METALA U NERVNOM TKIVU .....	25
<b>2. CILJEVI.....</b>	<b>30</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE .....</b>	<b>32</b>
3.1. SUPSTANCE, RASTVORI, SMESE I PUFERI .....	33
3.2. ANTITELA .....	37
3.3. ISPITANICI I PRIKUPLJANJE UZORAKA .....	38
3.4. PRIPREMA SMRZNUTIH I PARAFINSKIH PRESEKA .....	40
3.5. HISTOHEMIJSKE METODE.....	40
3.5.1. <i>Nislovo bojenje</i> .....	40
3.5.2. <i>Enzimsko-histohemijski esej za citohrom c oksidazu</i> .....	40
3.5.3. <i>Imunohistohemijsko obeležavanje</i> .....	41
3.6. BIO-OSLIKAVANJE ELEMENATA LASERSKOM ABLACIJOM UZ INDUKTIVNO SPREGNUTU PLAZMU I MASENU SPEKTROMETRIJU .....	42
3.6.1. <i>Laserska ablacija</i> .....	42
3.6.2. <i>Induktivno spregnuta plazma sa masenom spektrometrijom</i> .....	43
3.6.3. <i>Sastavljanje kvantitativnih dvodimezionalnih mapa</i> .....	43
3.7. <i>IN SITU</i> HIBRIDIZACIJA .....	44
3.7.1. <i>Radioaktivno obeležavanje oligonukleotida</i> .....	44
3.7.2. <i>Hibridizacija</i> .....	45
3.7.3. <i>Autoradiografija</i> .....	45
3.8. ANALIZA SLIKA .....	46
3.8.1. <i>Denzitometrijska analiza</i> .....	47
3.9. PRIPREMA LIZATA TKIVA .....	47
3.10. ISPITIVANJE PROTEINSKOG SADRŽAJA LIZATA TKIVA METODOM IMUNOBLOTA .....	47
3.10.1. <i>Elektroforetsko razdvajanje proteina na polikarilamidnom gelu</i> .....	47
3.10.2. <i>Transfer proteina na noseću membranu</i> .....	48
3.10.3. <i>Detekcija i vizualizacija proteina</i> .....	48
3.11. DENZITOMETRIJSKA ANALIZA PROTEINSKIH TRAKA .....	49
3.12. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA .....	49
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>50</b>

4.1. KONCENTRACIJE METALA U SKLEROTIČNOM HIPOKAMPUSU PACIJENATA SA TLE.....	51
4.1.1. <i>Histološko ispitivanje sklerotičnih hipokampusa</i> .....	51
4.1.2. <i>Kvantitativno prostorno određivanje raspodele metala</i> .....	53
4.1.3. <i>Uporedne i korelacione analize gustine neurona i količine metala</i> .....	55
4.2. METABOLIZAM BAKRA U SKLEROTIČNOM HIPOKAMPUSU.....	57
4.2.1. <i>Membranski i unutarćelijski transport</i> .....	57
4.2.1.1. <i>Zastupljenost SLC31A1 transportera u izolatu tkiva sklerotičnog hipokampusa</i> .....	58
4.2.1.2. <i>Tkivna distribucija SLC31A1 transportera u sklerotičnom hipokampusu</i> .....	59
4.2.1.3. <i>Nivo ATOX1 šaperona</i> .....	61
4.2.2. <i>Mitohondrijski transport</i> .....	62
4.2.2.1. <i>Regionalna raspodela COX11 i COX17 iRNK</i> .....	62
4.2.2.2. <i>Kvantitativna analiza regionalne raspodele COX11 i COX17 iRNK</i> .....	63
4.3. EFEKAT DEFICITA BAKRA NA ENERGETSKI METABOLIZAM U SKLEROTIČNOM HIPOKAMPUSU .....	64
4.3.1. <i>Uporedno ispitivanje hipokampusne skleroze, regionalne raspodele koncentracija bakra i aktivnosti citohrom c oksidaze</i> .....	64
4.3.2. <i>Korelacione analize gustine neurona, količine bakra i intenziteta aktivnosti COX</i> .....	70
<b>5. DISKUSIJA</b> .....	<b>72</b>
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>80</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>83</b>
<b>8. PRILOZI</b> .....	<b>96</b>

# I. Poglavlje

---

## UVOD

## 1.1. Epilepsije i epileptični napadi

Epilepsija je poremećaj CNS čije obeležje predstavljaju ponovljeni epileptični napadi koji nisu izazvani nekom neurološkom ili akutnom sistemskom povredom. U situacijama kada nadražljivost jednog ili više područja mozga pređe određeni prag postoji rizik od razvoja epileptičnog napada (Bromfield i sar., 2006; Balestrini i sar., 2021). Epilepsije su jedan od najčešćih neuroloških poremećaja od kojeg pati približno 50 miliona ljudi širom sveta, svih uzrasta, među kojima skoro 80% živi u nisko ili srednje razvijenim zemljama, prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (SZO) (World Health Organization, 2019). Svake godine se u svetu dijagnostifikuje oko pet miliona novih slučajeva epilepsije, sa incidencijom od 49/100.000 ljudi u visoko razvijenim zemljama i 139/100 000 ljudi u srednje i nisko razvijenim zemljama (World Health Organization, 2019). U Srbiji nije sprovedeno epidemiološko ispitivanje epilepsije, pa prema nekim procenama prevalencija iznosi 0,5 – 1% sa incidencijom od oko 70/100.000 stanovnika (Baščarević, 2014).

Prema smernicama Međunarodne lige za borbu protiv epilepsije (ILAE)<sup>1</sup> epilepsija je danas jasno definisana sa kliničkog aspekta kao bolest mozga koja se karakteriše barem jednim od sledećih uslova: 1) najmanje dva neprovocirana (ili refleksna) epileptična napada sa razmakom većim od 24 sata; 2) jedan neprovocirani (ili refleksni) napad i verovatnoća budućih napada slična opštem riziku za ponavljanje napada nakon dva spontana napada (najmanje 60%) tokom narednih 10 godina i 3) utvrđivanjem nekog od epileptičnih sindroma (Fisher i sar., 2014). Rizik ponavljanja napada je diskutabilan. Nakon jednog neprovociranog napada, rizik za naredni iznosi 40 – 52% u naredne četiri godine (Berg i Shinnar, 1991) dok je nakon dva neprovocirana i nefebrilna napada taj rizik 60 – 90% (Hauser i sar., 1998). Ukoliko usled postojanja određenih stanja kao što su tumori, lezije, moždani udar ili elektroencefalografija (EEG) koja ukazuje na epileptogenu aktivnost, lekar ustanovi da nakon jednog neprovociranog napada postoji visoka verovatnoća za sledeći, ta osoba će dobiti dijagnozu epilepsije (Fisher i sar., 2014). Na kraju, dijagnozu epilepsije će dobiti i osobe kod kojih se utvrdi postojanje nekog od epileptičnih sindroma, tj. posebnih entiteta sa jasnom kliničkom slikom koji se pouzdano utvrđuju grupom kliničkih i elektrokliničkih karakteristika kao što su uzrast na početku bolesti, karakterističan EEG nalaz, neurokognitivni zastoj i druge pridružene faktore (Cascino i sar., 2021). Neki od ovih sindroma su Vest sindrom, Dravet sindrom, juvenilna mioklonična epilepsija, fotosenzitivna epilepsija potiljačnog reznja, i drugi (Epilepsy syndromes, 2020).

Veoma je bitno razlikovati epilepsiju od epileptičnog napada. Procenjeno je da do 10% svetske populacije doživi jedan epileptični napad u nekom periodu života (World Health Organization, 2019). ILAE definiše epileptični napad kao prolaznu pojavu kliničkih manifestacija, uzrokovanu nefiziološkom, prekomernom i visoko sinhronizovanom aktivnošću veće populacije neurona (Fisher i sar., 2005). Ovi napadi se dodatno razvrstavaju na osnovu načina i mesta odpočinjanja u tri opšta tipa: fokalni (napad odpočinje u specifičnom žarištu (fokusu) u delu mozga), generalizovani (bilateralan početak napada, bez određenog žarišta) i napadi nepoznatog početka (Fisher i sar., 2017b).

Otkrivanje uzročnika epilepsije igra centralnu ulogu u uspostavljanju dijagnoze, proceni rizika ponavljanja napada, tretmanu bolesnika i razvrstavanju epilepsija (Balestrini i sar., 2021). Interesantno je da je uzročnik nepoznat u oko pola ukupnih slučajeva epilepsije u svetu

---

<sup>1</sup> Međunarodna liga za borbu protiv epilepsije (engl. *The International League Against Epilepsy*, ILAE) je jedan od vodećih globalnih autoriteta u borbi protiv epilepsije i okuplja zdravstvene i naučne radnike čiji je cilj stvaranje društva u kom ni jedan ljudski život neće biti ograničen epilepsijom. Osnovana je 1909. godine i strukturno je organizovana u šest svetskih regiona i broji preko 150 nacionalnih udruženja u državama i drugim teritorijama, uključujući i Republiku Srbiju. <https://www.ilae.org/about-ilae>

(World Health Organization, 2019). Kod druge polovine etiologija se može podeliti u sledećih šest grupa, koje se nekada mogu preklapati, a međusobno se ne isključuju (Balestrini i sar., 2021; Scheffer i sar., 2017):

- strukturna (npr. hipokampusna skleroza, tumori, malformacije, vaskularne ozlede, traumatske povrede mozga, neurodegeneracija);
- genetička (npr. mono- ili poligenetičko nasleđivanje, mutacije u somatskim ćelijama ili gametima);
- infektivna (npr. uzrokovana bakterijama, virusima, gljivicama ili parazitima);
- metabolička (npr. urođeni metabolički poremećaji, poremećaj u transportu glukoze, mitohondrijske patologije, napadi uslovljeni piridoksinom);
- imunološka (Rasmusenov encefalitis, autoantitela za različite proteine);
- neurodegenerativna (Alchajmerova bolest, Daunov sindrom i dr.)

Imajući prethodno navedeno u vidu, ILAE je predložila okvir za razvrstavanje epilepsija, ažuriran 2017. godine. Kreiran je tako da se pri postavljanju dijagnoze epilepsije razvrstavaju na tri nivoa, u skladu sa raspoloživim informacijama i dostupnim kliničkim resursima (Scheffer i sar., 2017):

- Prvi nivo – tip epileptičnog napada (fokalni, generalizovani i nepoznati (Fisher i sar., 2017b)). Ovaj nivo može biti jedini nivo dijagnoze ukoliko nije moguće sprovesti dodatna ispitivanja (npr. EEG<sup>2</sup> ili MRI<sup>3</sup>).
- Drugi nivo – tip epilepsije (fokalna, generalizovana, kombinovana i nepoznata) podrazumeva da je pacijentu utvrđena epilepsija prema smernicama ILAE iz 2014. godine (Fisher i sar., 2014). Na ovom nivou, epilepsija može uključiti različite tipove napada i uvodi se nova kategorija - kombinovana fokalna i generalizovana epilepsija. Razvrstavanje se bazira uglavnom na EEG nalazima i kliničkoj slici.
- Treći nivo – utvrđivanje epileptičnog sindroma – podrazumeva skup osobenosti koje se zajedno javljaju kao što su određeni tipovi napada, karakteristični video-EEG i MRI nalazi, uzrast pri prvoj pojavi napada i jasni pridruženi poremećaji (npr. intelektualne i psihijatrijske smetnje). Formalna klasifikacija epileptičnih sindroma za sada nije data iako ih je dosta opisanih (Engel, 2006; Epilepsy syndromes, 2020).

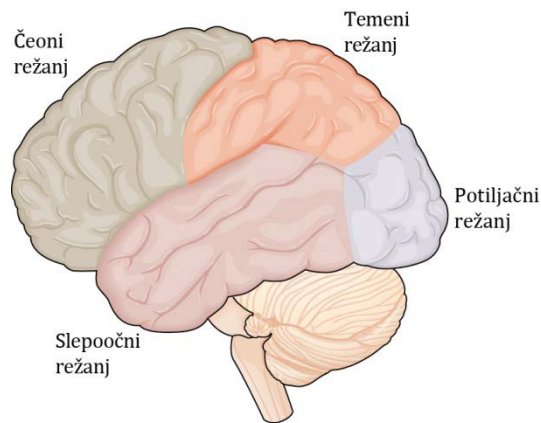
### 1.1.1. Epilepsija temporalnog režnja

Temporalni (*i.e.* slepoočni) režanj je jedan od šest funkcionalno različitih, ali povezanih moždanih režnjeva (slika 1.1) uz frontalni (*i.e.* čeonni), parijetalni (*i.e.* temeni), okcipitalni (*i.e.* potiljačni), insulu (*i.e.* ostrvo) i limbički režanj (Ilić i sar., 2010; Waxman, 2020). Temporalni režanj je odgovoran za obradu zvučnih nadražaja, prepoznavanje objekata i lica, a preko svojih dubljih struktura – hipokampusu i bademastih jedara – za učenje, pamćenje i emocije (Kandel i sar., 2021).

---

<sup>2</sup> Elektroencefalografija, dijagnostička metoda snimanja električne aktivnosti mozga, u neurologiji.

<sup>3</sup> Oslikavanje magnetnom rezonancijom (engl. *magnetic resonance imaging, MRI*), dijagnostička metoda u med.



**Slika 1.1. Lateralni prikaz mozga čoveka.** Podela hemisfere prednjeg mozga na reznjeve. Vidljiva su četiri klasična reznja dok su ispod njih smešteni atipični limbički režanj i insula. Preuzeto i prilagođeno iz Kandel i sar., 2021.

Temporalni režanj je oblast sa najvećim epileptogenim potencijalom (Tatum, 2012). Sa tim u vezi, vrsta epileptičnog sindroma koji se najčešće sreće kod odraslih osoba (~ 66%) jeste epilepsija temporalnog reznja (engl. *temporal lobe epilepsy*, TLE) (Hauser i sar., 1996; Wiebe, 2000; Tatum, 2012; Cendes i sar., 2014). TLE se odlikuje ponavljajućim fokalnim epileptičnim napadima sa mestom početka u zoni mezijalnog dela temporalnog reznja (mTLE), najčešće u hipokampusu i bademastim jedrima, a moguće i u susednim strukturama, kao što su entorinalna, peririnalna i parahipokampusna kora (Noulhiane i sar., 2006; Baulac, 2015). TLE je dobro opisan, simptomatski, sekundarni epileptični poremećaj koji je povezan sa lokalnim, strukturnim promenama, odnosno lezijama nervnog tkiva (Engel, 2001). Anatomski i fiziološki gledano, ove promene mogu biti benigni tumori (disembrioplastični neuroepiteliom), angiomi, gliomi, poremećeni razvoj moždane kore ili gliozna kao posledica meningitisa ili encefalitisa (Baulac, 2015). Čest histopatološki fenomen koji se susreće kod pacijenata sa mTLE, jeste hipokampusna skleroza (HS), pa se takvi slučajevi klasifikuju kao mTLE spregnuta sa HS (mTLE-HS) (Blümcke i sar., 2013; Thom, 2014).

Prva linija lečenja svih epilepsija započinje primenom antiepileptika (eng. *antiepileptic drug*, AED<sup>4</sup>) bilo pojedinačno ili u kombinaciji od nekoliko, što ima za cilj sprečavanje napada uz maksimalno izbegavanje toksičnosti lekova (Perucca i sar., 2018). Približno dve trećine pacijenata će na ovaj način, samo farmakološkom terapijom, moći da živi bez napada (Brodie i sar., 2012). Najlošija prognoza ovakvog tretmana je kod pacijenata sa mTLE-HS (Tatum, 2012). Primećeno je da se kod njih samo 11% uspešno leči standardnom terapijom, a svega 3% kada je pridružena i druga patološka promena pored HS (Semah i sar., 1998; Engel, 2001). Dodatno, pojedini pacijenti koji su prvobitno uspešno reagovali na farmakološku terapiju mogu nakon nekoliko godina razviti otpornost (*i.e.* farmakorezistenciju) i neadekvatnu reakciju na lekove (Nayak i Bandyopadhyay, 2021).

Ne može se jednoznačno utvrditi da li je HS uzročnik ili posledica epileptičnih napada (Thom, 2009). Postoji nekoliko hipoteza koje mogu objasniti njihovu vezu a uključuju:

- genetički poremećaj uzrokovan mutacijama (Meisler i sar., 2010);
- razvojni poremećaj neuronskih mreža (Stegen i sar., 2011);
- stečeni poremećaj: inicijalni događaj, latentni period epileptogeneze i stupanj hroničnih napada (Scharfman, 2007).

<sup>4</sup> Prva generacija lekova: benzodiazepini, valproična kiselina, karbamazepin, fenitoin i drugi; Druga generacija lekova: lamotrigin, levetiracetam, topiramata, okskarbazepin, pregabalin i dr. (Perucca i sar., 2018).



## 1.1.2. Dijagnoza i lečenje mTLE-HS

Dijagnoza mTLE-HS se obično uspostavi u četvrtoj deceniji života kod pacijenta koji pati od epilepsije, do kada je vrlo verovatno imao bezuspešne pokušaje lečenja pomoću različitih AED (Tatum, 2012; Landazuri, 2014). Takođe, kod pacijenata sa TLE tipična je i pojava epileptičnih napada rano u životu, pa tako tokom prvih četiri ili pet godina po rođenju dolazi do pojave komplikovanih febrilnih konvulzija ili povreda mozga u vidu trauma ili infekcija. Koincidencija navedenih trauma sa kritičnim periodom razvoja može da ima značajnu ulogu u nastanku oštećenja hipokampusa usled kojih će se kasnije razviti mTLE-HS (Engel, 2001).

Ipak, za sigurnu dijagnozu mTLE-HS neophodno je prepoznati konstalaciju znakova i manifestacija baziranu na neuropsihološkim testovima, MRI, video-EEG i drugim nalazima, zajedno sa utvrđivanjem prisustva karakterističnih kliničkih simptoma i znakova (semiologije<sup>5</sup>) epileptičnih napada (Cendes i sar., 2014). Dve osnovne mTLE semiologije su abdominalni svesni fokalni napad (ranije nazivan aura<sup>6</sup>; mučnina i nelagoda u predelu stomaka koja se penje ka grlu) i automotorni napadi. Pored ova dva, značajno su prisutni i svesni fokalni napadi u vidu osećaja straha, olfaktornih<sup>7</sup> halucinacija, deža vi (fr. *déjà vu*, već viđeno) i dr. (Querol Pascual, 2007, Landazuri, 2014; Fisher i sar., 2017a; Lüders i sar., 2019). Iktalni<sup>8</sup> period automotornog napada (po tipu fokalni napad uz gubitak svesti) tipično počinje motoričkim zastojeom i „zurenjem u prazno“ što je praćeno oroalimentarnim<sup>9</sup> automatizmima<sup>10</sup> (npr. mljackanje i žvakanje) i drugim pokretima bez jasne svrhe a završava se postiktalnom amnezijom, periodom zbunjenosti i mogućim reaktivnim automatizmima (Engel, 2001). Retko se kod nekih pacijenata iktalno mogu javiti i generalizovani toničko-klonički napadi (Nayak i Bandyopadhyay, 2021).

Pošto se utvrdi mTLE-HS koja je i farmakorezistentna, razmatra se drugačiji pristup u lečenju. Resektivna hirurģija se ispostavila kao najefikasniji vid terapije epilepsije kod farmakorezistentnih pacijenata (Baščarević i sar., 2011; Perucca i sar., 2018). Hirurģsko uklanjanje žarišta epilepsije najčešće podrazumeva amigdalo-hipokampektomiju sa ili bez delimične lobektomije temporalnog režnja (Engel, 2001; Tatum, 2012; Baulac, 2015; Nayak i Bandyopadhyay, 2021). Prehirurģskom procenom kroz seriju testova i ispitivanja se utvrđuju podobni kandidati za hirurģsko lečenje TLE, što su uglavnom pacijenti sa teškim oblikom farmakorezistentne TLE i sa jednostranom HS, kod kojih je uspešnost pozitivnog ishoda, tj. oslobađanja od epileptičnih napada 60–80% nakon intervencije (Cendes i sar., 2014).

Neurostimulacija električnom strujom ili magnetnim poljem je alternativa za farmakorezistentne pacijente za koje resektivna hirurģija nije moguća opcija ili koji ne žele takav vid lečenja (Nayak i Bandyopadhyay, 2021). Ove vrste terapije u koje spadaju stimulacija nerva vagusa, duboka stimulacija mozga i responsivna stimulacija kore uglavnom

---

<sup>5</sup> Semiologija (grč. *semeion*, znak), nauka koja proučava ulogu i razvoj znakova; med. Disciplina koja izučava simptome bolesti, simptomatologija.

<sup>6</sup> Epileptična aura je stari naziv za grupu senzacija koje pacijenti opisuju kao upozorenje koje najavljuje napad. Zapravo, aura je svesni fokalni napad koji ILAE definiše kao subjektivni iktalni fenomen koji kod datog pacijenta može prethoditi uočljivom napadu (Fisher i sar., 2017a). Svesni fokalni napadi mogu biti auditorni, autonomni (abdominalna aura, urinarna aura i dr.), gustatorni, olfaktorni, psihički (deža vi (fr. *déjà vu*, već viđeno), ekstatična, seksualna, iluzivna, kognitivna aura i dr.), somatosenzorni, vestibularni i vizuelni (iktalno slepilo) (Lüders i sar., 2019).

<sup>7</sup> Olfaktor, koji se odnosi na čulo mirisa.

<sup>8</sup> Iktus (lat. *ictus*, udarac, ubod); med. Iznenadni napad bolesti; epileptični napad u užem smislu. Period trajanja napada naziva se iktalni period. Vreme između dva napada naziva se interiktalni period. Period neposredno pre napada naziva se preiktalni, a neposredno nakon – postiktalni.

<sup>9</sup> Oroalimentaran, koji se odnosi na usta i digestivni sistem.

<sup>10</sup> Automatizmi, fiziol. Skup nehotičnih, ponavljajućih pokreta bez učešća volje.

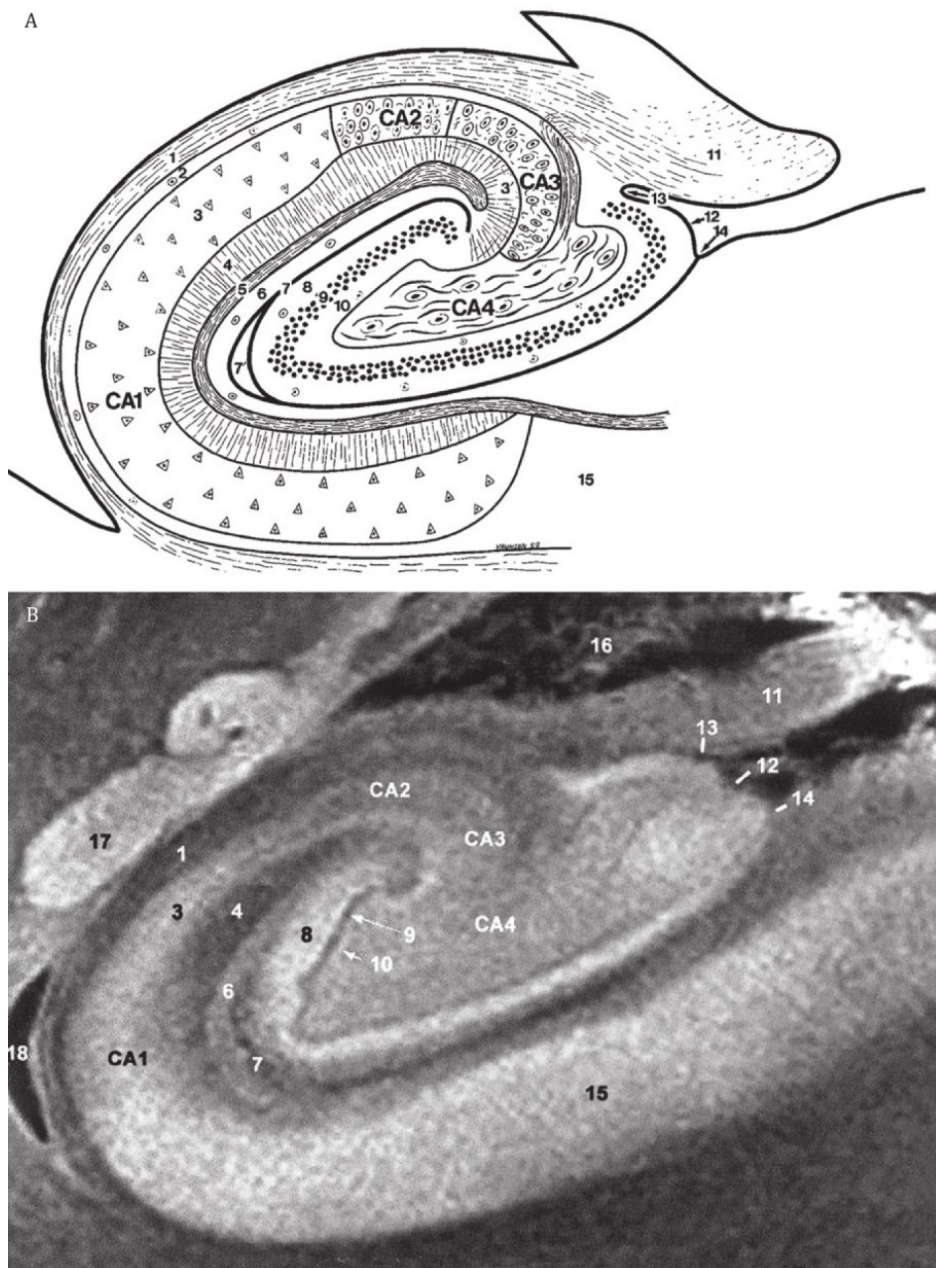
umanjuju učestalost napada, dok mali broj pacijenata (< 5%) postaje potpuno od njih oslobođen (Perucca i sar., 2018).

## 1.2. Hipokampusna skleroza u epilepsiji temporalnog režnja

Hipokampusna skleroza (HS), tj. „otvrđnjavanje“ tkiva hipokampusu je najučestalije moždano oštećenje temporalnog režnja kod pacijenata sa mTLE, a sam hipokampus predstavlja najviše proučavan deo mozga kako kod humane epilepsije tako i kod eksperimentalnih modela (Blümcke i sar., 2002; Thom, 2009; Malmgren i Thom, 2012; Blümcke i sar., 2013; Thom, 2014). HS je prvobitno bila uočena kao pojava u epilepsiji početkom XIX veka, kada su neuropatolozi uspeali da opišu specifične histološke obrasce *post mortem*, ali je prvu detaljniju studiju dao nemački neurolog Wilhelm Sommer (Vilhelm Zomer) (Thom, 2014). Smatra se da je HS istovremeno i uzročnik i posledica epileptičnih napada jer je karakteriše pogoršavanje stanja tokom vremena (Theodore i sar., 1999; Tatum, 2012).

### 1.2.1. Hipokampusna formacija

Hipokampus je zajednički naziv za strukturu „stare“ moždane kore, koji anatomske podrazumeva dve celine: pravi hipokampus (u užem smislu) koji se naziva i Amonov rog (lat. *hippocampus proprius*, i.e. *cornu Ammonis*, CA) i zubatu vijugu (lat. *gyrus dentatus*, GD). Zajedno sa trećom strukturom, subikulumom (lat. *subiculum*, SUB), formiraju hipokampusnu formaciju (Tatum, 2012, Duvernoy i sar., 2013). Na koronalnom preseku hipokampusne formacije, uočava se njegova slojevita i heterogena građa (slika 1.2).

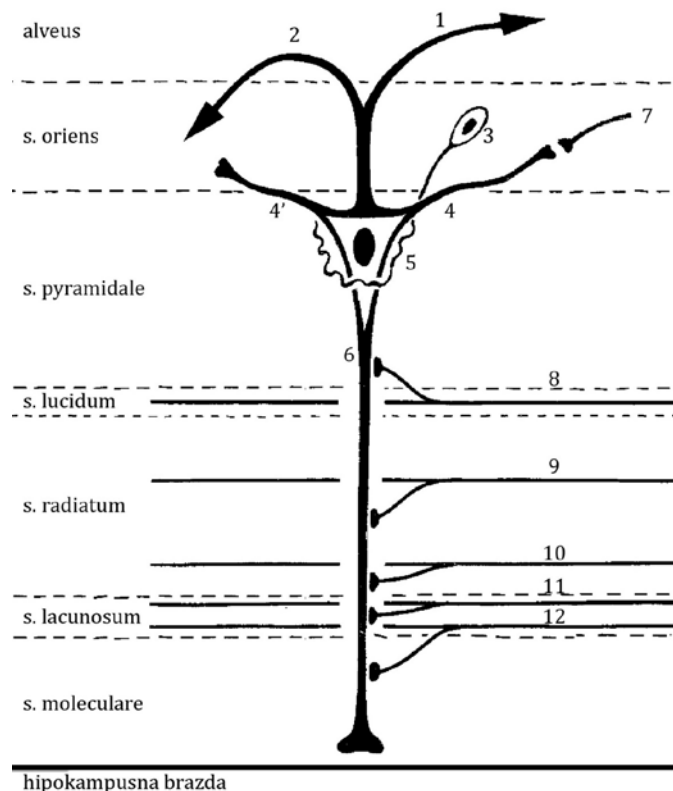


**Slika 1.2. Shematski prikaz slojevite strukture hipokampusa (A) i MRI snimak (B) na koronalnom preseku.** Amonov rog: 1, *alveus*; 2, *stratum oriens*; 3, *stratum pyramidale*; 3', *stratum lucidum*; 4, *stratum radiatum*; 5, *stratum lacunosum*; 6, *stratum moleculare*; 7, rudimentarna hipokampusna brazda; 7', zaostala šupljina; CA1–CA4, polja 1–4 Amonovog roga. Zubata vijuga: 8, *stratum moleculare*; 9, *stratum granulosum*; 10, polimorfni sloj. Okolne strukture: 11, *fimbria*; 12, rub zubate vijuge; 13, fimbriodontatna brazda; 14, površinska hipokampusna brazda; 15, *subiculum*; 16, horoidni pleksus; 17, rep repatog jedra; 18, temporalni (donji) rog bočne komore. Preuzeto i prilagođeno iz Duvernoy i sar., 2013.

CA region hipokampusa se može razdeliti na šest slojeva krenuvši od šupljine bočne komore (Slike 1.2 i 1.3) i to su prema Duvernoy i sar.:

- *alveus* (lat. *alveus*, ALV) – aksonski sloj koji predstavlja i zid bočne komore, sadrži vlakna piramidalnih neurona hipokampusa i subikuluma (slika 1.3) i predstavlja eferentni put ovih struktura koji odlazi kroz fimbriju u forniks.
- *orijens sloj* (lat. *stratum oriens*, SO) – slabo anatomske definisan sloj koji sadrži retke korpaste neurone i ispresecan je aksonima piramidalnih neurona na putu do *alveusa* (slika 1.3).

- piramidalni sloj (lat. *stratum pyramidale*, SP) – sloj tela piramidalnih neurona, glavnih neuronskih ćelija CA. Ovi neuroni su tipično tetraedarnog oblika sa osnovom okrenutom ka alveusu a vrhom ka rudimentarnoj hipokampusnoj brazdi (slika 1.3), ali postoje regionalne varijacije kroz CA polja 1–4. Aksoni koji kreću od osnove prolaze do alveusa ali se pojedini i granaju u tzv. Šaferove kolaterale, koji zaokreću unazad do radijalnog sloja i ostvaruju sinapse sa drugim piramidalnim neuronima. Pored aksona, iz uglova osnove tela neurona polaze i bazalni dendriti od kojih se neki granaju u SO. Sa vrha piramidalnog neurona polazi izrazito dugačak vršni (apikalni) dendrit koji prolazi čak do molekularnog sloja. Tela ovih neurona su okružena gustom razgranatom mrežom nastavaka korpastih neurona iz SO (slika 1.3). Pored piramidalnih, u ovom sloju se u manjem broju nalaze i stelatni neuroni i korpasti interneuroni.
- radijalni sloj (lat. *stratum radiatum*, SR) – sloj koji se uglavnom sastoji od apikalnih dendrita piramidalnih neurona (slika 1.3) raspoređenih paralelno što ovom sloju daje trakast ili prugast izgled. Uz ove dendrite se nalaze i Šaferove kolaterale aksona piramidalnih neurona, vlakna iz septalnih jedara i komisuralna vlakna.
- lakunarni sloj (lat. *stratum lacunosum*, SL) – sloj koji uglavnom sadrži brojne aksonske snopove paralelne površini CA, poreklom uglavnom od perforantnih vlakana i Šaferovih kolaterala.
- molekularni sloj (lat. *stratum moleculare*, SM) – završni sloj CA koji praktično čini zid rudimentarne hipokampusne brazde, a zbog delimičnog nestanka ove brazde u toku razvića, naleže na molekularni sloj zubate vijuge. Sadrži retke interneurone i krajeve apikalnih dendrita piramidalnih neurona (slika 1.3).



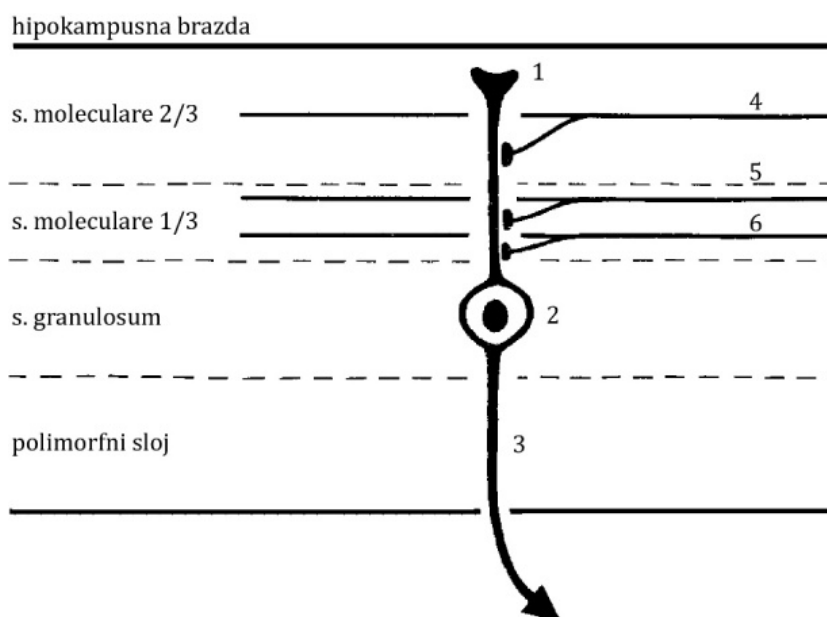
**Slika 1.3. Shematski prikaz slojeva CA i rasporeda ćelijskih tela, nastavaka i sinapsi.** s, sloj (lat. *stratum*); 1, akson piramidalnog neurona; 2, 10 i 11, Šaferove kolaterale; 3, korpasti neuron; 4 i 4', bazalni dendriti; 5, telo piramidalnog neurona; 6, apikalni dendrit; 7, sinapse bazalnih dendrita sa drugim piramidalnim neuronima, i septalnim i komisuralnim vlaknima; 8, mahovinasta vlakna (samo u CA3 i CA4); 9, septalna i komisuralna vlakna; 12, perforantni put. Preuzeto i prilagođeno iz Duvernoy i sar., 2013.

Zbog regionalnih varijacija u izgledu piramidalnih neurona, CA na poprečnom preseku ima heterogenu građu, zbog čega su opisana četiri različita polja, od CA1 do CA4 (Lorente de Nò, 1934) čije granice nisu oštro definisane (slika 1.2). Duvernoj i sar. objedinjuju podatke iz dostupne literature i daju pregled glavnih osobina ovih polja (Duvernoy i sar., 2013):

- CA1 polje se nadovezuje na SUB i ovde su piramidalni neuroni manje gustine, tipično tetraedarnog oblika, trouglasti na poprečnom preseku i nešto sitniji od ostalih.
- CA2 polje je sastavljeno od većih, jajastijih, zbijenih neuronskih tela, što mu daje uzak i gušći izgled u odnosu na CA1.
- CA3 polje predstavlja prevoj CA koji ulazi u žljeb zubate vijuge a neuronska tela su slična onima u CA2 ali manje gusto raspoređena. Tipična odlika ovog polja je prisustvo finih, nemijelizovanih aksona granularnih neurona zubate vijuge, tzv. mahovinastih vlakana, koja se nalaze zgusnuta uz neuronska tela piramidalnih neurona ali i uz radijalni sloj ispod njih, stvarajući na taj način dodatni sloj samo u CA3 – svetli sloj (lat. *stratum lucidum*, SLu) (slike 1.2 i 1.3).
- CA4 polje je deo CA obuhvaćen žljebom zubate vijuge, sa velikim, okruglastim, malobrojnim i retko raspoređenim neuronskim telima među isprepletanim, velikim vlaknima (Duvernoy i sar., 2013).

Hipokampusna zubata vijuga je tanka, uzduž povijena i dorzalno ispupčena ploča koja obavlja CA4 polje Amonovog roga i može se takođe podeliti u slojeve, i to tri (slike 1.2 i 1.4), krenuvši od rudimentarne hipokampusne brazde na (Duvernoy i sar., 2013):

- molekularni sloj (lat. *gyrus dentatus stratum moleculare*, GDSM) – sloj koji je širok i čini drugi zid rudimentarne hipokampusne brazde i koji sadrži uglavnom dendrite granularnih neurona, nervna vlakna i retke interneurone. Funkcionalno, dvotrećinski deo GDSM uz ovu brazdu prima vlakna perforantnog puta kao i SM u CA, dok preostala unutrašnja trećina koja je u kontaktu sa granularnim neuronima prihvata komisuralna i septalna vlakna (slika 1.4).
- granularni sloj (lat. *gyrus dentatus stratum granulosum*, GDSG) – prominentni sloj GD sa sitnim i okruglastim telima granularnih neurona koji su izuzetno zbijeni, što ovaj sloj jasno odvaja od okolnih. Orjentisani su tako da im aksoni (tanka, nemijelizovana, mahovinasta vlakna) presecaju polimorfni sloj i odlaze ka CA4 i CA3 poljima Amonovog roga.
- polimorfni sloj (lat. *stratum plexiforme*) – ujedinjuje granularni sloj GD sa poljem CA4 i kroz njega prolaze mahovinasta vlakna tj. aksoni granularnih neurona. Sadrži i retke interneurone.



**Slika 1.4. Shematski prikaz slojeva GD i rasporeda ćelijskih tela, nastavaka i sinapsi.** s, sloj (lat. stratum); 1, apikalni dendrit; 2, telo granularnog neurona; 3, akson (mahovinasto vlakno); 4, perforantni put; 5, komisuralna vlakna; 6, septalna vlakna. Preuzeto i prilagođeno iz Duvernoy i sar., 2013.

Treća struktura hipokampusne formacije, funkcionalno i anatomski tesno povezana sa CA, koja se nalazi u njegovom produžetku, je subikulum, za čiju se granicu smatra kraj radijalnog sloja CA (Lorente de Nò, 1934). Subikulum takođe kao glavni tip ćelija sadrži piramidalne neurone slične kao u CA1, a anatomski čini deo parahipokampusne vijuge (Duvernoy i sar., 2013).

Glavni ekscitatorni ulazni put u hipokampus, koji se naziva i višesinaptički unutarhipokampusni put, proteže se od drugog sloja entorinalne kore do granularnih neurona GD, zatim mahovinastim vlaknima do CA4 i CA3 piramidalnih neurona i konačno, njihovim Šaferovim kolateralama do CA1 i SUB neurona; glavni izlazni put iz hipokampusu od piramidalnih neurona prolazi kroz alveus (Malmgren i Thom, 2012).

## 1.2.2. Podtipovi hipokampusne skleroze

Glavne odlike HS su selektivno, masovno propadanje piramidalnih neurona po karakterističnom šablonu CA polja i reaktivna gliozna, dok sporedni neuropatološki nalazi uključuju i rasipanje i propadanje granularnih neurona u GD i bujanje mahovinastih vlakana (Malmgren i Thom, 2012). Uzrok hipokampusne skleroze često može biti u složenom uzajamnom dejstvu genetičkih predispozicija i sredinskih činilaca u vidu povreda i trauma (Walker, 2015).

Tokom poslednjih decenija nastojalo se da se ustanove i razvrstaju jasni podtipovi HS na osnovu raspodele i intenziteta glioze i propadanja neurona (Thom, 2014). To je bio složen zadatak najviše zbog različitih uzročnika HS kao i različitih činilaca koji utiču na stepen HS, kao što su trajanje epilepsije, uzrast na početku bolesti, prisustvo febrilnih konvulzija i drugih prethodnih patologija (Blümcke i sar., 2013). Imajući ove činjenice u vidu, ILAE je ustanovila klasifikaciju tipova HS utemeljenu na prethodnim pokušajima i kvalitativnim histopatološkim procenama koje se mogu izvršiti u većini kliničkih ustanova (Thom, 2014).

Od strane ILAE, na osnovu hematoksilinskog bojenja i imunohistohemijskog obeležavanja karakterističnog neuronskog proteina RBFOX3 (engl. *RNA binding fox-1 homolog 3*), prethodno označavanog kao neuronski jedarni protein (NeuN, engl. *neuronal nuclear*

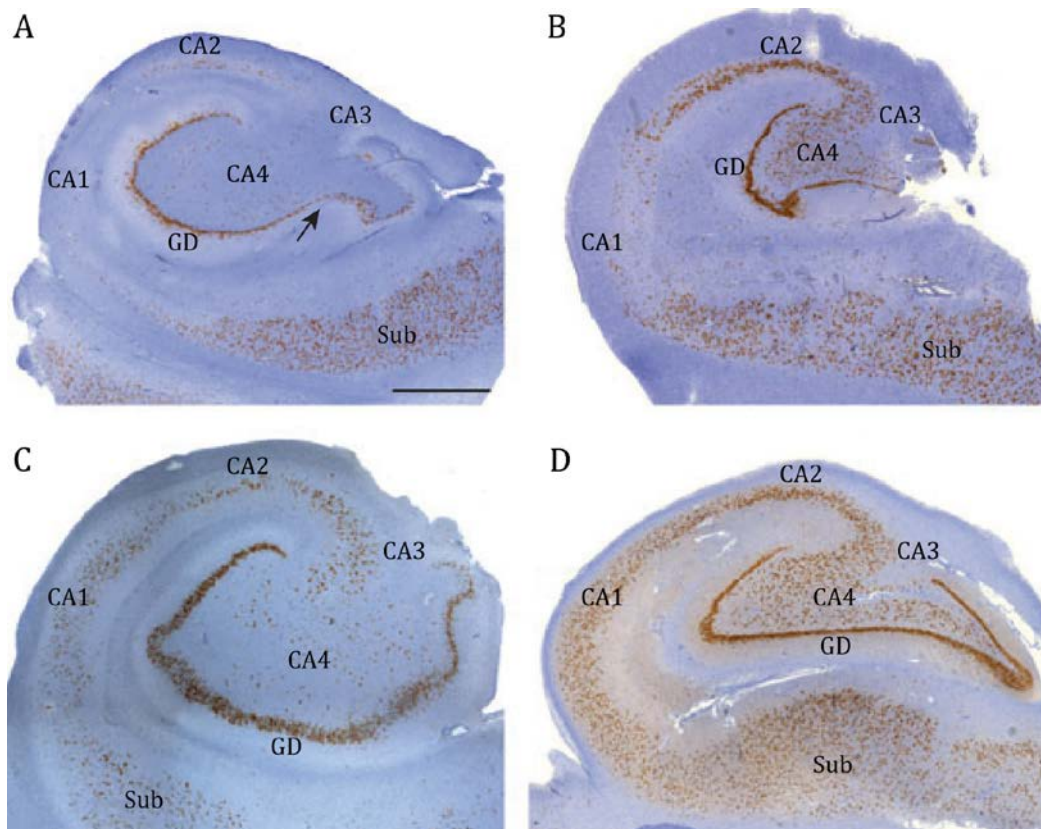
*protein*), stepena odumiranja neurona, pogođenih CA polja i obrasca i stepena glioze, predložena je klasifikacija hipokampusne skleroze u četiri tipične grupe, opisane u nastavku (slika 1.5; Blümcke i sar., 2013).

Hipokampusna skleroza tip I (HS1), ranije razvrstavana prema stepenu gubitka neurona u dva tipa (klasična i totalna skleroza) je nalaz prisutan u 60 – 80% hirurških uzoraka (Thom, 2014). Ovaj tip HS odlikuje značajno odumiranje piramidalnih neurona u svim CA poljima, od kojih je najprimetnije u CA1 sa preko 80% gubitka neurona i CA4 sa 40 – 90% gubitka (slika 1.5A) (Blümcke i sar., 2013). Ostala polja su takođe pogođena ali u različitoj meri: CA3 sa 30 – 90% gubitka neurona a CA2 sa 30 – 50% gubitka. Za zubatu vijugu je tipično rasipanje (*i.e.* disperzija) granularnih neurona gde se gubi 50 – 60% ovih ćelija. Gliozna je prisutna samo u CA1 ili CA1 i CA4 poljima (Blümcke i sar., 2013). HS1 je tip HS najčešće povezivan sa febrilnim konvulzijama (50 – 76%), kao i sa najboljim postoperativnim ishodom (stopa prestanka napada 70 – 85% tokom dve godine i 50% tokom 10 godina) (Thom, 2014).

Hipokampusna skleroza tip II (HS2) predstavlja neuobičajen šablon skleroze, pronađen u 5 – 10% hirurških uzoraka a naziva se još i „gubitak neurona i gliozna predominantno u CA1 polju“ (Thom, 2014). U ovom tipu HS propada do 80% piramidalnih neurona CA1 polja (slika 1.5B), dok se ostala CA polja karakterišu malim gubitkom ovih ćelija koji je teško uočljiv rutinskim kvalitativnim mikroskopskim ispitivanjem (gubitak < 20% neurona u CA2 kao i u CA3, i < 25% u CA4) (Blümcke i sar., 2013). Može biti prisutno i rasipanje granularnih neurona zubate vijuge ali uglavnom bez dramatičnog gubitka ćelija. HS2 u nekim slučajevima ima slabiji postoperativni uspeh u oslobađanju od napada nego HS1 i može se javljati kod pacijenata sa početkom epilepsije u starijem uzrastu (Thom, 2014).

Hipokampusna skleroza tip III (HS3) je takođe redak, atipičan obrazac skleroze, koji je uočen u svega 3 – 7% svih mTLE hirurških intervencija, a naziva se još i „gubitak neurona i gliozna CA4 polja“ (Thom, 2014). Najveći gubitak primarnih neurona je ograničen na CA4 (~ 50%) i zubatu vijugu (~ 35%) (slika 1.5C). Ostala CA polja odlikuje nešto manji gubitak piramidalnih neurona (CA1 < 20%, CA2 < 25% i CA3 < 30%) (Blümcke i sar., 2013). HS3 je obrazac koji se u određenom broju slučajeva javlja u dualnoj patologiji (npr. sa tumorima), kod pacijenata sa početkom epilepsije u starijem uzrastu, i može imati lošiji postoperativni ishod u oslobađanju od napada (Thom, 2014).

Četvrti tip označen je kao hipokampusna gliozna bez skleroze (Thom, 2014). Iako elektrofiziološka ispitivanja potvrđuju nastanak epileptičnih napada u mezijalnom delu temporalnog režnja, oko 20% pacijenata ima histopatološke nalaze bez značajnog gubitka piramidalnih neurona hipokampusu, tj. bez HS (slika 1.5D) (Blümcke i sar., 2013). Kod ovih slučajeva može se uočiti, u manjoj ili većoj meri, samo reaktivna gliozna CA4 polja u zoni uz granularne neurone GD. Ovaj nalaz je značajan sa naučne strane zbog sve više saznanja o bitnoj ulozi glije u modulaciji i nastajanju epileptičnih napada (Blümcke i sar., 2013; Devinsky i sar., 2013).



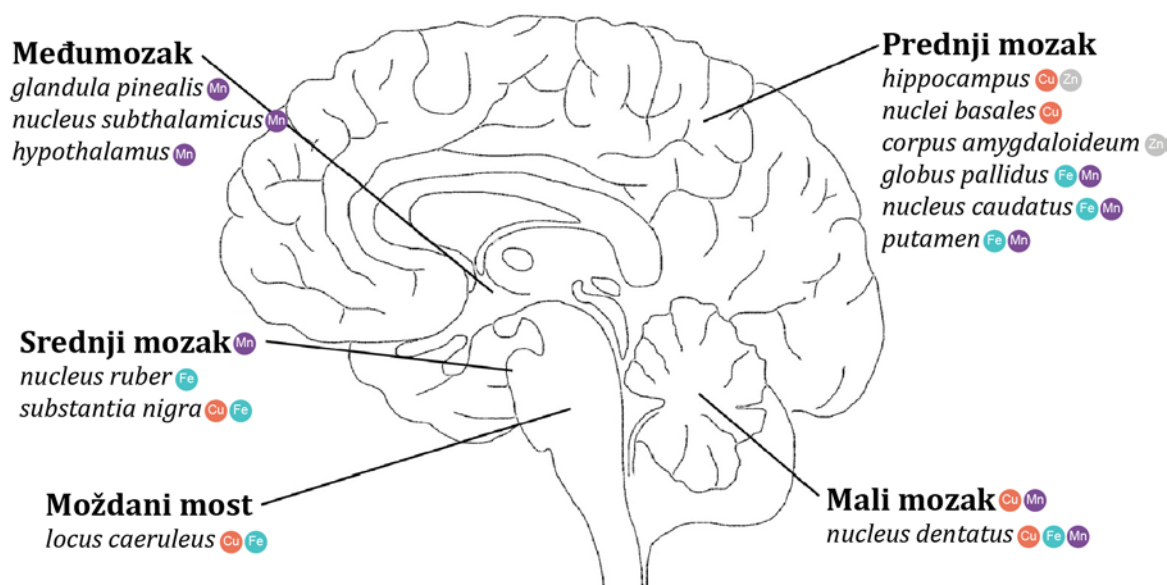
**Slika 1.5. ILAE histopatološki tipovi hipokampusne skleroze mTLE pacijenata.** Mikrografije dvojnog bojenja koronalnih preseka hipokampusa hematoksilinom (plavo) i imunohistohemijskog bojenja NeuN (braon) (prisutna gliozna je pokazana imunohistohemijskim bojenjem GFAP ali nije prikazana na ovim presecima). **(A)** Hipokampusna skleroza tip I. Izražen gubitak piramidalnih neurona u poljima CA1 i CA4, nešto manje i varijabilno u CA2 i CA3. Postoji jasan prelaz ka očuvanim neuronima Sub. Zubata vijuga takođe trpi značajan gubitak granularnih neurona posebno u unutrašnjem rukavcu (strelica). **(B)** Hipokampusna skleroza tip II. Predominantno propadanje neurona i gliozna u CA1 u odnosu na ostala CA polja. **(C)** Hipokampusna skleroza tip III. Predominantan gubitak neurona CA4 polja i gliozna. **(D)** Hipokampusna gliozna bez skleroze. Razmera od 1 mm na slici A odnosi se i na ostale slike. Sub, *subiculum*; GD, zubata vijuga. Preuzeto i prilagođeno iz Blümcke i sar., 2013.



### 1.3. Mozak i metali

Postoji oko 20 hemijskih elemenata, metala i nemetala, koji su danas obeleženi kao osnovni (*i.e.* esencijalni) elementi za žive sisteme, iako se i dalje raspravlja o tome koji bi trebalo da se smatraju otrovnim, korisnim ili neophodnim, naročito za ljude (Zoroddu i sar., 2019). Značaj metala u humanoj ishrani opisan je još 1973. u izveštaju grupe stručnjaka SZO (WHO Expert committee on trace elements in human nutrition i World health organization, 1973). Strukturno i funkcionalno, metali su od osnovnog značaja za opstanak živih sistema što se zapaža kroz njihove mnogobrojne biohemijske uloge u ključnim fiziološkim procesima: stabilizaciji konformacija makromolekula, prenosu signala kroz ćeliju, radu aktivnog mesta enzima, energetskom metabolizmu, redoks procesima, prenosu akcionih potencijala, kontrakciji mišića, transportu kiseonika i mnogim drugim (Crichton i Ward, 2013; Barnham i Bush, 2014). Grupa metala koji se smatraju esencijalnim za ljude su alkalni i zemnoalkalni metali natrijum, kalijum, magnezijum i kalcijum, i prelazni metali mangan, gvožđe, kobalt, bakar, cink i molibden, dok se za vanadijum, nikl i kalaj to pretpostavlja ali nije utvrđeno (Zoroddu i sar., 2019). Metali se u ćelijama nalaze u svojoj jonskoj formi i različitim oksidacionim stanjima (Bleackley i MacGillivray, 2011).

Mozak je veliki repozitorijum metala čiji svaki deo ima jedinstvenu količinu i metalni sastav (slika 1.6) što je u tesnoj vezi sa lokalnim metaboličkim potrebama i ostvarivanjem biološke uloge metaloproteina koji koriste te metale (Popescu i Nichol, 2011). Tako su, na primer, regioni mozga odgovorni za motoričku aktivnost bogati gvožđem. Hipokampus i zubata vijuga su strukture bogate cinkom, zbog prisustva glucinkergičkih neurona (Grochowski i sar., 2019). Hipokampus je, takođe, uz crnu masu i *locus caeruleus* region sa otkrivenim visokim koncentracijama bakra (Becker i sar., 2007; Davies i sar., 2013). Regioni međumozga, malog mozga ali i drugi, posebno su bogati manganom zbog njegovog učešća u radu mnogih enzima i regulaciji metaboličkih puteva (Martinez-Finley i sar., 2013).



**Slika 1.6. Opšta shema delova mozga i raspodele cinka, gvožđa, mangana i bakra.** Istaknuti su regioni koji su posebno bogati datim elementima u fiziološkim uslovima. *glandula pinealis*, pinealna žlezda (epifiza, šišarčica); *hypothalamus*, hipotalamus; *nucleus subthalamicus*, suptalamičko jedro, *nucleus ruber*, crveno jedro; *substantia nigra*, crna masa; *locus caeruleus*, modra mrlja; *hippocampus*, hipokampus; *nuclei basales*, bazalne ganglije; *corpus amygdaloideum*, bademasto telo (amigdala); *globus pallidus*, blede jedro; *nucleus caudatus*, repato jedro; *putamen*, ljuska; *nucleus dentatus*, zubato jedro. Preuzeto i prilagođeno iz Wandt i sar., 2021.

Opisana ali još nedovoljno razjašnjena uloga ovih elemenata u hemiji mozga i nervnog tkiva je tematika značajna u mnogim oblastima neurobiologije, naročito u fiziologiji i patologiji neuroloških i neurodegenerativnih oboljenja i starenju (Que i sar., 2008; Crichton i Ward, 2013). Zbog posebnog značaja nekih od ovih metala u ostvarivanju bioloških funkcija nervnog sistema razvijena je posebna naučna disciplina, metaloneurohemija (Burdette i Lippard, 2003; Crichton i Ward, 2013).

### 1.3.1. Gvožđe

Najzastupljeniji prelazni metal u ljudskom telu je gvožđe (Fe), sa ukupnim prosečnim udelom od oko 5 g (Que i sar., 2008). Najviše se nalazi u hemoglobinu eritrocita i mioglobinu mišića (~ 80%), dok je ostatak raspoređen u proteinima za skladištenje (ferritinu i hemosiderinu), katalitičkim centrima enzima i vrlo malo u transferinu u krvnoj plazmi (3–4 mg) (Zoroddu i sar., 2019). Fe je takođe i najčešći prelazni metal u mozgu zbog najveće stope oksidativnog metabolizma, ali varira regionalno i najviše ga ima u bazalnim ganglijama (Que i sar., 2008). Pored toga, regioni koji se ističu višim koncentracijama gvožđa su i *substantia nigra*, *locus caeruleus*, *putamen*, *nucleus ruber*, *globus pallidus*, *nucleus caudatus* i *nucleus dentatus* (slika 1.6; Grochowski i sar., 2019). Može postojati u više oksidacionih stanja dok su biološki najrelevantnija  $Fe^{2+}$  i  $Fe^{3+}$  (Bleackley i MacGillivray, 2011). Zajedno sa vodonik-peroksidom,  $Fe^{2+}$  učestvuje u Fentonovoj reakciji gde nastaje hidroksil-radikal, najreaktivnija metabolička vrsta radikala koja može dovesti do nepovratnih oštećenja biomakromolekula i ćelije (Hider i Kong, 2013).

Ljudski organizam poseduje preko 500 metaloproteina čija biološka uloga uključuje ili zavisi od gvožđa (Zoroddu i sar., 2019). Mogu se razvrstati u nekoliko klasa: hemoproteini, Fe-S proteini, Fe proteini bez hema i proteini za skladištenje i prenos gvožđa (Bleackley i MacGillivray, 2011). Hemoproteini, odnosno proteini koji sarže hem prostetičku grupu, sadrže Fe u koordinacionom kompleksu sa porfirinskim prstenom. Izuzetno su velika klasa metaloproteina, a biološke uloge mogu ostvarivati kao prenosioци kiseonika, prenosioци elektrona ili enzimi u metabolizmu kiseonika (Hider i Kong, 2013).

Skladištenje i prenos gvožđa je vrlo strogo regulisano proteinima jer slobodno gvožđe u višku može biti opasno. Redoks par  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  u prisustvu molekularnog kiseonika stvara destruktivne slobodno-radikalske vrste koje su pogubne za žive sisteme kad nisu kontrolisane (Zoroddu i sar., 2019). Poremećaji u transportu i metabolizmu Fe značajni su za etiopatogenezu mnogih neurodegenerativnih oboljenja kao sto su Fridrajhova ataksija (propadanje Purkinje neurona), neuroferritinopatija (mutacija u genu za laki lanac ferritina i nagomilavanje ferritina i gvožđa u mozgu), Parkinsonova i Alchajmerova bolest (Bleackley i MacGillivray, 2011).

Savremena istrazivanja metabolizma gvožđa u epilepsiji su pokazala da je nagomilavanje ovog metala jedan od čestih uzroka pojave refraktorne epilepsije kod pacijenata koji su preživeli hemoragijski moždani udar ili traumatsku povredu mozga, usled razgradnje crvenih krvnih zrnaca i hemoglobina (Chen i sar., 2020b). Interesantno je da gvožđe igra bitnu ulogu u patologiji epilepsije, naročito kroz mehanizme ferroptoze kao vrste regulisane ćelijske smrti, koja je uočena u ovoj bolesti (Kahn-Kirby i sar., 2019).

### 1.3.2. Cink

Organizam prosečne osobe sadrži cink u količini od oko 2 g, što ga po zastupljenosti čini drugim prelaznim metalom, posle gvožđa (Bleackley i MacGillivray, 2011). Jon  $Zn^{2+}$  u fiziološkim uslovima nema druga oksidaciona stanja jer poseduje popunjenu d orbitalu i nije redoks aktivan, što ga čini jedinstvenim među biološki relevantnim prelaznim metalima i

manje toksičnim u odnosu na Fe i Cu (Bleackley i MacGillivray, 2011). Zbog ovih svojstava, Zn se u ćelijama nalazi slobodan u mnogo većim koncentracijama nego Fe, skoro isto kao veći metaboliti kao što je adenzin trifosfat (ATP) (Maret, 2013).  $Zn^{2+}$  je sveprisutan element (prvenstveno u mozgu, kostima i mišićima) koji ima višestruke biološke uloge: strukturne, katalitičke i regulatorne, i učestvuje u enzimskim reakcijama u preko 300 proteina (Zoroddu i sar., 2019).

Najveće koncentracije Zn se nalaze u mozgu, ali nisu podjednako raspoređene. Bela masa je bogatija cinkom od sive jer je  $Zn^{2+}$  neophodan za stabilizaciju strukture mijelinskog omotača (Popescu i Nichol, 2011). Dok cinka ima manje u moždanim strukturama bogatim gvožđem i bakrom, u velikoj meri se nalazi u novoj kori, mirisnom polju, hipokampusima i bademastim jedrima – strukturama bogatim glucinkergičkim<sup>11</sup> neuronima (Que i sar., 2008; Popescu i Nichol, 2011). Mahovinasta vlakna granularnih neurona zubate vijuge sadrže velike količine cinka u vezikulama presinaptičkih završetaka koji se nalaze u CA3 i CA4 poljima hipokampusa (Blaabjerg i Zimmer, 2007).

Među proteinima zavisnim od Zn može se razdvojiti više funkcionalnih klasa: matriksne metaloproteinaze, karboksipeptidaze i proteini sa „cinkanim prstima“, a u ostale proteine sa cinkom spadaju i alkalna fosfataza, karbonatna dehidrataza i insulin (Bleackley i MacGillivray, 2011). Zbog sposobnosti da se ponaša kao unutarćelijski glasnik kao i glasnik spoljnih ulaza,  $Zn^{2+}$  se među redoks neaktivnim metalima smatra i regulatornim jonom sa signalnim kapacitetom sličnim kalcijumu (Zoroddu i sar., 2019).

Veza između cinka i epilepsije je vrlo složena i dosta izučavana. Metaanaliza rezultata studija o ulozi metala u epilepsiji je pokazala da su izmerene značajno niže koncentracije cinka u serumu pacijenata sa epilepsijom tretiranih valproatom i karbamazepinom nego u serumu kontrolnih učesnika, kao i niže koncentracije u serumu i likvoru osoba sa febrilnim konvulzijama nego odgovarajućih kontrolnih pacijenata (Saghazadeh i sar., 2015). Ipak, povišen cink (vanćelijski i unutarćelijski) može imati i pro- i antiepileptogeni efekat putem modulacije aktivnosti različitih proteina. U tom smislu, visoke koncentracije vanćelijskog cinka povećavaju aktivnost  $K^+/Cl^-$  kotransportera putem inhibicije receptora spregnutog sa G proteinom (GPR39) što ima za posledicu antiepileptogeni efekat kroz mehanizme GABA-ergičke inhibicije, dok visoke koncentracije unutarćelijskog cinka dovode do inhibicije  $K^+/Cl^-$  kotransportera ili aktivacije subjedinice  $\alpha 1H$  voltažno-zavisnog kanala za kalcijum (CACNA1H) što može da dovede do epileptičnih napada (Doboszewska i sar., 2019). S druge strane, unutarćelijski povećan Zn takođe može aktivirati Q podfamiliju voltažno-zavisnih kalijumskih kanala i na taj način imati protektivan efekat u kontekstu ekscitotoksičnosti vezane za epileptične napade (Doboszewska i sar., 2019).

### 1.3.3. Mangan

Ljudsko telo u proseku sadrži 12 – 20 mg mangana, najmanje od svih prelaznih metala (Zoroddu i sar., 2019). Mn se može nalaziti u 11 oksidacionih stanja (od -3 do +7) od kojih su  $Mn^{2+}$ ,  $Mn^{3+}$  i  $Mn^{4+}$  biološki relevantna dok ostala nisu detektovana u živim sistemima (Bleackley i MacGillivray, 2011).

Mn je esencijalni metal neophodan za mnogobrojne biološke funkcije i procese koji uključuju pravilan razvoj, metabolizam ugljenih hidrata, energetski metabolizam, imunitet, reprodukciju, antioksidativnu zaštitu, obnavljanje kostiju i vezivnog tkiva i zgrušavanje krvi (Avila i sar., 2013). Ulogu u pomenutim procesima Mn ostvaruje kao aktivator ili kofaktor mnogobrojnih enzima kao što su piruvat dekarboksilaza, izocitrat dehidrogenaza, glutamin

---

<sup>11</sup> Neuroni koji kao neurotransmitere otpuštaju i glutamat i cink

sintaza (GS), superoksid dismutaza 2, arginaza, serin/treonin fosfataza i mnoge druge transferaze, hidrolaze i liaze (Crowley i sar., 2000). Ipak, za mnoge navedene aktivnosti Mn nije jedini mogući metalni kofaktor već lako može biti zamenjen magnezijumom, gvožđem ili bakrom, pa su neophodna dodatna istraživanja kako bi se ustanovio potpun skup enzima u kojima Mn igra esencijalnu ulogu (Avila i sar., 2013).

Prekomerno izlaganje manganu iz životne sredine dovodi do neuropsihijatrijskog poremećaja, manganizma, stanja po simptomima sličnog Parkinsonovoj bolesti koje ne reaguje na dopaminsku terapiju (Bleackley i MacGillivray, 2011). Do pomenutog poremećaja dolazi zbog nagomilavanja mangana, najviše u dopaminskim zonama mozga (*nucleus caudatus*, *putamen*, *globus pallidus*, *substantia nigra* i *nucleus subthalamicus*) što dovodi do pokretanja mehanizama koji uključuju oksidativni stres, pogrešno savijanje proteina, apoptozu, probleme u radu mitohondrija i remećenje homeostaze ostalih metalnih jona (Zoroddu i sar., 2019).

Posebno značajnu funkciju Mn ostvaruje u nervnom sistemu kao regulator i kofaktor GS, najzastupljenijeg manganoenzima kod čoveka (Takeda, 2003; Zoroddu i sar., 2019). Ovaj enzim katalizuje prelazak glutamata u glutamin i prvenstveno se eksprimira u astrocitima, a izrazito je oskudan u hipokampusu mTLE pacijenata (Eid i sar., 2008; Papageorgiou i sar., 2018). Mangan je prvi put doveden u vezu sa epilepsijom 1938. nakon čega je nekoliko studija potvrdilo te nalaze (Gonzalez-Reyes i sar., 2007). Pokazano je da nedostatak Mn dovodi do pojačane glutamatske signalizacije i ekscitotoksičnosti, pa se smatra da povećana sklonost ka epileptičnim napadima kod osoba sa nedostatkom Mn može biti uzrokovana smanjenjem nivoa i/ili aktivnosti GS (Takeda, 2003; Avila i sar., 2013). Upravo je i smanjena koncentracija Mn uočena u hipokampusu pacijenata sa mTLE-HS u odnosu na kontrolne ispitanike (Ristić i sar., 2014).

#### 1.3.4. Bakar

Bakar je treći najzastupljeniji prelazni metal u ljudskom organizmu, gde ga ima ukupno oko 100 mg, sa najvećom prosečnom koncentracijom u mozgu od oko 0,1 mM (Que i sar., 2008; Zoroddu i sar., 2019). Esencijalan je za sve biološke sisteme sa aerobnim metabolizmom, u kojima se nalazi u dva glavna oksidaciona stanja: kao nestabilni, redukovani  $\text{Cu}^+$  i stabilniji, oksidovani  $\text{Cu}^{2+}$  jon (Camakaris i sar., 1999; Scheiber i sar., 2013). Zbog svoje elektrofilnosti,  $\text{Cu}^+$  je najefikasniji među jednovalentnim katjonima u građenju kompleksnih jedinjenja sa organskim ligandima, a  $\text{Cu}^{2+}$  među dvovalentnim, što ih čini izuzetno korisnim redoks parom sa potencijalom od +0.2 do +0.8 V (Bleackley i MacGillivray, 2011). Sa ovakvim osobinama, bakar je neophodan i neizostavan kofaktor velikog broja enzima u ključnim biološkim procesima, kao što su oksidativna fosforilacija, transport gvožđa, stvaranje vezivnog tkiva i krvnih sudova, metabolizam mijelina, pigmentacija, uklanjanje slobodnih radikala i metabolizam neurotransmitera (Bund i sar., 2010; Popescu i Nichol, 2011; Crisponi i sar., 2012; Scheiber i sar., 2014). Unos bakra u organizam otpočinje apsorpcijom u enterocitima digestivnog sistema, odatle se putem krvi transportuje u jetru, centralni organ homeostaze ovog metala iz kog će se sistemskom cirkulacijom preneti do svih ostalih tkiva i organa, a višak izlučiti u žuč (Kim i sar., 2008). Bakar je u hepatocitima uglavnom vezan za metalotionein a u perifernoj cirkulaciji za ceruloplazmin, mada ga mogu vezati i albumin, transkuprein i histidin (Gaetke i sar., 2014).

##### 1.3.4.1. Homeostaza u citoplazmi

Zbog svoje redoks aktivnosti i potencijalnog štetnog efekta na integritet ćelije, bakar se u organizmu nikada ne nalazi u slobodnoj jonskoj formi već su njegovo čuvanje, transport i redoks aktivnost strogo regulisani različitim grupama proteina. Postoje barem četiri ovakve

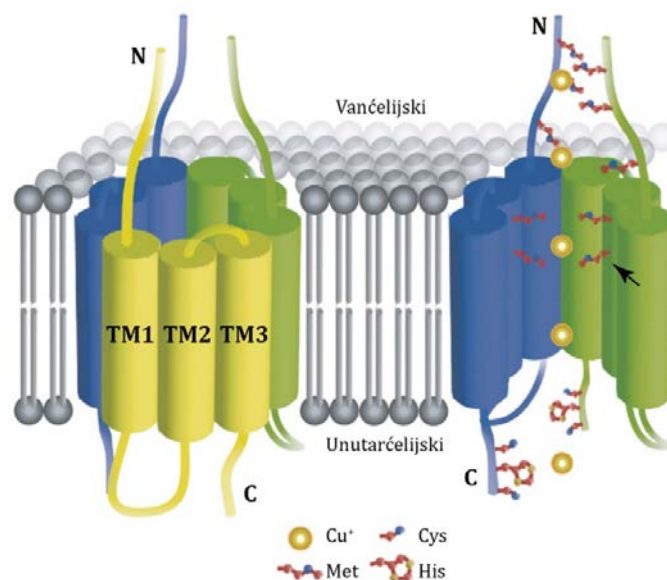
grupe i podrazumevaju: i) integralne membranske proteine za prenos bakra preko ćelijskih membrana; ii) unutarćelijske metalošaperone za transport bakra do ciljnih proteina i enzima; iii) zaštitne proteine za sprečavanje toksičnog nagomilavanja bakra; iv) transkripcione faktore i druge regulatorne proteine koji utiču na ekspresiju i efikasnost svih prethodno navedenih grupa (Rubino i Franz, 2012).

Bakar se u sve ćelije unosi putem membranskih transportnih proteina na tri načina:

1. Kao jednovalentni, redukovani katjon  $\text{Cu}^+$ , pomoću membranskog transportnog proteina SLC31A1 (engl. *solute carrier family 31 member 1*), prethodno označavanog kao protein sa visokim afinitetom za unos bakra (CTR1), što predstavlja glavni način unosa bakra u ćeliju (Lee i sar., 2002; Maryon i sar., 2013);
2. Kao jednovalentni, redukovani katjon  $\text{Cu}^+$ , putem membranskog transportera, proteina SLC11A2 (engl. *solute carrier family 11 member 2*), ranije nazivanog dvovalentni metalni transporter 1 (DMT1) (Collins i sar., 2010);
3. Kao dvovalentni, oksidovani katjon  $\text{Cu}^{2+}$ , preko nekog od članova SLC39 familije transportera (engl. *solute carrier family 39*), označavanih i kao ZIP familije transportera (engl. *Zrt/IRT-like protein*) (Kambe i sar., 2004).

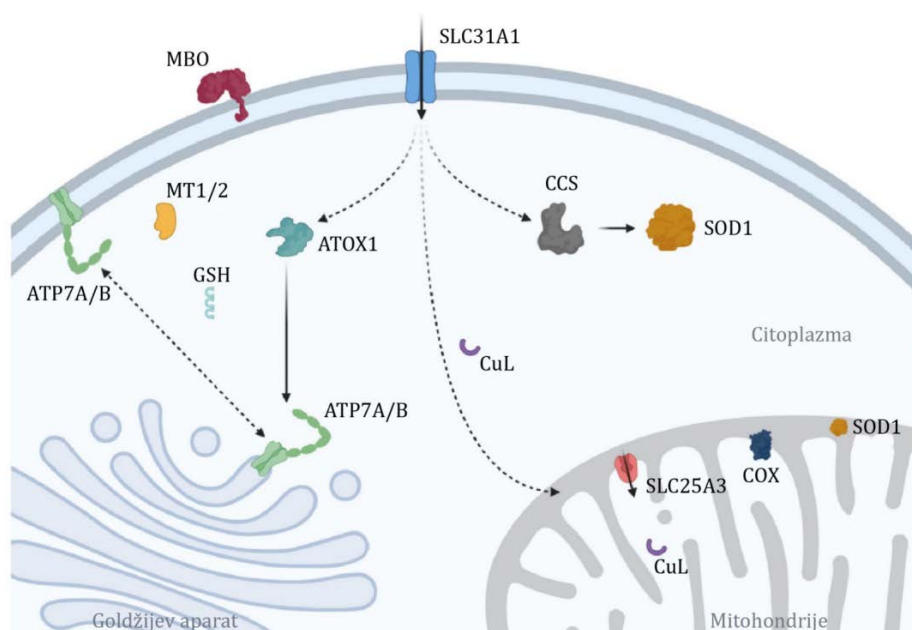
Budući da se dijetarni bakar nalazi u svom oksidovanom obliku kao  $\text{Cu}^{2+}$ , specifičnost glavnih membranskih transportera SLC31A1 i SLC11A2 za unos monovalentnog, redukovanog jona bakra sugeriše prisustvo vanćelijske membranske reduktaze (citohrom b reduktaza 1 ili STEAP2 metaloreduktaza) koja će ovim transporterima obezbediti redukciju bakra do  $\text{Cu}^+$  (Ohgami i sar., 2006; Collins i sar., 2010).

Najveći afinitet za unos bakra pokazuje SLC31A1 sa Mihaelis-Mentenovom  $K_m$  oko 2  $\mu\text{M}$  (Lee i sar., 2002). To je integralni membranski protein sa specifičnom strukturom nalik jonskom kanalu (Ren i sar., 2019) koji poru formira kao homotrimer (slika 1.7) (Nose i sar., 2006). Imunoblotom se detektuje na visini od približno 28 kDa (protomer) ili približno 50 kDa (oligomer) (Eisses i Kaplan, 2002). Svaki protomer poseduje tri transmembranska domena, vanćelijski N-terminalni domen i unutarćelijski C-terminalni domen sa aminokiselinskim ostacima metionina, cisteina i histidina koji su odgovorni za koordinaciono vezivanje i transport  $\text{Cu}^+$  (Nose i sar., 2006; Ren i sar., 2019). SLC31A1 se ponekad u uslovima previsoke koncentracije bakra može brzo internalizovati u endosome mehanizmom endocitoze indukovane ovim metalom, a zatim po potrebi reciklirati na membranu ili označiti za degradaciju proteazomom (Clifford i sar., 2016).



**Slika 1.7. Strukturni i funkcionalni model SLC31A1, transportera za unos bakra u ćeliju.** Svaki protomer je prikazan različitom bojom. Ukupno devet transmembranskih domena (TM) formira poru jonskog kanala. Bakar se primarno vezuje za metionionske ostatke N-terminalnih domena, blizu TM1. U okviru TM2, visoko konzervirani metioninski ostaci formiraju dva sloja metioninskih trijada u vidu dva prstena (strelica) koji su odgovorni za selektivnost kanala za  $\text{Cu}^+$  jon. C-terminalni domeni sa cisteinskim i histidinskim ostacima takođe formiraju mesto vezivanja bakra za interakciju sa metalošaperonima i neku vrstu unutarćelijske kapije. Met, metionin; Cys, cistein; His, histidin. Preuzeto i prilagođeno iz Nose i sar., 2006.

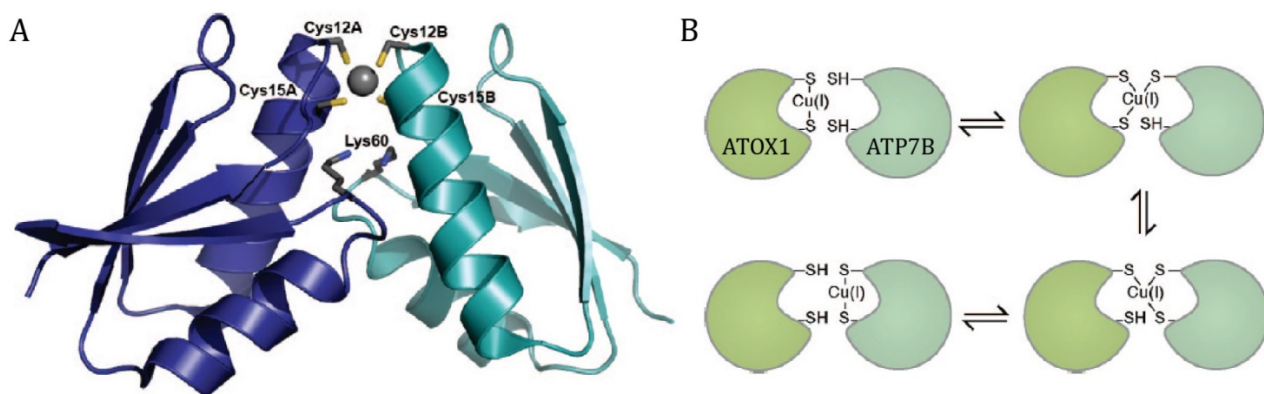
Nakon ulaska u ćeliju posredstvom SLC31A1, postoje tri glavna transportna puta bakra do njegovih funkcionalnih odredišta koji su posredovani specifičnim metalošaperonima (Robinson i Winge, 2010). Shematski prikaz skladištenja bakra u citoplazmi i transporta u ćeliji i van nje, dat je na slici 1.8.



**Slika 1.8. Ćelijski putevi transporta bakra.** Nakon ulaska u ćeliju putem SLC31A1, bakar se transportuje različitim metalošaperonima do mesta ugradnje u proteine ili skladišti u citoplazmi i mitohondrijama. Transporteri: transporter SLC31A1 (engl. *solute carrier family 31 member 1*), alfa/beta ATPaza za transport bakra (ATP7A/B), mitohondrijski transporter SLC25A3 (engl. *solute carrier family 25 member 3*). Metalošaperoni: antioksidativni šaperon bakra 1 (ATOX1), nepoznati ligand za transport bakra (CuL), šaperon bakra za superoksid dismutazu 1 (CCS). Molekuli za čuvanje: CuL, glutation (GSH), metalotioneini (MT1/2). Metaloenzimi: superoksid dismutaza 1 (SOD1), multi-bakarne oksidaze (MBO), citohrom c oksidaza (COX). Preuzeto i prilagođeno iz Cobine i sar., 2021.

Funkcionalna odredišta primarnih transportnih puteva bakra u ćeliji su: i) Goldžijev aparat u kome se Cu ugrađuje u vanćelijske metaloproteine, ii) enzim superoksid dismutaza 1 (SOD1) i iii) mitohondrije u kojima se Cu deponuje i ugrađuje u mitohondrijske metaloproteine (Cobine i sar., 2021). Skladištenje i sekvestriranje bakra u netoksičnom obliku u citosolu odvija se pomoću glutationa i grupe metalotioneina (Santoro i sar., 2020).

Unutarćelijski transport  $\text{Cu}^+$  do Goldžijevog aparata posredovan je antioksidativnim šaperonom bakra 1 (ATOX1). ATOX1 prenosi  $\text{Cu}^+$  do transportnih ATPaza bakra alfa i beta (ATP7A i ATP7B) na trans-Goldži cisternama i vezikulama (Robinson i Winge, 2010). ATOX1 je protein od 68 aminokiselina i potrebna su dva protomera za koordinaciono vezivanje jednog jona  $\text{Cu}^+$  preko tri cisteinska ostatka cisteina i stabilizaciju preko dva lizinska osatatka (slika 1.9A). Dimerizacija posredovana jonom metala leži u osnovi transportnog mehanizma, kao i prepoznavanja partnerskih proteina (slika 1.9B) (Boal i Rosenzweig, 2009).



**Slika 1.9. Shema strukture i funkcije ATOX1 metalošaperona. (A)** Struktura kompleksa  $\text{Cu(I)}$ -ATOX1. Dva protomera ATOX1 su prikazana različitim bojama. Jon bakra je prikazan sivom sferom. **(B)** Predloženi mehanizam prenosa jona bakra od ATOX1 do N-terminusa ATP7B transportera. Cys, cistein; Lys, lizin; ATOX1, antioksidativni šaperon bakra 1; ATP7B, beta ATPaza za transport bakra. Preuzeto i prilagođeno iz Boal i Rosenzweig, 2009.

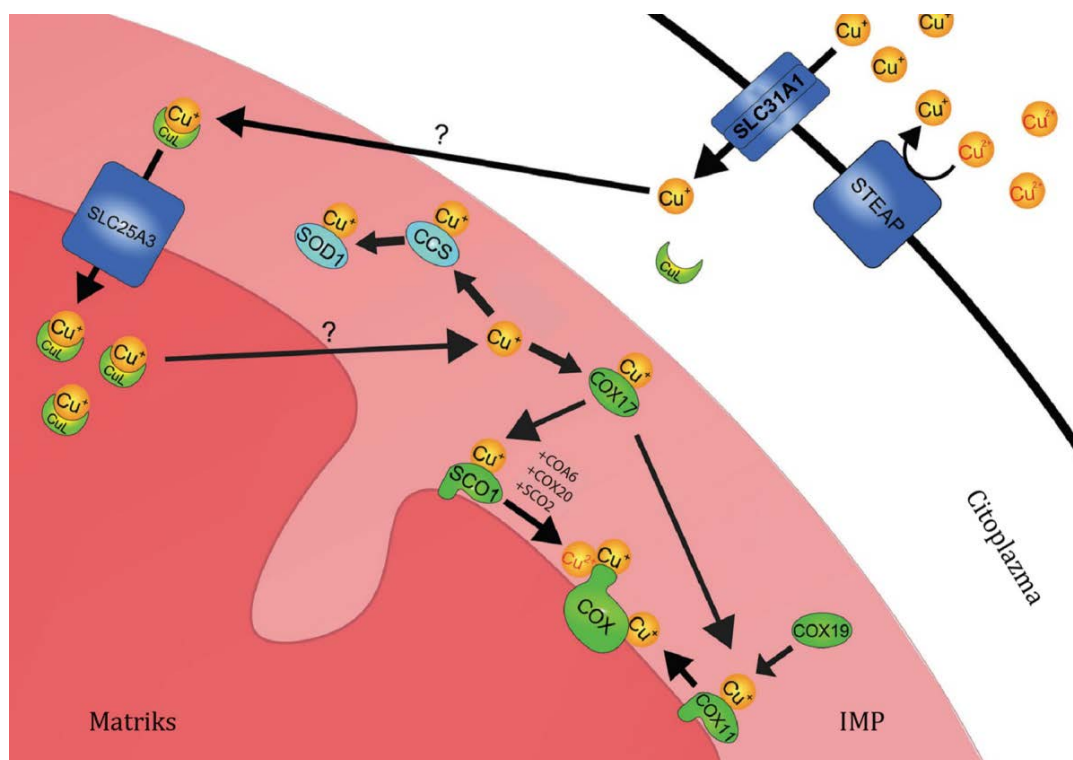
Pored prisustva na membranama cisterni i vezikula Goldžijevog aparata, pumpe za Cu, ATP7A i ATP7B, su su prisutne i na ćelijskoj membrani gde vrše izbacivanje Cu iz citosola (Kim i sar., 2008), što ukazuje na njihovu dvojnju ulogu u ćeliji. Kada se dostigne kritično visoka koncentracija bakra u ćeliji, ATP7A transporter se ugrađuje u ćelijsku membranu kako bi omogućio izbacivanje viška ovog jona (Hartwig i sar., 2019). ATP7A je konstitutivno eksprimiran u svim ćelijama dok je ATP7B u najvećoj meri eksprimiran u ćelijama jetre gde je uključen u izlučivanje bakra u žuč, ali ga u manjoj meri ima i u ćelijama drugih organa poput mozga gde učestvuje u finoj regulaciji ćelijske koncentracije ovog jona (Telianidis i sar., 2013).

S obzirom da Cu ima važnu biološku ulogu kao kofaktor antioksidativnog enzima SOD1, jedan od primarnih transportnih puteva Cu u ćeliji podrazumeva njegov prenos posredstvom šaperona bakra za SOD1 (CCS) od SLC31A1 do SOD1 u čiji se aktivni centar ugrađuje (Boal i Rosenzweig, 2009).

#### 1.3.4.2. Homeostaza u mitohondrijama

Posebno je važan put prenosa bakra iz citosola u mitohondrije kao glavnog mesta skladištenja i regulisanja homeostaze ovog metala u ćeliji (Baker i sar., 2017; Cobine i sar., 2021). Na osnovu dosadašnjih istraživanja kreiran je model koji podrazumeva postojanje koordinacionog kompleksa bakra sa malim (5 kDa proteinskim ili neproteinskim) nepoznatim ligandom ( $\text{CuL}$ ), koji je sposoban da prođe kroz porine spoljašnje mitohondrijske membrane a zatim dostavi bakar do drugih metalošaperona u intermembranskom prostoru (IMP). Dalje, iz

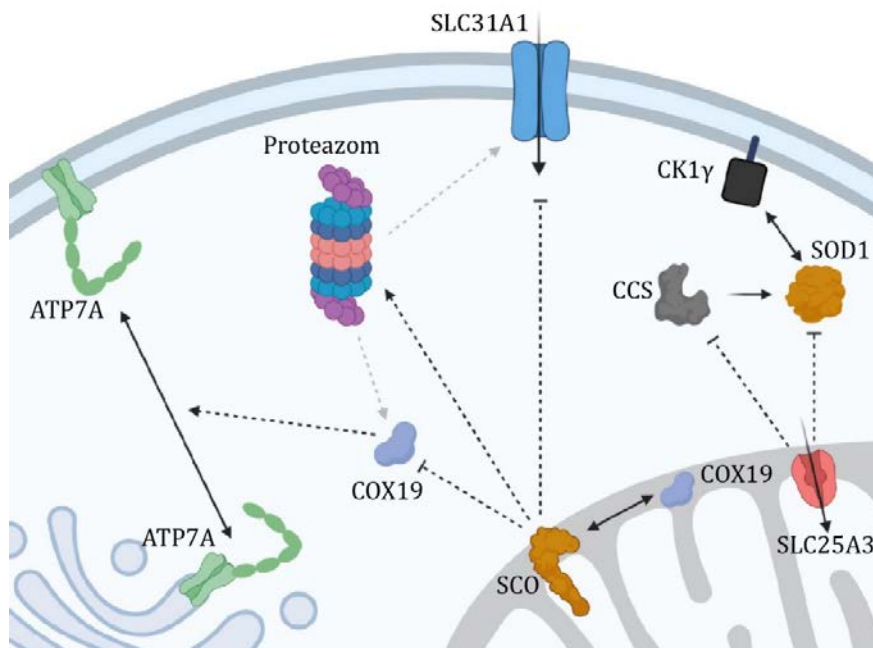
IMP-a Cu prelazi u mitohondrijski matriks posredstvom transportera SLC25A3 (engl. solute carrier family 25 member 3) na unutrašnjoj membrani mitohondrija (Cobine i sar., 2021). Shema unosa i transporta bakra u mitohondrijama data je na slici 1.10.



**Slika 1.10. Proteini koji učestvuju u putevima transporta i skladištenja bakra u mitohondrijama.** Još uvek su nedovoljno poznati mehanizmi unosa bakra u mitohondrije preko njene spoljašnje membrane i izbacivanje bakra iz mitohondrijskog matriksa u IMP. SLC31A1, transporter za bakar SLC31A1; STEAP, membranska reduktaza; CuL, nepoznati ligand za transport bakra; SLC25A3, mitohondrijski transporter bakra; CCS, šaperon bakra za superoksid dismutazu 1; SOD1, superoksid dismutaza 1; COX17, šaperon bakra za citohrom c oksidazu COX17; SCO1, sinteza citohrom c oksidaze 1; SCO2, sinteza citohrom c oksidaze 2; COX20, faktor sklapanja citohrom c oksidaze COX20; COA6, faktor sklapanja citohrom c oksidaze 6; COX, citohrom c oksidaza kompleks; COX11, šaperon bakra za citohrom c oksidazu COX11; COX19, faktor sklapanja citohrom c oksidaze COX19; IMP, intermembranski prostor. Preuzeto i prilagođeno iz Baker i sar., 2017.

Na nivou IMP mitohondrija, Cu se može ugraditi u metaloenzime ili proslediti na deponovanje u mitohondrijski matriks, u zavisnosti od potreba ćelije (Baker i sar., 2017). Skladištenje i čuvanje rezervi omogućeno je ligandom CuL, budući da bi u odsustvu ovakvog proteina nagomilavanje slobodnih jona svojim nespecifičnim interakcijama sa okruženjem brzo dovelo do štetnih posledica i narušilo mitohondrijsku redoks ravnotežu (Brancaccio i sar., 2017). Još uvek nisu potpuno razjašnjeni mehanizmi regulacije „regrutovanja“ bakra iz matriksnog rezervoara u IMP, niti iz mitohondrija u citosol. Ovi mehanizmi su uključeni u regulaciju homeostaze Cu u pomenutim ćelijskim odeljcima a eksperimentima na mutantima u genima za sintezu citohrom c oksidaze 1 i 2 (*SCO1* i *SCO2*) je pokazano da bi to moglo biti preko proteina *SCO1*, *SCO2* i faktora sklapanja citohrom c oksidaze *COX19* (*COX19*) (slika 1.11), s obzirom da se ćelije sa mutiranim *SCO1/2* nalaze u ogromnom Cu deficitu ali su im očuvane mitohondrijske rezerve (Cobine i sar., 2021).

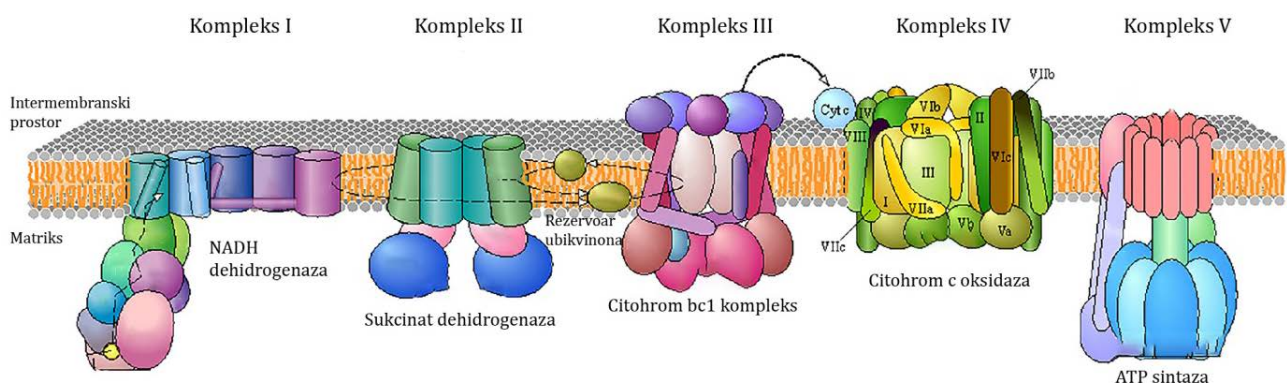




**Slika 1.11. Mitohondrijski signalni putevi za regulaciju ćelijskog nivoa bakra.** Mitohondrije stvaraju i prenose signale kojima regulišu ćelijski unos i izbacivanje bakra, pa time i ukupnu koncentraciju ovog metala. Redoks signalnim putevima, SCO proteini u citoplazmi direktno utiču na položaj i nivo SLC31A1 transportera za unos bakra promovišući njegovu razgradnju ili sprečavajući postavljanje na ćelijsku membranu. Dodatno, signalizacijom preko COX19 vrši se premeštanje dela ATP7A na ćelijsku membranu što omogućava izbacivanje bakra izvan ćelije. Sa druge strane, mitohondrijski nivoi bakra su značajno poremećeni kada se ukloni SLC25A3, što šalje signal za smanjenje aktivnosti i nivoa citoplazmatskog SOD1 i CCS. Pretpostavlja se da bi ovo smanjenje SOD1 moglo da utiče na poznatu vezu između SOD1 i kazein kinaze 1 $\gamma$  (CK1 $\gamma$ ) u regulaciji stope respiracije, SOD1 posredovanom signalizacijom preko nivoa kiseonika i glukoze. Na ovaj način bi deficit bakra u mitohondrijama uticao na prilagođavanje metabolizma glukoze što bi nadomestilo smanjenje stope respiracije (Reddi i Culotta, 2013; Cobine i sar., 2021). Preuzeto i prilagođeno iz Cobine i sar., 2021.

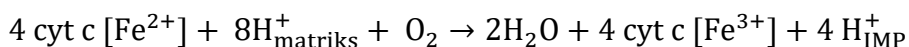
### 1.3.4.3. Kompleks citohrom c oksidaza– metaloenzim bakra

Citohrom c oksidaza (COX), nazivana i kompleks IV, je visoko konzerviran, veliki integralni membranski proteinski kompleks u kristama unutrašnje mitohondrijske membrane kod svih eukariota i u plazma membrani nekih aerobnih prokariota (Little i sar., 2018; Cobine i sar., 2021). Uključen je u oksidativnu fosforilaciju, kao poslednji enzimski kompleks u lancu prenosa elektrona (slika 1.12), koji redoks mehanizmima katalizuje oksidaciju citohroma c (cyt c) i redukciju molekuskog kiseonika uz pomoć jona gvožđa i bakra (Wong-Riley, 1989).



**Slika 1.12. Shema kompleksa enzima u lancu prenosa elektrona i oksidativne fosforilacije.** Vidljive subjedinice citohrom c oksidaze su označene rimskim brojevima u skladu sa nomenklaturom. NADH, redukovani nikotinamid adenin dinukleotid; Cyt c, citohrom c. Preuzeto i prilagođeno iz Kanehisa, 2000.

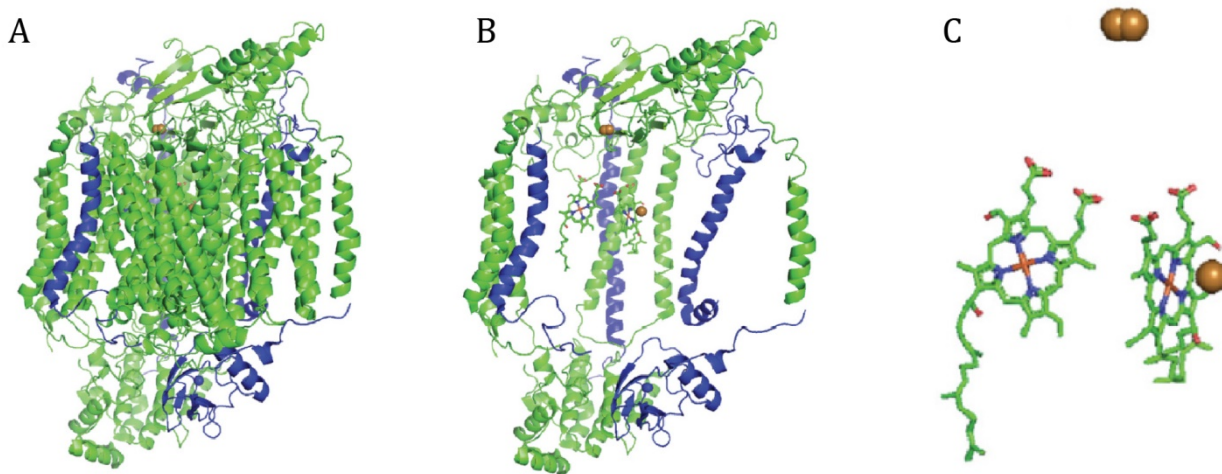
Za redukciju jednog molekula kiseonika, COX mora da dobije četiri elektrona poreklom od četiri molekula cyt c i četiri tzv. skalarna protona iz mitohondrijskog matriksa da bi se formirala dva molekula vode. Ovaj proces je spregnut sa upumpavanjem još četiri tzv. vektorska protona u IMP tako da se za jednu enzimsku reakciju prenese ukupno osam pozitivnih šarži u IMP (Noodleman i sar., 2014):



Ovakvom aktivnošću, COX funkcioniše i kao protonska pumpa koja zajedno sa kompleksima I i III upumpava protone iz mitohondrijskog matriksa u IMP čime doprinosi formiranju elektrohemijskog protonskog gradijenta iskorišćenog za rad kompleksa V (ATP sintaze), rotacionog motora za stvaranje ATP (slika 1.12).

Kristalografske analize<sup>12</sup> pokazuju da je COX homodimer od oko 400 kDa a svaki protomer je izgrađen od 13 subjedinica (slike 1.12 i 1.13) (Stiburek i Zeman, 2010). Novije studije ukazuju da kod čoveka COX u fiziološkim uslovima postoji i kao samostalni monomer od 14 subjedinica ali i kao deo respirazoma<sup>13</sup> (Gu i sar., 2016; Zong i sar., 2018).

Mitohondrijskim genomom su kodirane tri najveće subjedinice koje ujedno i obrazuju katalitičko jezgro enzima (mitohondrijski kodirana citohrom c oksidaza I, II i III (MT-CO1, 2 i 3)) dok je ostalih 11 kodirano jedarnim genomom i ima strukturnu ili regulatornu ulogu (a to su: NDUFA4 (engl. *NDUFA4 mitochondrial complex associated*), citohrom c oksidaza subjedinica 4I1, 5A, 5B, 6A1, 6B1, 6C, 7A2, 7B, 7C i 8A (COX4I1, ..., COX8A) (Zong i sar., 2018; Cobine i sar., 2021). COX katalitičko jezgro enzima sadrži tri redoks aktivna mesta (slika 1.13): i) binuklearno Cu<sub>A</sub> (dva jona bakra) na subjedinici MT-CO2, ii) hem *a* na subjedinici MT-CO1 i iii) binuklearno hem *a*<sub>3</sub>-Cu<sub>B</sub> na subjedinici MT-CO1 (Jett i Leary, 2018). Elektron poreklom od cyt c putuje od Cu<sub>A</sub> mesta preko hem *a* do hem *a*<sub>3</sub>-Cu<sub>B</sub> mesta u kome će se vezani molekul kiseonika redukovati do vode (Jett i Leary, 2018).



**Slika 1.13. Struktura enzima citohrom c oksidaze.** (A) Kompletna struktura protomera od 14 subjedinica. Mitohondrijski kodirane subjedinice su prikazane plavom bojom. (B) Ukonjen deo subjedinica kako bi se istakao položaj hem i Cu kofaktora. (C) Izolovani i uvećani prikaz kofaktora u tri aktivna mesta: binuklearnog Cu<sub>A</sub> (gore), hem *a* (levo) i binuklearnog hem *a*<sub>3</sub>/Cu<sub>B</sub> mesta (desno). Jon bakra je prikazan kao braon sfera. Preuzeto i prilagođeno iz Cobine i sar., 2021.

<sup>12</sup> Istraživano kristalografijom rendgenskim zracima na modelu enzima iz srčanih ćelija govečeta, mada postoje ortologne subjedinice u zavisnosti od tkiva u kome su prisutne a ukupan broj subedinica se razlikuje u biološkim vrstama (Tsukihara i sar., 1996; Sinkler i sar., 2017; Zong i sar., 2018).

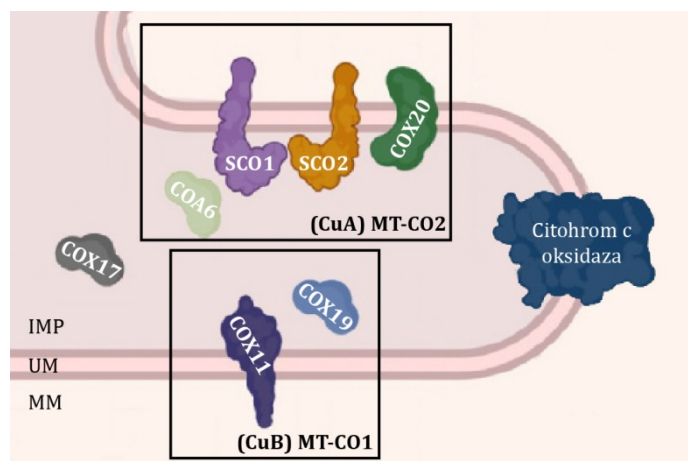
<sup>13</sup> Superkompleks sastavljen od kompleksa I, III i COX monomera.

Biogeneza COX kompleksa podrazumeva učešće preko 30 šaperonskih proteina od kojih barem sedam navedenih u tabeli 1.1 učestvuje u transportu i umetanju jona bakra prilikom formiranja aktivnih mesta  $Cu_A$  i  $Cu_B$  (tabela 1.1; slike 1.10 i 1.14) (Bourens i sar., 2014; Baker i sar., 2017).

**Tabela 1.1. Metalošaperoni i pomoćni proteini za formiranje  $Cu_A$  i  $Cu_B$  aktivnih mesta sa jonima bakra.**

Simbol	Naziv	Aktivno mesto na COX
COX17	Citohrom c oksidaza šaperon bakra COX17	nema
COA6	Faktor sklapanja citohrom c oksidaze 6	$Cu_A$ (MT-CO2)
COX20	Faktor sklapanja citohrom c oksidaze COX20	$Cu_A$ (MT-CO2)
SCO1	Sinteza citohrom c oksidaze 1	$Cu_A$ (MT-CO2)
SCO2	Sinteza citohrom c oksidaze 2	$Cu_A$ (MT-CO2)
COX11	Citohrom c oksidaza šaperon bakra COX11	$Cu_B$ (MT-CO1)
COX19	Faktor sklapanja citohrom c oksidaze COX19	$Cu_B$ (MT-CO1)

Shema transporta bakra za umetanje u COX i ključnih proteina je prikazana na slikama 1.10 i 1.14.



**Slika 1.14. Shematski prikaz ključnih šaperona za sklapanje kompleksa citohrom c oksidaze odgovornih za formiranje aktivnih mesta sa jonom bakra.** IMP, intermembranski prostor; UM, unutrašnja mitohondrijska membrana; MM, mitohondrijski matriks. Preuzeto i prilagođeno iz Cobine i sar., 2021.

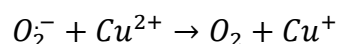
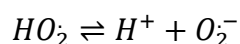
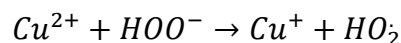
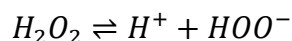
Transport otpočinje vraćanjem bakra iz mitohondrijskog matriksa u IMP preko još uvek nepoznatog membranskog transportera a potom i prihvatanjem pomoću COX17 šaperona koji može vezati do četiri  $Cu^+$  jona (slike 1.10 i 1.14) (Kim i sar., 2008). Ovaj šaperon dalje prenosi jone bakra do SCO1 za ugradnju u  $Cu_A$  mesto u MT-CO2 ili do COX11 za ugradnju u  $Cu_B$  mesto u MT-CO1 (Jett i Leary, 2018). Sazrevanje  $Cu_A$  zahteva pored SCO1 učešće još barem tri proteina: SCO2, COX20 i COA6, koji redoks interakcijama omogućavaju umetanje jona (Bourens i sar., 2014). Sazrevanje  $Cu_B$  mesta podrazumeva i učešće faktora COX19 koji redukuje COX11 i omogućava mu da veže bakar (Boulet i sar., 2018).

#### 1.3.4.4. Poremećena homeostaza bakra u nervnom sistemu

Homeostaza nivoa bakra se mora držati pod strogom kontrolom jer su i povišene i smanjene koncentracije kritične i opasne. Povećan unos bakra u organizam sam po sebi ne predstavlja glavni uzrok njegove toksičnosti već se to manifestuje narušenim homeostatskim mehanizmima u pogledu ćelijskog unosa, transporta, skladištenja i izbacivanja jona (Bost i sar., 2016). Nekoliko poremećaja je, do sada, jasno povezano sa izmenjenim metabolizmom bakra: Menkesova bolest, Vilsonova bolest, Alchajmerova bolest i Parkinsonova bolest (Zoroddu i sar., 2019). Druge, manje učestale bolesti, kod kojih je nedostatak ovog metala

verovatno uključen u patofiziološku sliku su izolovana periferna neuropatija, bolest motornih neurona, miopatija, cerebralna demijelinizacija, kognitivna disfunkcija i optička neuropatija (Jaiser i Winston, 2010; Altarelli i sar., 2019).

Joni bakra koji se nalaze u patološki visokoj koncentraciji pored toga što mogu istisnuti manje kompetitivne jone (cink i gvožđe) iz svojih aktivnih mesta u metaloproteinima i time narušiti njihovu fiziološku funkciju, dovode i do povećanog stvaranja slobodnih radikala, u prisustvu vodonik-peroksida i superoksid anjon-radikala, kroz reakcije slične Fentonovoj (Spasojević i sar., 2010; Pham i sar., 2013; Zoroddu i sar., 2019):



Patološki visoke koncentracije bakra povezane su sa Vilsonovom bolešću (VB). VB je prvi put opisana 1912. godine kroz seriju slučajeva progresivne neurološke disfunkcije spregnute sa cirozom jetre, koji su se završavali smrću (Mulligan i Bronstein, 2020). To je autozomalno recesivno nasledno oboljenje, sa preko 500 do sada opisanih različitih vrsta mutacija u *ATP7B*, od tačkastih mutacija preko malih brisanja ili umetanja do brisanja celog egzona, koje rezultuju toksičnim nakupljanjem bakra u hepatocitima (Bandmann i sar., 2015). Ovo nakupljanje vodi do povećanog oksidativnog oštećenja ćelija jetre i njene nekroze, otpuštanja velike koncentracije bakra u krvotok i štetnog nagomilavanja bakra u svim tkivima uključujući i CNS i bazalne ganglije (Popescu i Nichol, 2011). Simptomi su vrlo raznovrsni, mogu biti prisutni pojedinačno ili kombinovano, a uključuju tremor, nevoljne pokrete, parkinsonizam, retke epileptične napade, cirozu jetre, depresiju, anksioznost, kognitivne promene i mnoge druge (Mulligan i Bronstein, 2020). Postoje različite procene učestalosti VB i iznose oko 1 u 3000–7000 (Bandmann i sar., 2015). Ova bolest je jedna od retkih za koju se uspešnom pokazala terapija helatorima kao što su d-penicilamin, trientin ili amonijum tetrahidromolibdat (Bolognin i sar., 2009; Popescu i Nichol, 2011; Mulligan i Bronstein, 2020).

Bolest koja je dovedena u vezu sa opštim deficitom bakra naziva se Menkesova bolest (MB) i predstavlja redak, nasledni, recesivni poremećaj vezan za X hromozom, sa mutacijama u *ATP7A*, koje posledično dovode do remećenja transporta bakra iz digestivnog sistema u krvotok pa i deficita ovog metala u mozgu (Scheiber i sar., 2014). Klinička slika MB uključuje rane poremećaje u razvoju već u drugom ili trećem mesecu života, karakterističnu „čupavu“ kosu, hipotoniju, epileptične napade i sveopšti zastoj u napretku (Madsen i Gitlin, 2007; Bandmann i sar., 2015). Gubitak funkcije *ATP7A* kod MoBr soja miša potvrdilo je značaj bakra u sinaptogenezi i razvoju aksona, a MRI snimci kod ljudi su pokazali promene u beloj masi mozga i poremećenu mijelinizaciju, difuznu moždanu atrofiju, uvećavanje moždanih komora (ventrikulomegaliju) i vijuganje (tortuoзит) vaskulature mozga (Bandmann i sar., 2015). Glavni problem koji najverovatnije leži u osnovi ovih patologija je nedostupnost bakra kao kofaktora za metaloenzime, prvenstveno COX, ali i uloga bakra u regulaciji neuronske aktivnosti preko glutamatnog NMDA receptora (čiji je bakar nekompetitivni antagonist) čijom se aktivacijom pokreće brz i reverzibilni transport *ATP7A*, a time i kontrola nivoa ovog metala (Madsen i Gitlin, 2007; Desai i Kaler, 2008).

Evidentna je i kontroverzna uloga bakra u patologiji Alchajmerove bolesti (AB) i Parkinsonove bolesti (PB), gde toksično visoka kao i nedovoljna koncentracija bakra učestvuje u procesu neurodegeneracije (Rivera-Mancía i sar., 2010; Gromadzka i sar., 2020). Visoke

koncentracije bakra su pronađene u amiloidnim plakama, serumu i nervnom tkivu pacijenata obolelih od AB (Hordyjewska i sar., 2014; Li i sar., 2017). Dodatno, objašnjeno je da bakar direktno interaguje sa amiloid prekursorom proteinom dovodi do njegove povećane dimerizacije i produkcije  $\beta$  amiloida kao i pojačanog oksidativnog stresa (Noda i sar., 2013; Gaetke i sar., 2014). Sa druge strane, utvrđen je manjak bakra u hipokampusu pacijenata obolelih od AB (Deibel i sar., 1996). Prema ovome, bakar igra važnu dvostruku ulogu u patologiji AB kroz mehanizme izazivanja toksičnog nagomilavanja  $\beta$  amiloida sa jedne strane i smanjene dostupnosti za potrebe neurona sa druge (Choo i sar., 2013). Molekularni mehanizmi poremećene homeostaze bakra u PB uključuju promotersku ulogu (čak i niskih koncentracija) ovog metala u formiranju fibrila  $\alpha$ -sinukleina, zatim, sposobnost bakra da veže ostatke cisteina na proteinima, umešanost u stvaranje oksidativnog stresa i izazivanje oksidacije dopamina, posebno uz prisustvo  $\alpha$ -sinukleina (Gromadzka i sar., 2020). Zanimljivo je, sa druge strane, da bakar u PB može imati neuroprotektivnu ulogu kroz uticaj na transport gvožđa, tako što smanjuje unos gvožđa kroz DMT1 (Rivera-Mancía i sar., 2010).

Pored toga, smanjeni unos bakra tokom razvojnog perioda utiče na rad enzima zavisnih od ovog metala što takođe dovodi do povećanja oksidativnog stresa, smanjene dostupnosti azot-oksida, izmenjenog metabolizma gvožđa, narušavanja veza u vanćelijskom matriksu i poremećene ćelijske signalizacije (Bleackley i MacGillivray, 2011).

Bakar, pored neurodegenerativnih bolesti, može igrati ključnu ulogu i u patogenezi nastanka epileptičnih napada i epilepsiji zbog svog uticaja na sinaptogenezu, jonske kanale, lipidnu peroksidaciju i metabolizam nekih neurotransmitera (Saghazadeh i sar., 2015). Ova uloga bakra, tačnije, deficita bakra, već je uočena i opisana kod Menkesove bolesti (Madsen i Gitlin, 2007; Bandmann i sar., 2015). Kod epilepsija, metaanaliza 60 studija pratila je koncentracije bakra u serumu i kosi pacijenata sa epilepsijom koji su uzimali jedan ili više lekova protiv napada, pacijenata sa febrilnim konvulzijama i kontrolnih individua. Pokazalo se da je koncentracija Cu u serumu u obe grupe pacijenata bila povećana u odnosu na kontrolne subjekte. Dodatno, koncentracije bakra u serumu pacijenata obolelih od epilepsije na terapiji sa više lekova bila je veća u odnosu na pacijente na terapiji jednim lekom. Koncentracija bakra u kosi bila je statistički manja kod epileptičnih pacijenata nego kod kontrolnih subjekata (Saghazadeh i sar., 2015). Ispitivanja hipokampusu pacijenata obolelih od mTLE-HS ukazala su na značajno smanjenu koncentraciju bakra u ovim strukturama u odnosu na kontrolne vrednosti (Ristić i sar., 2014).

S obzirom na sve navedeno, određivanje količine, pa i raspodele metala u mozgu i nervnom tkivu je od suštinske važnosti.

## 1.4. Bio-oslikavanje metala u nervnom tkivu

Oslikavanje (engl. *imaging*) metala dobija sve veću pažnju u naučnim istraživanjima budući da informacije o lokalnoj distribuciji ovih hemijskih elemenata mogu biti važne za razumevanje procesa u ćeliji koji leže u osnovi patofizioloških mehanizama nastanka mnogih bolesti (Ackerman i sar., 2016). Merenje sadržaja i raspodele metala moguće je zahvaljujući razvoju mnogobrojnih analitičkih metoda i tehnika oslikavanja, prikazanih u tabeli 1.2 (Stewart, 2019).

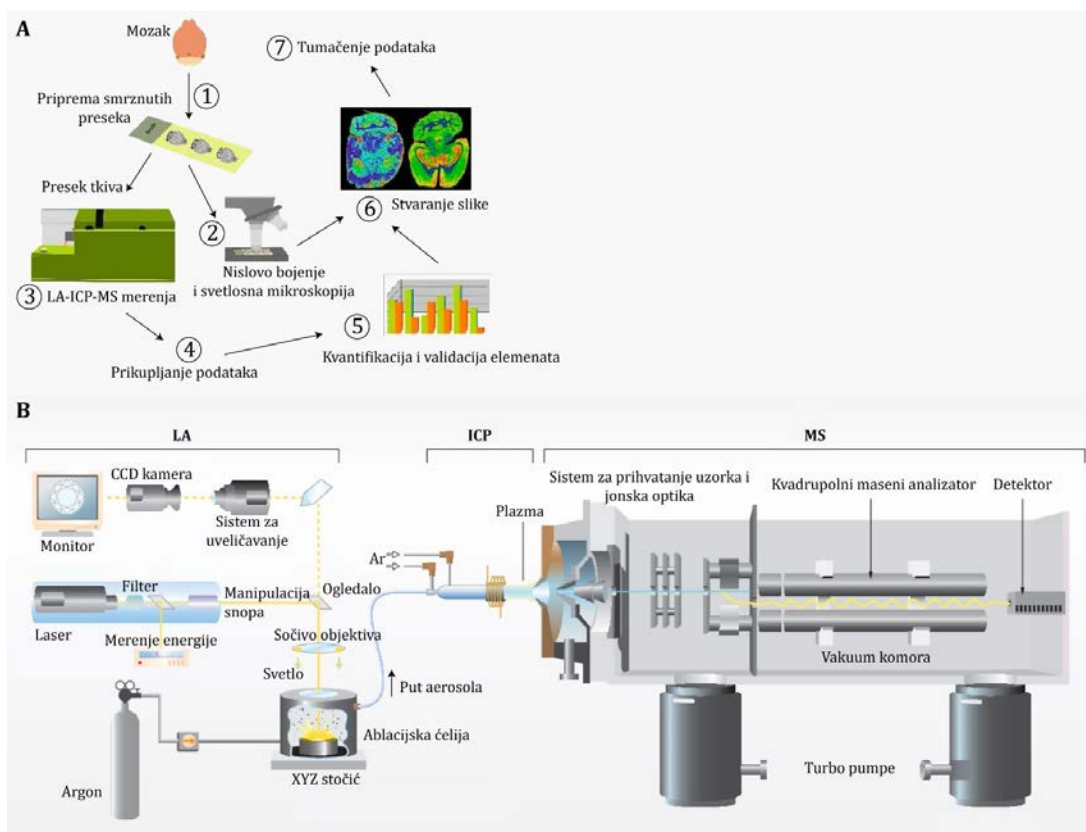
Tabela 1.2. Uporedni prikaz analitičkih metoda sa njihovim ograničenjima, prostornim i vremenskim rezolucijama i stukturim kontekstom.

Tip	Naziv	Nivo	Granica detekcije	Prostorna rezolucija	Vremenska rezolucija	Strukturni kontekst
1	EPRI	org.	1 – 2 torr pO <sub>2</sub>	1 mm	60 s	/
	MRI	org.	mM	< 1 mm	< 1 s	3D anatomska struktura
	FTIR	tk./ćel.	zavisno od uzorka <sup>a</sup>	< 20 nm, 10 μm	/ <sup>e</sup>	molekularni otisak
	RS	tk./ćel.	zavisno od uzorka <sup>a</sup>	< 1 μm	uživo	molekularni otisak
	CLSM	tk./ćel.	zavisno od probe <sup>b</sup>	250 nm	uživo	2D/3D subćelijska struktura
	SRM	ćel.	molekul	< 100 nm	uživo	2D/3D subćelijska struktura
	Krio-SXT	ćel.	/	25 – 40 nm	/	3D subćelijska struktura
	STXM	ćel.	1000 μg/g	10 – 50 nm	/	slika transmisije rendgen. zraka
	SXRF	org./tk./ćel.	0,1 – 1 μg/g	20 – 50 nm	/	/
	nano / μ-XAS	tk./ćel.	100 μg/g	20 – 50 nm	/	/
	Ptihografija	tk./ćel.	/	3 nm	uživo	2D subćelijska struktura
	CT	org.	mM	0,5 mm	< 1 s	3D subćelijska struktura
	PET	org.	pM	0,5 mm <sup>d</sup>	1 -10 s	/
	2	LA-ICP-MS	tk./ćel.	0,01 μg/g	1 – 150 μm	/
LA-ICP-TOFMS		tk./ćel.	0,1 μg/g	1 – 150 μm	/	/
TOF-SIMS		tk./ćel.	0,1 μg/g	250 nm	/	molekularno okruženje
NanoSIMS		ćel.	0,1 μg/g	50 nm (-), 200 nm (+)	/	/
MALDI-MSI		tk.	250 amol – 1 fmol	5 – 50 μm	/	molekularna identifikacija
3		EM-EDS	ćel.	100 – 1000 μg/g	30 – 500 nm	/
	EM-EELS	ćel.	1000 μg/g	< 1 nm	/	2D subćelijska struktura
	PIXE	tk./ćel.	1 – 10 μg/g	0,2 – 2 μm	/	/

Tip 1: metode koje se oslanjaju na neki od delova elektromagnetnog spektra. Tip 2: metode masene spektrometrije. Tip 3: metode zasnovane na snopovima čestica. EPRI, oslikavanje elektron paramagnetnom rezonancijom (engl. *electron paramagnetic resonance imaging*); MRI, oslikavanje magnetnom rezonancijom (engl. *magnetic resonance imaging*); FTIR, infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (engl. *Fourier transform infrared*); RS, ramanska spektroskopija; CLSM, laserska skenirajuća konfokalna mikroskopija (engl. *confocal laser scanning microscopy*); SRM, super rezoluciona mikroskopija; SXT, tomografija slabim rendgenskim zracima (engl. *soft X-ray tomography*); STXM, skenirajuća transmisiona mikroskopija rendgenskim zracima (engl. *scanning transmission X-ray microscopy*); SXRF, sinhrotronska fluorescentna mikroskopija rendgenskim zracima (engl. *synchrotron X-ray fluorescence microscopy*); XAS, apsorpciona spektroskopija rendgenskim zracima (engl. *X-ray absorption spectroscopy*); CT, kompjuterizovana tomografija (engl. *computed tomography*); PET, pozitron emisiona tomografija; LA, laserska ablacija; ICP, induktivno spregnuta plazma (engl. *inductively coupled plasma*); MS, masena spektrometrija; TOFMS, masena spektrometrija sa analizatorom koji razdvaja na osnovu vremena preleta (engl. *time-of-flight mass spectrometry*); TOF, analizator sa vremenom preleta (engl. *time-of-flight*); SIMS, masena spektrometrija sa sekundarnim jonima (engl. *secondary ion mass spectrometry*); MALDI, laserska desorpcija/ionizacija potpomognuta matricom (engl. *matrix assisted laser desorption/ionisation*);

MSI, oslikavanje masenom spektrometrijom (engl. *mass spectrometry imaging*); EM, elektronska mikroskopija; EDS, spektroskopija disperzije energije (engl. *energy-dispersive spectroscopy*); EELS, spektroskopija gubitka energije elektrona (engl. *electron-energy loss spectroscopy*); PIXE, emisija rendgenskih zraka indukovana česticama (engl. *particle-induced X-ray emission*); org, organizam; tk, tkivo; ćel, ćelija; **a** Granica detekcije za FTIR i ramansku spektroskopiju zavisi od koncentracije, debljine uzorka i pozadinskog šuma. **b** Granica detekcije zavisi od specifičnosti i selektivnosti senzora ili probe koja se upotrebljava. **c** Rezolucija je 0,5 cm kod ljudi 0,5 mm kod ostalih životinja. **d** Obično se izvodi na fiksiranim uzorcima usled ometanja zbog vode ali je uživo oslikavanje ćelija moguće u sinhrotronima koji koriste D2O. **e** Pri dovoljno visokoj aktivnosti moguće je smanjiti brzinu na manje od 1 s. Preuzeto i prilagođeno iz Stewart, 2019.

Tematika koja predstavlja izazov na polju nauka o živim sistemima je opisivanje i ispitivanje distribucije esencijalnih i toksičnih metala u nervnom tkivu, i u tom cilju je moguće primeniti više navedenih metoda (Becker i sar., 2010; Stewart, 2019; Witt i sar., 2020). Poslednjih godina se za ovakvu vrstu ispitivanja sve više izdvaja i koristi jedna od složenih metoda oslikavanja masenom spektrometrijom koja je nazvana laserska ablacija spregnuta sa induktivno kuplovanom plazmom i masenom spektrometrijom (engl. *laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, LA-ICP-MS*) (Becker i sar., 2010; Martinez i Baudalet, 2019). Celokupan proces rada pri korišćenju LA-ICP-MS, od pripreme uzorka do interpretacije rezultata, i složena instrumentalna postavka, shematski su prikazani na slici 1.15.



**Slika 1.15. Shematski prikaz LA-ICP-MS metodologije u ispitivanju nervnog tkiva. (A)** Uprošćeni prikaz procesa rada koji podrazumeva (1) pripremu kriopreseka od uzorka tkiva, (2) histološka bojenja i analizu svetlosnom mikroskopijom, (3) ablaciju i merenje sadržaja elemenata, (4) prikupljanje podataka o količini elemenata u svakoj ablaciranoj tački, (5) kalibraciju i izračunavanje apsolutnih koncentracija elemenata, (6) sastavljanje mapa i uporednu histološku analizu i (7) tumačenje dobijenih mapa i rezultata. **(B)** Postavka i komponente sistema LA-ICP-MS. Presek tkiva se postavlja na pokretni stočić u ablacijsku ćeliju i laserski snop se fokusira na deo uzorka pomoću CCD kamere, koja omogućava posmatranje i određivanje regiona za ablaciju. Stvoreni aerosol uzorka se nosećim gasom (argon) prenosi do sistema ICP-MS, gde se čestice jonizuju a zatim se joni vakuumski usisavaju i sprovode do masenog analizatora gde se razdvajaju na osnovu odnosa mase i naelektrisanja i konačno detektuju. LA, laserska ablacija; ICP, induktivno spregnuta plazma (engl. *inductively coupled plasma*); MS, masena spektrometrija. Preuzeto i prilagođeno iz Weiskirchen i sar., 2019 (A) i Abduriyim i Kitawaki, 2006 (B).

Osnovni princip podrazumeva da se površina uzorka tačku po tačku odstranjuje (ablira) laserom i ispituje sastav u pogledu hemijskih elemenata. ICP-MS je dobro poznata analitička tehnika koja omogućava multi-elementarna, izotopska i kvantitativna ispitivanja, sa prilično dobrim linearnim odgovorom i velikom osetljivošću uz limit detekcije od oko ng/l (Dressler i sar., 2018).

Sprega sa LA omogućava direktnu analizu čvrstih uzoraka i tkiva pri čemu se dobija ne samo kvantitativni sastav već i prostorno dvodimenzionalno, pa čak i trodimenzionalno mapiranje i raspodela većeg broja elemenata (Becker, 2013; van Elteren i sar., 2019). Ovo se postiže postavljanjem uzorka (preseka) intaktnog tkiva na predmetno staklo u komoru za lasersko abliranje gde se razara energijom fotona pri fokusiranom pulsnom delovanju lasera, pod atmosferskim pritiskom pri čemu se uzorak prevodi u aerosol. Stalni protok inertnog nosećeg gasa (najčešće argona ili helijuma) prenosi dobijeni aerosol uzorka do dela sistema za jonizaciju i analizu u pogledu elementarnog sastava (ICP-MS). Konačno oslikavanje relativne raspodele se postiže plotovanjem intenziteta dobijenih signala svake abkirane tačke uzorka (Dressler i sar., 2018; Witt i sar., 2020). Dobijanje kalibracionih pravi je predstavljalo izazov zbog fizikohemijskih svojstava smesa korišćenih u tu svrhu, međutim danas je to prevaziđeno upotrebom želatina (Šala i sar., 2017).

Prostorna rezolucija pri korišćenju LA-ICP-MS iznosi od 10 do 200  $\mu\text{m}$  za nanosekundne lasere, dok sa femptosekundnim laserima rezolucija može biti i nanometarska sa malim količinama uništenog tkiva (fg ili pg). Ovakav tip ablacije čini LA-ICP-MS metodu kvazi-nerazarajućom jer uklanja tanak površinski deo uzorka (Dressler i sar., 2018). Visoka osetljivost i vrlo niska granica detekcije metala, metaloida i nemetala čini ovu metodu atraktivnom za mapiranje elemenata u biološkim tkivima. Kada je reč o ćelijskom i subćelijskom nivou detekcije, ograničenja postoje i neophodna je specijalna laserska optika koja bi značajnije unapredila prostornu rezoluciju i svela je na veličine nanometara (Witt i sar., 2020).

Danas je u analizi metaloma CNS-a načinjen značajan doprinos mnogobrojnim studijama. Razvoj senzora za detekciju metala pomoću oslikavanja magnetnom rezonancijom otvorilo je mogućnost *in vivo* praćenja i mapiranja kalcijuma i cinka (Allouche-Arnou i sar., 2017). Pored ove metode, konfokalna mikroskopija je takođe uspešno iskorišćena metoda za praćenje kalcijuma i cinka upotrebom specijalnih senzora ovih metala (Carter i sar., 2014). Elektronska tomografija je uspešno iskorišćena u stvaranju trodimenzionalnih mapa gvožđa u feritinu u degenerativnim neuronima miša (Zhang i sar., 2005). Upotreba rendgenskog zračenja u mnogobrojnim metodama oslikavanja dala je takođe ogroman doprinos razumevanju metaloma. Evidentirana je heterogena distribucija gvožđa, cinka i bakra u kori prednjeg mozga, talamusu i hipokampusu pacova, korišćenjem  $\mu\text{XRF}$  metode (Serpa i sar., 2008), a pokazano je i blago povećanje nivoa bakra, gvožđa, cinka i kalcijuma u mišjem modelu Alchajmerove bolesti, upotrebom  $\mu\text{XRF}$  i XANES metoda (Wang i sar., 2012). Rendgensko oslikavanje otkrilo je kolokalizovane depozite bakra i cinka sa  $\beta$  amiloidnim depozitima (Miller i sar., 2006) a analize pojedinačnih neurona crne supstance pomoću SXRF i PIXE metoda otkrile su smanjene količine bakra kod Parkinsonove bolesti (Davies i sar., 2014).

Humani sklerotični hipokampus je dospao u fokus analize Beker i sar. gde je upotrebom metoda oslikavanja masenom spektrometrijom (LA-ICP-MS) pokazana prostorna distribucija metala (Becker i sar., 2005; 2010; Becker, 2013). Međutim, osim oslikavanja i utvrđivanja ukupne količine metala, do danas ovi nalazi nisu dovedeni u vezu i razmatrani u kontekstu patologije mTLE a naročito HS, glavne patohistološke komponente ovog epileptičnog sindroma. Postoje mnoge prednosti u radu sa uzorcima humanih sklerotičnih hipokampusu zbog kojih su upotrebljeni za analizu metaloma. Dobijaju se hirurškim putem u



vrlo dobro kontrolisanim uslovima, što ih čini bliskim svom nativnom fiziološkom stanju u odnosu na *post mortem* uzorke. Na ovaj način se dobija kvalitetno tkivo hipokampusa koje je momentalno zamrznuto, nefiksirano i nije veštački kontaminirano metalima (Baščarević, 2014; Ristić i sar., 2014; Ristić i sar., 2015).

Analizu ukupnog sadržaja Fe, Zn, Mn i Cu u tkivnim izolatima humanog sklerotičnog hipokampusa sprovedli su i Ristić i sar. upotrebom optičke emisione spektrometrije sa induktivno spregnutom plazmom (engl. *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*, ICP-OES). Studija je obuhvatila 24 uzorka mTLE-HS pacijenata i 17 kontrolnih hipokampusa. Nisu bile uočene značajne razlike u ukupnim koncentracijama gvožđa i cinka, dok je otkriven značajno umanjeno sadržaj bakra i mangana, u odnosu na kontrolne uzorke (Ristić i sar., 2014). Nalazi su ukazali na potrebu za detaljnijim ispitivanjem i prelaskom sa čitave strukture hipokampusa na specifične regione i slojeve. Ovo je bilo upravo moguće primenom metode LA-ICP-MS i dobijanjem „metalnog otisaka“ sklerotičnog hipokampusa – centralne patofiziološke komponente mTLE. Preliminarni rezultati, koji su deo ove doktorske disertacije, ukazali su da je od ova četiri metala, bakar bio značajno smanjen u diskretnim sklerotičnim zonama hipokampusa u odnosu na rezistentne regione, te je upravo najveći fokus ove doktorske disertacije na metabolizmu ovog elementa.

## II. Poglavlje

---

### CILJEVI

Kako se mTLE-HS odlikuje smanjenjem u koncentraciji bakra u sklerotičnom hipokampusu i s obzirom da je narušen metabolizam bakra kod čoveka praćen pojavom epileptičnih napada, **opšti naučni cilj ove doktorske disertacije je bio da se otkrije uzrok smanjenog nivoa bakra u sklerotičnom hipokampusu pacijenata obolelih od mTLE-HS.** S tim u vezi, definisani su sledeći ciljevi:

- Ispitati histološku distribuciju i kvantitativne promene u količini bakra u regionima i slojevima sklerotičnih hipokampusa pacijenata sa mTLE-HS sa izraženim (HS1) i lokalizovanim nivoom skleroze (HS2).
- Ispitati vezu između distribucije bakra i gustine neurona u regionu sklerotičnog hipokampusa koji je najosetljiviji na sklerozu (CA1) i regionu koji je rezistentan na sklerozu i gliozu (SUB).
- Istovremeno sa bakrom ispitati histološku distribuciju gvoždja, cinka i mangana i utvrditi kako uočene promene u koncentracijama ovih metala na anatomskom nivou regiona i slojeva odgovaraju zabeleženim promenama u čitavom sklerotičnom hipokampusu.
- Ispitati kvantitativne promene u proteinskom nivou članova transportne mašinerije za unos bakra u ćeliju (SLC31A1), njegovu dostavu do ćelijskih organela (ATOX1 za Goldžijev aparat i COX17 za mitohondrije) i šaperona za umetanje u COX enzimski kompleks (COX17 i COX11) u sklerotičnim hipokampusima pacijenata sa mTLE-HS i odgovarajućim kontrolnim uzorcima.
- Korelisati gustinu piramidálnih neurona, distribuciju bakra i aktivnost COX enzimskog kompleksa u regionima i slojevima sklerotičnih hipokampusa pacijenata sa mTLE-HS i odgovarajućim kontrolnim uzorcima.

### III. Poglavlje

## MATERIJAL I METODE

### 3.1. Supstance, rastvori, smese i puferi

Pregled svih smesa, reagenasa i čistih supstanci korišćenih u eksperimentima prilikom sprovođenja ovog istraživanja dat je u tabelama 3.1 – 3.3. Sve supstance su bile analitičkog ili višeg stepena čistoće. Opšte prihvaćeni međunarodni nazivi i skraćenice na stranim jezicima su dodatno naznačeni za odgovarajuće supstance.

**Tabela 3.1. Spisak korišćenih supstanci i njihovih proizvođača.**

Naziv	Formula/skraćenica	Proizvođač
akrilamid	AA	Sigma Aldrich, Nemačka
amonijum-nikl(ii)-sulfat heksahidrat	$(\text{NH}_4)_2\text{Ni}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Sigma Aldrich, Nemačka
albumin iz seruma govečeta	BSA	SERVA, Nemačka
amonijum-persulfat	APS	Lach-Ner, Češka
bisakrilamid	bisAA	Sigma Aldrich, Nemačka
1,4-bis-2-(5-feniloksazolil)-benzen	POPOP	Sigma Aldrich, Nemačka
bromfenol plavo	BPB	Sigma Aldrich, Nemačka
citohrom c	Cyt c	Sigma Aldrich, Nemačka
dekstran „Sephadex G-50“	Sephadex G-50	Sigma Aldrich, Nemačka
dekstran-sulfat		Sigma Aldrich, Nemačka
Denhartov rastvor, 100 puta koncentrovan	DR	Sigma Aldrich, Nemačka
dezoksiadenozin-5'-( $\alpha$ -tio)-trifosfat, [ $^{35}\text{S}$ ]-	5'-[ $\alpha$ - $^{35}\text{S}$ ]dATP	Promega, SAD
3,3'-diaminobenzidin	DAB	Sigma Aldrich, Nemačka
3,3'-diaminobenzidin supstrat za HRP	DAB-supstrat	Dako, Danska
dietil-pirokarbonat	DEPC	Sigma Aldrich, Nemačka
2,5-difeniloksazol	POP	Sigma Aldrich, Nemačka
dimetil-benzen, smesa o-, m- i p- izomera	ksilen, ksilol	Zorka Pharma, Srbija
dimetil-sulfoksid	DMSO	SERVA, Nemačka
dinatrijum- etilendiamintetraacetat	$\text{Na}_2\text{EDTA}$	Sigma Aldrich, Nemačka
dinatrijum-fosfat	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	Sigma Aldrich, Nemačka
ditiotreitol	DTT	Sigma Aldrich, Nemačka
DNK-nukleotidilegzotransferaza	DNTT	Promega, SAD
DNK sperme lososa	SSDNA	Sigma Aldrich, Nemačka
etanol, apsolutni	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ , EtOH	Sigma Aldrich, Nemačka
formamid		Sigma Aldrich, Nemačka
heparin		Sigma Aldrich, Nemačka
hlorovodonična kiselina, 37%	HCl	Zorka Pharma, Srbija
kalijum-dihidrogenfosfat	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Sigma Aldrich, Nemačka
kalijum-hlorid	KCl	Sigma Aldrich, Nemačka
katalaza	CAT	Sigma Aldrich, Nemačka
kobalt-hlorid	$\text{CoCl}_2$	Sigma Aldrich, Nemačka
koktel proteaznih inhibitora	KPI	Sigma Aldrich, Nemačka
krezil ljubičasto	CV	Sigma Aldrich, Nemačka
p-kumarinska kiselina		Sigma Aldrich, Nemačka
Kumasi plavo R-250	CBB	SERVA, Nemačka
limunska kiselina, monohidrat	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Sigma Aldrich, Nemačka
luminol		SERVA, Nemačka
medijum za kalupljenje „Tissue-Tek OCT“		Sakura Finetek, SAD
metanol	$\text{CH}_3\text{OH}$ , MeOH	Merck, SAD
nemasno mleko u prahu		Humana, Nemačka
ponso S		SERVA, Nemačka

propan-1,2,3-triol	glicerol	Sigma Aldrich, Nemačka
natrijum-dihidrogenfosfat	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma Aldrich, Nemačka
natrijum-dodecil-sulfat	SDS	SERVA, Nemačka
natrijum-hidroksid	NaOH	Lach-Ner, Češka
natrijum-hlorid	NaCl	Sigma Aldrich, Nemačka
normalni serum magarca	NDS	Sigma Aldrich, Nemačka
obeleživač molekulskih masa		Thermo Scientific, SAD
paraformaldehid	PFA	Sigma Aldrich, Nemačka
poli(izobutilen)/parafin smesa	Paraplast	Sigma Aldrich, Nemačka
poliadenilna kiselina	PoliA	Sigma Aldrich, Nemačka
polioksietilen-(20)-sorbitan-monolaurat	Tween 20	SERVA, Nemačka
radni pufer za DNTT	DNTT pufer	Promega, SAD
rastvor smola za čuvanje	DPX	Sigma Aldrich, Nemačka
saharoza		Sigma Aldrich, Nemačka
sirćetna kiselina, glacijalna	CH <sub>3</sub> COOH	Zorka, Srbija
2-sulfaniletan-1-ol	β-merkaptioetanol	Sigma Aldrich, Nemačka
tečni azot	N <sub>2</sub>	Messer, Srbija
tetrametil-etilen-diamin	TEMED	Sigma Aldrich, Nemačka
t-oktil-fenoksi-polietoksi-etanol	„Triton X-100“	Sigma Aldrich, Nemačka
trinatrijum-citrat dihidrat	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> · 2H <sub>2</sub> O	Sigma Aldrich, Nemačka
tris(hidroksimetil)aminometan	Tris	SERVA, Nemačka
vodonik-peroksid, 30%	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sigma Aldrich, Nemačka

**Tabela 3.2. Spisak i sastav nesterilnih smesa i rastvora.**

<b>Naziv (skraćenica)</b>	<b>Sastav i rastvarač</b>
RIPA pufer za pripremu lizata tkiva (RIPA) pH 7,4	50 mM Tris 150 mM NaCl HCl (titracija) 0,5% Triton X-100 1% SDS 1 mM EDTA u vodi
Pufer za obradu uzorka za elektroforezu (PUZ) 2 puta koncentrovan	60 mM Tris pufer pH 6,8 25% glicerol 2% SDS 14,4 mM β-merkaptioetanol 0,1% BPB u vodi
Pufer za elektroforezu pH 8,3	0,25 M Tris 0,192 M Glicin 0,1% SDS u vodi
Tris-HCl pufer pH 6,8	1 M TRIS HCl (titracija) u vodi
Tris-HCl pufer pH 8,8	1,5 M Tris HCl (titracija) u vodi
Gel za koncentrovanje	4% AA

	0,14% bisAA 125 mM TRIS-HCl pufer pH 6,8 0,1% SDS 0,05% APS 0,033% TEMED u vodi
Gel za razdvajanje proteina veličine 30–180 kDa	7,5% AA 0,27% bisAA 375 mM TRIS-HCl pufer pH 8,8 0,1% SDS 0,05% APS 0,033% TEMED u vodi
Gel za razdvajanje proteina veličine 8–70 kDa	12% AA 0,43% bisAA 375 mM TRIS pufer pH 8,8 0,1% SDS 0,05% APS 0,033% TEMED u vodi
Rastvor za fiksiranje gela	50% CH <sub>3</sub> OH 10% CH <sub>3</sub> COOH u vodi
Rastvor za obezbojavanje gela	5% CH <sub>3</sub> OH 7% CH <sub>3</sub> COOH u vodi
Rastvor boje CBB za bojenje gela	50% CH <sub>3</sub> OH 10% CH <sub>3</sub> COOH 0,1% CBB u vodi
Rastvor boje ponso s za bojenje PVDF membrane	1% ponso s 5% CH <sub>3</sub> COOH u vodi
Na/K fosfatni fiziološki rastvor (PBS) pH 7,2	1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 6,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2,7 mM KCl 0,14 M NaCl u vodi
Natrijum-fosfatni pufer (NFP) pH 7,4	0,2 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5M NaOH (titr.) u vodi
Imunoblot pufer za prenos pH 8,3	0,25 M Tris 0,192 M Glicin 20% MeOH u vodi
Imunoblot rastvor za blokiranje	5% OML u PBS-u
Rastvor za ispiranje membrane	0,1% Tween 20 u PBS-u
Rastvor luminola	250 mM luminol

	u DMSO-u
Rastvor p-kumarinske kiseline	90 mM p-kumarinska kiselina u DMSO-u
Imunoblot rastvor supstrata za HRP	1% rastvor luminola 0,44% rastvor p-kumarinske kiseline 7,5% Tris pufer pH 8,8 5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> u vodi
Rastvor za fiksiranje tkiva	4% PFA 0,1 M NFP pH 7,4 1 M NaOH u vodi
Rastvor krezil ljubičastog	0,1% CV 1% CH <sub>3</sub> COOH u vodi
Rastvor za „bojenje“ COX	0,02% DAB 0,03% Cyt c 0,015% CAT 2% saharoza 0,03% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Ni(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O 0,03% CoCl <sub>2</sub> u 50 mM NFP
Natrijum-citratni pufer za otkrivanje antigena pH 6	0,1 M C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> · H <sub>2</sub> O 0,1 M C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> · 2H <sub>2</sub> O u vodi
Tris-EDTA pufer za otkrivanje antigena pH 9	10 mM Tris 1 mM EDTA u vodi
Rastvor za inhibiciju peroksidaza	0,3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> u metanolu
Scintilacioni koktel	0,5% POP 0,05% POPOP u ksilolu

**Tabela 3.3. Spisak i sastav sterilnih smesa i rastvora i rastvora bez aktivnih ribonukleaza.**

<b>Naziv (skraćena)</b>	<b>Sastav i rastvarač</b>
DEPC voda	0,01% DEPC u vodi
Oligonukleotidi	5 µg/ml 45-mer dNMP u DEPC vodi
Reakciona smesa za radioaktivno obeležavanje oligonukleotida	2,5 µl pufera za DNTT 1 µl oligonukleotida 1 µl 5'-[α- <sup>35</sup> S]dATP 1250 Ci/mmol 1 µl DNTT 20 U/µl 7 µl DEPC voda
Tris-EDTA-NaCl-SDS pufer (TENS)	0,1 M NaCl 20 mM Tris 5 mM EDTA 0,1% SDS



	u DEPC vodi
Slani natrijum-citratni pufer (SSC) pH 7, 100 puta koncentrovan	150 mM NaCl 15 mM C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> · 2H <sub>2</sub> O u DEPC vodi
Rastvor za hibridizaciju	50% formamid 4 puta koncentrovan SSC 10% dekstran sulfat 5 puta koncentrovan DR 200 mg/ml SSDNA 100 µg/ml PoliA 120 µg/ml heparin 2,5 mM natrijum-fosfat 1 mM natrijum-pirofosfat u DEPC vodi
Pufer za ispiranje	1% natrijum tiosulfat u 100 puta koncentrovanom SSC

## 3.2. Antitela

**Tabela 3.4. Primarna antitela.**

Meta	Poreklo	Namena	Razblaženje	Proizvođač	Kat. Br.
β-aktin	zec (p)	IB	1 : 10 000	Abcam	8227
α-tubulin	miš (m)	IB	1 : 1 000	Invitrogen	14-4502-82
TBP	miš (m)	IB	1 : 1 000	Abcam	51841
GAPDH	zec (p)	IB	1 : 5 000	Sigma Aldrich	G9545
ATOX1	miš (m)	IB	1 : 500	Santa Cruz Biotechnology	398742
SLC31A1	koza (p)	IB	1 : 300	Santa Cruz Biotechnology	18473
		IHH	1 : 100		

p, poliklonsko; m, monoklonsko; TBP, protein koji se vezuje za TATA sekvencu; GAPDH, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza; ATOX1, metalošaperon za bakar; SLC31A1, membranski transporter za bakar; IB, imunoblot; IHH, imunohistohemija; kat.br, kataloški broj.

**Tabela 3.5. Sekundarna antitela spregnuta sa HRP.**

Meta	Poreklo	Namena	Koncentracija	Proizvođač	Kat. Br.
mišji IgG	Zec (p)	IB	1 : 30 000	Abcam	97046
zečji IgG	Koza (p)	IB	1 : 30 000	Abcam	6721
kozji IgG	Magarac (p)	IB	1 : 8 000	Santa Cruz Biotechnology	2020
		IHH	1 : 250		

p, poliklonsko; IB, imunoblot; IHH, imunohistohemija; kat.br, kataloški broj.

### 3.3. Ispitanici i prikupljanje uzoraka

Naučna istraživanja u toku izrade ove disertacije su sprovedena u skladu sa Helsinškom deklaracijom Svetske medicinske asocijacije, iz 1964. i njenim kasnijim amandmanima. Istraživanja su odobrena od strane Etičkog odbora Kliničkog centra Srbije odlukom br. 422/5 od 17.3.2011. i Izjavom o saradnji od 7.6.2018. Svaki pacijent je potpisao informisani pristanak. Pravo na tajnost svih osetljivih podataka zagarantovano je svim učesnicima istraživanja. Dobijeni podaci su korišćeni isključivo za svrhu dostizanja postavljenih ciljeva istraživanja.

Istraživanja u okviru ove disertacije su sprovedena nad ukupno 36 uzorka tkiva od 25 pacijenta koji boluju od farmakorezistentne mTLE i 11 individua bez medicinske istorije neuroloških oboljenja i povreda mozga koji su predstavljali kontrolne uzorke (engl. *control*, C). Svi pacijenti imali su istoriju lečenja pomoću 3–6 vrsta antiepileptika pre upućivanja na operativno lečenje. Demografski i klinički podaci svih učesnika istraživanja u trenutku uzimanja hipokampusnog tkiva, kao i primenjene metode, sakupljeni su u tabeli 3.6.

**Tabela 3.6. Demografski i klinički podaci o učesnicima i predviđene istraživačke metodologije.**

	Šifra uzorka	Pol	Starost (godine)	ILAE tip HS	Metode					
					IHH	Nisl	LA-ICP-MS	PAGE/IB	COX	ISH-AR
Pacijenti	TLE1	M	42	2	✓	✓				
	TLE2	Ž	33	2	✓	✓				
	TLE3	M	37	2	✓	✓				
	TLE4	Ž	34	2	✓	✓				
	TLE11	Ž	32	2				✓		
	TLE12	Ž	25	2		✓	✓			
	TLE13	Ž	19	2		✓	✓	✓		
	TLE14	M	29	1		✓	✓	✓		
	TLE15	Ž	19	1		✓	✓	✓		
	TLE16	M	29	1		✓	✓	✓	✓	✓
	TLE17	M	49	1		✓	✓	✓	✓	✓
	TLE18	Ž	40	1		✓	✓	✓	✓	✓
	TLE19	M	38	1		✓	✓	✓		
	TLE20	M	31	1				✓		
	TLE21	M	41	1				✓		
	TLE22	M	45	2				✓		
	TLE23	Ž	51	2				✓		
	TLE24	Ž	36	1				✓		
	TLE25	Ž	44	1				✓		
	TLE26	Ž	37	1				✓		
	TLE27	Ž	26	1				✓		
	TLE28	Ž	48	1				✓		
	TLE29	Ž	52	1				✓		
	TLE30	Ž	26	1				✓		

	TLE31	Ž	23	1			✓	
Kontrolni učesnici	C1	Ž	38	/	✓	✓	✓	✓
	C2	M	19	/	✓	✓	✓	✓
	C3	M	19	/	✓	✓	✓	✓
	C4	Ž	59	/			✓	
	C5	Ž	59	/			✓	
	C6	Ž	59	/			✓	
	C7	M	19	/			✓	
	C8	M	47	/			✓	
	C9	M	20	/			✓	
	C10	Ž	52	/			✓	
	C11	Ž	41	/			✓	

ILAE, Međunarodna liga za borbu protiv epilepsije; HS, hipokampusna skleroza; IHH, imunohistohemija; LA-ICP-MS, laserska ablacija spregnuta sa induktivno kuplovanom plazmom i masenom spektrometrijom; PAGE, elektroforeza na poliakrilamidnom gelu; IB, imunoblot; COX, histohemijsko bojenje aktivnosti citohrom c oksidaze; ISH-AR, *in situ* hibridizacija sa autoradiografijom; M, muškarci; Ž, žene.

Ciljno tkivo ove disertacije predstavljali su hirurški odstranjeni hipokampusi iz gore pomenutih eksperimentalnih grupa: TLE (pacijenti) i C (kontrolni učesnici). Dodatno, u okviru TLE grupe, ispitivani su uzorci HS1 hipokampusa (izražena skleroza) i HS2 hipokampusa (lokalne sklerotične promene) zbog pogodnosti pri poređenju sa kontrolnim uzorcima ili regionom sklerotičnog hipokampusa rezistentnim na sklerozu. TLE pacijenti upućeni na resekciju sklerotičnog hipokampusa u cilju tretmana farmakorezistentne mTLE lečeni su u Klinici za neurohirurgiju, Kliničkog centra Srbije. Nakon potpisivanja informisanog pristanka, hipokampusi pacijenata su odstranjeni *en bloc*<sup>14</sup>, hirurškom metodom prednje dvotrećinske temporalne lobektomije sa amigdalohipokampektomijom. Podtip skleroze hipokampusa prema ILAE klasifikaciji (HS1/2) je utvrđen postoperativnim histološkim pregledom tkiva od strane patologa (S.R.) Službe za patohistologiju, Klinike za neurohirurgiju, Kliničkog centra Srbije. Kontrolni hipokampusi su dobijeni tokom autopsije u Institutu za forenzičku medicinu, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, manje od 10 sati *post mortem* od individua bez medicinske istorije neuroloških oboljenja i povreda mozga.

U zavisnosti od potreba predviđene istraživačke metodologije, zadnji deo glave hipokampusa debljine oko 1 cm je momentalno zamrznut u tečnom azotu i do upotrebe odložen na -80 °C ili je fiksiran u rastvoru za fiksiranje tkiva (tabela 3.2) 24 sata. Zamrznuti (intaktni) uzorci su korišćeni za dobijanje:

- i) kriopreseka, koji su potom korišćeni za:
  - a) histohemijske metode (Nislovo bojenje i histohemijski esej za citohrom c oksidazu);
  - b) metodu za bio-oslikavanje elemenata;
  - c) metodu *in situ* hibridizacije;
- ii) tkivnih lizata za analizu nivoa ispitivanih proteina.

Fiksirani uzorci korišćeni su za dobijanje parafinskih preseka za imunohistohemijsko ispitivanje.

<sup>14</sup> Hirurško uklanjanje strukture u celini

## 3.4. Priprema smrznutih i parafinskih preseka

Serijski koronalni preseki intaktnog hipokampusnog tkiva smrznutog u tečnom azotu su pripremani u hladnoj komori kriostata (Leica CM1850, Nemačka). Tkivo je pre sečenja dovedeno na radnu temperaturu kriostata, sa -80 °C na -24 °C, tokom 2 sata prilagođavanja. Potom je učvršćeno na metalni nosač pomoću komercijalnog medijuma za učvršćivanje i orjentisano u koronalnu ravan sečenja. Rezovi debljine 16 µm su polagani na visokoprijanjajuća predmetna stakla (Superfrost Ultra Plus, Menzel Gläser, Nemačka), osušeni na sobnoj temperaturi tokom 24 sata i odloženi na -20 °C do upotrebe. Radi očuvanja native organizacije tkiva, pojačavanja razlika između tkivnih činilaca i prevencije autolize, kriopreseki hipokampusnog tkiva su najpre fiksirani paraformaldehidom (30 minuta, 4 °C), za potrebe Nislovog bojenja i histohemijskog esejja za citohrom c oksidazu. Posle ispiranja u PBS-u kako bi se odstranio višak fiksativa i vratila fiziološka pH vrednost, rezovi su bili spremni za navedene metode.

Dehidratacija fiksiranog hipokampusnog tkiva je izvršena inkubacijom u rastvorima etanola rastućih koncentracija: 30, 50 i 70% po 10 minuta, dva puta dva sata u 96% i jedan sat u apsolutnom etanolu. Potom je tkivo prebačeno u ksilol. Kalupljenje je izvršeno u „Paraplast“ smesi u histološkim kasetama. Serijski koronalni preseki debljine 10 µm su dobijeni na rotacionom mikrotomu (Leica RM2265, Nemačka) i polagani na visokoprijanjajuća predmetna stakla (Superfrost Ultra Plus, Menzel Gläser, Nemačka) u vodenom kupatilu na 40 °C (Leica HI1220, Nemačka). Nakon sušenja tokom 48 sati na vazduhu, odloženi su i čuvani na sobnoj temperaturi do upotrebe.

## 3.5. Histohemijske metode

### 3.5.1. Nislovo bojenje

Metod bojenja nervnog tkiva u cilju lokalizacije ćelijskih tela je razvio nemački neuropatolog Franc Nissl (Nissl, 1894). Osnov bojenja leži u sposobnosti endoplazmatskog retikuluma i ribozomskih rozeta da vežu bazna jedinjenja kao što je krezil-ljubičasto (engl. *Cresyl violet*, CV) zbog bazofilnih svojstava RNK. Ove velike granularne strukture se nalaze samo u dendritima i ćelijskim telima neurona i nazvane su Nislova tela. Nislovo bojenje je korišćeno kao metoda za utvrđivanje morfo-anatomskih mikrostrukture dentatnog girusa i CA regiona kao i rasporeda i lokalizacije neurona.

Bojenje je obavljeno inkubiranjem preseka u mraku u kiselom vodenom rastvoru CV u trajanju od 20 minuta na sobnoj temperaturi. Višak boje je odstranjen kratkim ispiranjem u dejonizovanoj vodi, a zatim je diferencijacija boje i dehidratacija preseka obavljena potapanjem u rastvore etanola rastućih koncentracija (70%, 96% i 100%). Nakon odbojavanja u ksilolu pločice sa presecima su prelivene rastvorom smola za čuvanje (DPX) i pokrivene pokrovnim stakalcima radi trajne zaštite (Cover slide, Menzel Gläser, Nemačka). Svetlosne mikrofografije preparata hipokampusu obojenih Nislovim bojenjem dobijene su pomoću CCD kamere (Leica DFC 320, Leica, Nemačka) povezane sa svetlosnim mikroskopom (Leica DM RB Photomicroscope, Leica, Nemačka). Bojenje je izvršeno na šest uzoraka sklerotičnih hipokampusu HS1, šest uzoraka HS2 i tri kontrolna uzorka.

### 3.5.2. Enzimsko-histohemijski esej za citohrom c oksidazu

Mitochondrijalna COX predstavlja „raskrnicu“ puteva stvaranja energije i metabolizma bakra. Ovaj transmembranski multimerni proteinski kompleks koji funkcioniše kao

oksidativni enzim i protonska pumpa je fundamentalno značajan za ćelijsko disanje i energetske produkcije kod aerobne respiracije. Posедуje tri redoks aktivna jona bakra u dva katalitička centra ( $Cu_B$  i binuklearni  $Cu_A$ ) i kontroliše prenos elektrona sa citohroma c na  $O_2$  gradeći time vodu u reakciji sa protonima. Količina i aktivnost COX se često dovodi u korelaciju sa energetske statusom i aktivnošću neurona. Esej je korišćen za ispitivanje veze između koncentracije bakra i aktivnosti ovog enzima u uzorcima hipokampusa. Zasniva se na oksidaciji donora elektrona, 3,3'-diaminobenzidina, i posledičnoj polimerizaciji u nerastvorni tamni talog na mestima enzimske aktivnosti.

Fiksirani preseki tkiva hipokampusa svakog uzorka su potopljeni u zajednički rastvor za bojenje COX (tabela 3.2) u trajanju od 70 min uz blago mešanje na 44 °C. Reakcija je zaustavljena ispiranjem u PBS-u pa u dejonizovanoj vodi, nakon čega su izrađeni trajni mikroskopski preparati dehidratacijom preseka u etanolu, ksilolu i montiranjem u rastvoru smola za čuvanje (DPX). Aktivnost enzima na preparatima je određivana denzitometrijski. Preparati su zatim posmatrani svetlosnim mikroskopom (Optika microscopes Italy CP6, Optika, Italija) na različitim uveličanjima a mikrografije su izrađene pomoću CCD kamere (P6 Pro camera, 6.3 MP CMOS) povezane sa mikroskopom. Esej je izvršen na četiri uzorka sklerotičnih hipokampusa HS1 i tri kontrolna uzorka a rezultati denzitometrije (u jedinicama relativne optičke gustine) su prikazani kao arbitrarne jedinice normalizovane na vrednost subikuluma.

### 3.5.3. Imunohistohemijsko obeležavanje

Metoda imunohistohemijskog (IHH) obeležavanja tkiva je metoda lokalizacije (ili vizualizacije) proteina od interesa u tkivnim presecima, koja se zasniva na principima reakcije antitela sa antigenima. Detekcija podrazumeva korišćenje dva „nivoa“ antitela tako da prvo (primarno) vezuje protein od interesa a drugo (sekundarno) sa jedne strane vezuje primarno antitelo a sa druge strane poseduje neki od obeleživača odgovornih za stvaranje vidljivog proizvoda. Ovakvom detekcijom se omogućava povećavanje jačine signala.

SLC31A1 protein je detektovan primarnim antitelom izolovanim iz kože a obeleživač na sekundarnom, anti-kozjem antitelu izolovanom iz magarca je bio peroksidaza rena (engl. *horseradish peroxidase*, HRP). Protokol metode se sastojao iz više koraka koji podrazumevaju pripremu preseka, otkrivanje (*i.e.* demaskiranje) antigena, blokiranje endogenih peroksidaza, blokiranje nespecifičnih mesta vezivanja primarnog antitela, izlaganje primarnom antitelu, izlaganje sekundarnom antitelu i izlaganje HRP obeleživača supstratu.

Za imunohistohemijsku metodu korišćeni su parafinski preseki. Deparafinizacija preseka izvršena je ispiranjem pločica u ksilolu, a rehidratacija potapanjem u rastvore etanola opadajuće koncentracije. Preseci su prebačeni u PBS radi stabilizacije fiziološke pH. Pošto u toku fiksacije tkiva dolazi do formiranja veza između aldehida iz fiksativa i antigena u tkivu, preparati se podvrgavaju procesu demaskiranja antigena, postupkom koji je podrazumevao zagrevanje preseka na 95 °C u TRIS-EDTA puferu, u trajanju od 20 minuta. Kako bi se osiguralo da se formiranje obojenog produkta dešava samo na mestima aktivnosti HRP sekundarnog antitela, nakon hlađenja u trajanju od 10 minuta na sobnoj temperaturi, u presecima je blokirana aktivnost endogene peroksidaze 20-minutnim inkubiranjem preseka u 0,3%  $H_2O_2$  u metanolu. Sledeći korak odnosio se na blokiranje protein-vezujućih mesta u tkivu, za koja bi mogla da se nespecifično vežu sekundarna antitela, inkubacijom preseka u 10% NDS na sobnoj temperaturi tokom 30 minuta u vlažnoj komori. Nakon blokiranja, preseki su izloženi rastvoru primarnog antitela, koje specifično prepoznaje protein od interesa (tabela 3.4). Odabrani serijski preseki nisu bili izloženi primarnom antitelu već su ostavljeni u rastvoru za blokiranje pod istim uslovima kao i preseki sa primarnim antitelom, kako bi služili kao kontrole vezivanja sekundarnog antitela. Izlaganje je trajalo preko noći na 4 °C u vlažnoj

komori, čime je omogućeno optimalnije i efikasnije vezivanje za antigen. Sutradan su preseći izloženi delovanju sekundarnog antitela (tabela 3.5) tokom 90 minuta u vlažnoj komori na sobnoj temperaturi. Sekundarno antitelo, spregnuto sa HRP, vezano na ovakav način omogućava uočavanje i lokalizaciju proteina od interesa nakon aktivacije HRP obeleživača pomoću DAB-supstrata. HRP katalizuje oksidaciju DAB-a u prisustvu vodonik-peroksida što dovodi do polimerizacije i precipitacije obojenog proizvoda na mestima reakcije, odnosno mestima sa vezanim primarnim antitelom, odnosno mestima proteina od interesa u tkivu. Prostorni raspored obojenog proizvoda oslikava prostorni raspored ispitivanog proteina.

Ovako pripremljeni preseći su korišćeni za izradu trajnih preparata po standardnom protokolu. Preparati su zatim posmatrani svetlosnim mikroskopom (Leica DM RB Photomicroscope, Leica, Nemačka) a mikrografije su dobijene pomoću povezane CCD kamere (Leica DFC 320, Leica, Nemačka). Obeležavanje je izvršeno na četiri uzorka sklerotičnih hipokampusu HS2.

## 3.6. Bio-oslikavanje elemenata laserskom ablacijom uz induktivno spregnutu plazmu i masenu spektrometriju

Oslikavanje detaljnog prostornog rasporeda hemijskih elemenata na površini čvrstog uzorka i određivanje njihovog sadržaja postignuto je upotrebom kompozicije nekoliko metoda pod nazivom laserska ablacija uz induktivno spregnutu plazmu i masenu spektrometriju (engl. *laser ablation - inductively coupled plasma - mass spectrometry*, LA-ICP-MS). Ova moćna analitička metodologija korišćena je za ispitivanje elementarnog sastava, lokalizacije i sadržaja mangana, gvožđa, bakra i cinka na kriopresecima intaktnog hipokampusnog tkiva. Kao krajnji proizvod ove složene metode dobijene su dvodimenzione „mape“ ispitivanih elemenata na presecima tkiva sa veličinom piksela koja odgovara kvadratu  $20\ \mu\text{m} \cdot 20\ \mu\text{m}$ . Metoda se izvršava u tri opšta koraka: laserska ablacija skeniranjem tkiva i dobijanje aerosola, određivanje sadržaja metala u aerosolu induktivno spregnutom plazmom i masenom spektroskopijom i računarsko prevođenje spektara u dvodimenzione mape. Instrumentalna podešavanja svakog koraka rađena su u cilju povećanja kvaliteta oslikavanja, brzine ablacije i sprečavanja stvaranja artefakata u smislu zamućenja, razmaza i pozadinskog šuma. Ovakva podešavanja su dala slike sastavljene od kvadratnih piksela dimenzija  $20\ \mu\text{m} \cdot 20\ \mu\text{m}$  brzinom od 106 000 piksela/h.

### 3.6.1. Laserska ablacija

Prvu metodu ove kompozicije predstavlja sistem za lasersku ablaciju, koji koristi energiju lasera za uklanjanje diskretnog dela čvrstog uzorka (tkiva) i njegovo prevođenje u aerosol. Instrumentalna postavka sastojala se od jedinice za lasersku ablaciju (Analyte G2, Teledyne Photon Machines Inc., Bozeman, MT). Osnovna komponenta sistema je ekscimerni<sup>15</sup> argon-fluoridni, nanosekundni, UVC laser. Sistem je opremljen i standardnom, aktivnom dvokomornom ćelijom za ablaciju (HelEx II) sa „ARIS“ podsistemom za brzo uvođenje aerosola (engl. *aerosol rapid introduction system*, ARIS) (Teledyne CETAC Technologies) čime je postignuto znatno kraće vreme ispiranja ablacijske ćelije i uvođenje uzorka u ICP-MS sistem. Radne karakteristike lasera date su u tabeli 3.7. Modalitet ablacije je bio podešen na neprekidno linijsko skeniranje sa korakom od  $20\ \mu\text{m}$  i dozom od 10 pulseva.

---

<sup>15</sup> Pobuđeni dimer (izvedeno od engl. *excited dimer, excimer*)

Tabela 3.7. Karakteristike i instrumentalna podešavanja sistema za lasersku ablaciju "Analyte G2".

Karakteristika	Vrednost
Talasna dužina	193 nm
Oblik zraka	kvadratan
Dimenzije zraka	20 $\mu\text{m}$ · 20 $\mu\text{m}$
Frekvencija	294 Hz
Puls	3 ns
Brzina skeniranja	588 $\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$
Optička energija	0.36 J · $\text{cm}^{-2}$
Ekscimerni gas	argon-fluorid
Noseći gas	helijum
Protok nosećeg gasa	0,3 l · $\text{min}^{-1}$

### 3.6.2. Induktivno spregnuta plazma sa masenom spektrometrijom

Jedinica za lasersku ablaciju je bila direktno povezana sa induktivno spregnutom plazmom i kvadrupolnim masenim spektrometrom (ICP-MS) (Agilent 7900x, Agilent Technologies, Tokyo, Japan) što je omogućilo izotopsku analizu elemenata aerosola uzorka. Radne karakteristike ICP-MS date su u tabeli 3.8. Visoka temperatura plazme jonizuje sve elemente aerosola. Nakon elektrostatičke lupe koja uklanja fotone, neutralne vrste i negativno naelektrisane jone, joni od interesa bivaju fokusirani i uneti u kvadrupolni maseni spektrometar koji ih analizira na osnovu odnosa mase i naelektrisanja.

Tabela 3.8. Karakteristike i instrumentalna podešavanja sistema za ICP-MS "Agilent 7900x".

Karakteristika	Vrednost
Modalitet	TRA <sup>16</sup>
Radiofrekventna snaga	1500 W
Gas za čišćenje	Argon
Protok gasa za čišćenje	0,8 l · $\text{min}^{-1}$
Gas za plazmu i za hlađenje	Argon
Protok gasa za plazmu	1 l · $\text{min}^{-1}$
Protok gasa za hlađenje	15 l · $\text{min}^{-1}$
Detektovani izotopi	<sup>55</sup> Mn, <sup>57</sup> Fe, <sup>63</sup> Cu, <sup>66</sup> Zn
Vreme dobavljanja	34 ms

### 3.6.3. Sastavljanje kvantitativnih dvodimezionalnih mapa

Maseni spektri za svaki metal iz svake tačke ablacije su prevedeni u sirove matrice pomoću softverskog paketa HDIP (v1.3.1.r0; Teledyne CETAC Technologies) koje oslikavaju prostorni raspored metala u datom preseku hipokampusa. Vrednost svakog elementa matrice odgovara intenzitetu signala merenog izotopa odnosno sadržaju tog izotopa u tački uzorka. Dimenzije matrice odgovaraju načinu ablacije, to jest, jedna dimenzija je dužina linije ablacije ( $\mu\text{m}$ ) a druga dimenzija je broj linija ablacije pomnožen sa 20  $\mu\text{m}$  dužine laserskog zraka.

Želatinski standardi su pripremljeni za potrebe kalibracije sirovih matrica mešanjem 10% rastvora želatina sa rastvorom željenog elementa u smesu poznate finalne koncentracije. Kap ove smese je nanosena na predmetno staklo i osušena na vazduhu čime je postignuta homogena distribucija unetog elementa. Želatinski standardi su zatim ispitivani pod istim

<sup>16</sup> Vremensko razdvajanje (engl. *transient resolved analysis*)

uslovima kao i uzorci hipokampusa, čime su dobijene vrednosti za kalibracionu krivu. Ove vrednosti su iskorišćene za kalibraciju sirovih matrica u softverskom paketu ImageJ čime je dobijena finalna slika, odnosno kvantitativna 2D mapa svakog ispitivanog elementa u uzorku. LA-ICP-MS oslikavanje izvršeno je na šest uzoraka sklerotičnih hipokampusa HS1, dva uzorka HS2 i tri kontrolna uzorka. Rezultati kvantitativne analize mapa metala su izraženi kao  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  tkiva.

### 3.7. *In situ* hibridizacija

Hibridizacija *in situ* je metoda koja omogućava direktnu detekciju informacione RNK (iRNK) na mestima njene sinteze i deponovanja u ćelijama, pomoću, veštački dobijene i obeležene probe, tj. nukleinske kiseline komplementarne sekvence. Metoda može imati raznovrsnu primenu, a u ovom istraživanju je korišćena za ispitivanje prostornog rasporeda iRNK odabranih proteinskih šaperona bakar-zavisnih proteina u nervnom tkivu, na fiksiranim kriopresecima hipokampusa. Vrsta probe odabrane za hibridizaciju je hemijski sintetisani komplementarni oligodezoksiribonukleotid radioaktivno obeležen na 3' kraju izotopom  $^{35}\text{S}$ .

Sve probe su dizajnirane kao polimeri dužine 45 nukleotida sa GC udelom od približno 50% radi optimalnog odnosa termostabilnosti hibrida i nespecifičnog vezivanja. Sekvence su odabirane pomoću pristupa bazi podataka nukleotidnih sekvenci Nacionalnog centra za biotehnoške informacije SAD (engl. *The National Center for Biotechnology Information*, NCBI; URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) i date su u tabeli 3.9. Jedinstvenost u humanom genomu za svaku od odabranih sekvenci je utvrđena korišćenjem NCBI softverskog alata „BLAST“ dostupnog na <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>. Sve probe su hemijski sintetisane i prečišćene kod proizvođača „MWG-Biotech Aktiengesellschaft“, Nemačka.

Tabela 3.9. Podaci o korišćenim probama

Gen	GC udeo	Sekvenca probe 5' - 3'	NCBI referenca
<i>COX11</i>	49%	GCA CCA TGT TTT CAA TCT TGT CTG AGG CAT GAC CTG CAA CTG CTG	NM_004375.5
<i>COX17</i>	51%	GGC TCT CAT GCA TTC CTT GTG GGC CTC AAT TAG ATG TCC ACA GTG	NM_001382002.1

A, adenin; G, guanin; C, citozin; T, timin; NCBI, nacionalni centar za biotehnoške informacije u SAD; *COX11*, šaperon za bakar za citohrom c oksidazu COX11; *COX17*, šaperon za bakar za citohrom c oksidazu COX17.

#### 3.7.1. Radioaktivno obeležavanje oligonukleotida

Obeležavanje oligonukleotida izvršeno je na njihovom 3' kraju dodavanjem nekoliko radioaktivnih 5'-[ $\alpha$ - $^{35}\text{S}$ ]dATP pomoću enzima DNK nukleotidilegzotransferaze, stvarajući tako radioaktivni poli-A rep. Reakciona smesa oligonukleotida, enzima, njegovog radnog pufera i radioaktivnih 5'-[ $\alpha$ - $^{35}\text{S}$ ]dATP, sastavljena je u sterilnim uslovima iza odgovarajućeg  $\beta$ -radijacionog štita (tabela 3.3). Enzimska reakcija se odvijala jedan sat na 37 °C i konačno je zaustavljena dodavanjem 40  $\mu\text{l}$  DEPC vode.

Nakon zaustavljanja reakcije, obeležene probe su prečišćene od neugrađenih nukleotida metodom gel hromatografije. Kolone izrađene za ovu metodu sastojale su se od šprica zapremine 1 ml ispunjenog matriksom umreženih dekstrana (Sephadex G-50) u TENS puferu (tabela 3.3) i zatvorenog staklenom vunom. Kalibracija kolona obavljena je unošenjem 52  $\mu\text{l}$  TENS-a i tri puta ponovljenim centrifugiranjem dva minuta na 2000 rpm. Nakon toga je uneto 52  $\mu\text{l}$  reakcione smeše i centrifugirano pod istim uslovima. Odvojeni slobodni nukleotidi



su prikupljeni u epruvetu na dnu kolone a elucija obeleženih oligonukleotida je izvršena dodavanjem 2  $\mu$ l 1M DTT-a radi sprečavanja stvaranja disulfidnih mostova.

Efikasnost obeležavanja proverena je merenjem zračenja na scintilacionom brojaču (LS 6500 Scintillation system, Beckman). Metod je zasnovan na detektovanju fotona nastalih pri prolasku  $\beta^-$  čestica kroz scintilator. Polipropilenske bočice su bile ispunjene scintilacionim koktelom (tabela 3.2) u koji je dodato 2  $\mu$ l prečišćenih obeleženih oligonukleotida. Detektovana aktivnost je bila 50–200  $\cdot 10^3$  cpm/ $\mu$ l dok je specifična aktivnost proba iznosila 450–680  $\mu$ Ci/ $\mu$ g. Ovako pripremljene probe su spremne za hibridizaciju.

### 3.7.2. Hibridizacija

Hibridizacioni protokol je sproveden u sterilnom okruženju bez ribonukleaza, na fiksiranim kriopresecima koji su dehidrirani u 70% i 100% etanolu a zatim osušeni na vazduhu. Obeleženi oligonukleotidi su razblaženi do koncentracije od 1 ng/ml u rastvoru za hibridizaciju (tabela 3.3) u koji je neposredno pre upotrebe dodat i 40 mM DTT. Svaki presek je potpuno prekriven nanošenjem 100  $\mu$ l ove smese a zatim zaštićen folijom (Parafilm M, Bemis Company Inc, USA). Kontrolni preseki za proveru specifičnosti vezivanja svake probe su bili prekriveni rastvorom za hibridizaciju koji je uz obeležene probe sadržao i 100 puta veću koncentraciju neobeleženih proba. Hibridizacija se odvijala na 42 °C tokom 24 sata u vlažnoj komori. Preseci su zatim kratko isprani toplim puferom za ispiranje (tabela 3.3) čime je odstranjena zaštitna folija i višak rastvora za hibridizaciju a nakon toga su dodatno ispirani sat vremena u čistom puferu na 55 °C. Na kraju, preseci su dehidratirani redom u rastvorima: SSC, 0,1 puta koncentrovan SSC (tabela 3.3), 70% EtOH i apsolutni EtOH i osušeni na vazduhu pre izlaganja rendgenskom filmu.

### 3.7.3. Autoradiografija

Distribucija radioizotopa u uzorku, odnosno iRNK od interesa, određena je metodom direktne autoradiografije. Metoda se odvija u mraku i zasniva se na prenošenju energije oslobođene radioaktivnim raspadom sa izotopa  $^{35}$ S na emulziju rendgenskog filma. Prolazak  $\beta^-$  čestica kroz emulziju koju sačinjava želatinski nosač sa uronjenim kristalima nekog od srebra halogenida dovodi do gubljenja energije čestica u seriji interakcija sa elektronima kristalne rešetke što za posledicu ima formiranje metalnog srebra na mestima zračenja odnosno formiranje latentne slike.

Protokolom za završetak ove redukcije srebra, slika postaje vidljiva ljudskom oku. Ovo se postiže izlaganjem filma redukcionim sredstvima dovoljno dugo da se redukuje samo srebro u okviru latentne slike. Nakon toga, višak emulzije sa neredukovanim srebrom se rastvara i spira u procesu fiksiranja slike potapanjem u rastvarač-fiksir čime se omogućava stabilnost dobijene slike i film se sme izneti na svetlost.

Osušeni preseci su premešteni u fotografsku kasetu (Kodak, Rochester, SAD) i svi izloženi istom rendgenskom filmu (Kodak BioMax MR-1, Kodak, Rochester, SAD). Ekspozicija je trajala 8 nedelja na sobnoj temperaturi. Film je zatim potopljen u redukcionu rastvor (Kodak GBX developer, Kodak, Rochester, SAD) i nakon vrlo kratkog ispiranja u vodi potopljen u fiksir (Kodak fixer, Kodak, Rochester, SAD). Ispiranje fiksira izvršeno je drugim kratkim potapanjem u vodu nakon čega je film osušen na vazduhu. Tako dobijen autoradiogram je analiziran denzitometrijski. Metoda je primenjena na četiri uzorka sklerotičnih hipokampususa HS1 i tri kontrolna uzorka. Rezultati denzitometrijske analize autoradiograma su izraženi kao jedinice relativne optičke gustine.

## 3.8. Analiza slika

Nislovo bojenje, LA-ICP-MS oslikavanje i histochemijsko bojenje aktivnosti COX su pripremljeni na sukcesivnim presecima hipokampusa kako bi se obezbedilo najbolje anatomsko preklapanje i omogućilo poređenje mikrografija i slika dobijenih ovim različitim metodama.

Mikrografije preparata dobijene vizualizacijom Nislovog bojenja na 2,5 puta uvećanju su spojene u panoramsku mikrografiju pomoću računarskog softvera (Adobe Photoshop CC 2015, Adobe) koja je korišćena za određivanje i obeležavanje morfo-anatomskih struktura na koronalnim presecima hipokampusa tako što su alatom za slobodno obeležavanje definisane granice SUB i CA1–4 polja i uokvirene anatomske strukture hipokampusne formacije (tabela 3.10).

**Tabela 3.10. Histološke celine ispitivane na koronalnom preseku hipokampusa na Nislovom bojenju.**

Anatomska celina	Struktura
<i>subiculum</i> (SUB)	<i>alveus</i> (ALV)
	<i>stratum pyramidale</i> , celokupan (SP) <sup>1</sup>
	<i>stratum pyramidale</i> u polju CA1 (SP1)
	<i>stratum pyramidale</i> u polju CA2 (SP2)
<i>cornu Ammonis</i> (CA)	<i>stratum pyramidale</i> u polju CA3 (SP3)
	<i>cornu Ammonis</i> polje 4 (CA4)
	<i>stratum radiatum</i> , samostalan (SR)
	<i>stratum lacunosum</i> i <i>moleculare</i> (SLM) <sup>2</sup>
	<i>stratum lacunosum</i> i <i>radiatum</i> (SRL) <sup>2</sup>
<i>gyrus dentatus</i> (GD) <sup>3</sup>	<i>gyrus dentatus</i> - <i>stratum granulosum</i> (GDSG)
	<i>gyrus dentatus</i> - <i>stratum moleculare</i> (GDSM)

<sup>1</sup>*Stratum pyramidale* je ispitivan i kao jedinstvena struktura i po potrebi izdvojen na diskretne zone koje su ograničene na polja CA1–3, te je u skladu sa time označen kao SP1, SP2 ili SP3. <sup>2</sup>*Stratum lacunosum* je u analizi pridružen molekularnom sloju pa označen kao SLM (lakunarni i molekularni) ili radijalnom sloju pa označen kao SRL (radijalni i lakunarni), u zavisnosti od potreba. <sup>3</sup>*Gyrus dentatus* je po potrebi posmatran ili kao celokupna anatomna celina ili podeljen na granularni i molekularni sloj.

Pored navedenih struktura, na mikrografijama su označeni i jednaki, 460 ili 500 µm dugački, poligonalni regioni duž anatomskih granica SP i SUB koji su korišćeni za određivanje subregionalnog rasporeda piramidalnih neurona i korelisanje njihove brojnosti po mm<sup>2</sup> („gustine“), koncentracije metala i aktivnosti enzima citohrom c oksidaze. Granice regiona su definisane histopatološkom ekspertizom i obeležene linijama povučenim slobodnom rukom. Ispitivanje je vršeno u ImageJ softveru za analizu slika.

Dobijene 2D mape metala su u softveru za obradu slika (Adobe Photoshop CC 2015, Adobe) preklapljene panoramskim mikrografijama Nislovog bojenja koje su zatim prilagođene kako bi se postiglo maksimalno moguće poravnanje ivica tkiva među presecima. Potom su regioni od interesa sa panorama preneseni i ucrtani na kalibrisanim mapama i u njima su očitane srednje vrednosti koncentracije metala u softverskom paketu ImageJ.

### 3.8.1. Densitometrijska analiza

Densitometrijska analiza je urađena na autoradiogramima *in situ* hibridizacije i na trajnim mikroskopskim preparatima aktivnosti COX. Preparati i autoradiogrami su postavljeni na transiluminator difuznog neonskog svetla (Northern Light B90, Saint-Laurent, QC, Canada) i digitalno fotografisani pomoću CCD kamere (DAGE72E, DAGE-MTI, Michigan City, MI, USA) i MCID softvera (M4 Image analyser, Imaging Research Inc, Kanada) u TIF formatu. Fotografije su zatim prevedene u 8-bitne slike i sivu skalnu (256 boja), tako da je svaka od boja predstavljala određeni nivo intenziteta signala. Bela boja (0) je predstavljala izostanak signala, dok je najtamnija boja (255) predstavljala najjaču aktivnost.

Obeležavanje regiona od interesa ispitivanje i merenje optičke gustine je urađeno u softverskim paketima za analizu slika (ImageJ; Adobe Photoshop CC 2015, Adobe). Korišćeni su sukcesivni preseki tkiva tretirani različitim metodama. Obeležene panoramske mikrofotografije Nislovog bojenja su postavljene preko fotografija COX aktivnosti i autoradiograma i prilagođene kako bi se postiglo maksimalno moguće poravnanje ivica tkiva i ćelijskih regiona između sukcesivnih preseka tkiva. Zatim su regioni od interesa preneseni sa Nislovog bojenja i obeleženi na fotografijama. U svakom od njih je izmerena srednja vrednost intenziteta sive boje (engl. *mean gray value*) od čega je oduzeta vrednost pozadinskog signala. Normalizacija svih ovako dobijenih vrednosti izvršena je za svaki uzorak (presek) u odnosu na region SUB, čime je dobijena relativna optička gustina za svaki region od interesa.

## 3.9. Priprema lizata tkiva

Preciznim sečenjem skalpelom u koronalnoj ravni na sahatnom staklu na ledu, od svakog smrznutog hipokampusa je odvojen i usitnjen uzorak tkiva mase oko 180 mg. Uzorak je prebačen u epruvetu sa hladnim RIPA puferom za izolaciju (tabela 3.2) uz dodatak KPI, u 1:10 odnosu mase tkiva (g) i zapremine pufera (ml), gde su hidrodinamičkim pritiskom pomoću 20 zaveslaja tučka teflonskog homogenizera razorene tkivne strukture i ćelijske membrane. Dobijeni homogenat je diferencijalnim centrifugiranjem tokom 30 minuta pri sili od 16 100 g i temperaturi od 4 °C razdvojen na dve frakcije. Lizat koji se nalazi u frakciji supernatanta je sakupljen i odložen na -80 °C do korišćenja.

## 3.10. Ispitivanje proteinskog sadržaja lizata tkiva metodom imunoblota

Ispitivanje proteinskog sadržaja uzoraka hipokampusa urađeno je u lizatima tkiva primenom *Western blot* metode koja se sastoji od tri faze: denaturišuće elektroforeze na poliakrilamidnom gelu, transfera proteina na noseću membranu i detekcije proteina primenom hemiluminescentne metode.

### 3.10.1. Elektroforetsko razdvajanje proteina na polikarilamidnom gelu

Uzorci su najpre podvrgnuti elektroforetskom razdvajanju primenom denaturišuće elektroforeze na poliakrilamidnom gelu u prisustvu natrijum-dodecil-sulfata (engl. *sodium dodecyl sulphate – polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE). Ova biohemijska metoda razdvaja denaturisane proteine na osnovu njihove molekulske mase.

Gel za elektroforezu je ručno pripreman neposredno pre izvođenja eksperimenta. Smesa svih reagenasa (tabela 3.2) je izlivena u stakleni kalup debljine 1 mm i odložena 90 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se omogućilo uvezivanje polimera u mrežu i formiranje gela. Svaki radni gel se sastojao iz dva povezana dela: gela za koncentrovanje i gela za razdvajanje. Proteini se kreću ka pozitivnoj elektrodi i to prvo kroz gel za koncentrovanje a zatim kroz gel za razdvajanje. Gel za razdvajanje proteina veličine 8–70 kDa je pripremljen tako da ima gušću mrežu polimera i sadržao je 12% akrilamida dok je gel za razdvajanje proteina veličine 30–180 kDa sadržao 7,5% akrilamida, odnosno ređu mrežu ovog polimera. Gel za koncentrovanje je formiran uz upotrebu kalupa u obliku češlja kako bi se obezbedila mesta za nanošenje uzoraka, tzv. „bunari“. Deo tkivnog lizata hipokampusu je pomešan sa puferom za obradu uzorka (tabela 3.2) u odnosu 1:1 i žustro izmešan. Smesa je termički obrađena zagrevanjem 5 min na 95 °C a zatim spontano ohlađena do sobne temperature. Ovako pripremljeni uzorci su nanošeni u „bunare“ na koncentrujućem gelu, u jednakim zapreminama a zatim je ceo sklop potopljen u kadicu sa puferom za elektroforezu (tabela 3.2) i podvrgnut električnom polju sa konstantnim naponom struje od 80V za prolazak kroz koncentrujući gel, odnosno 120V za razdvajajući gel. Obeleživač molekulskih masa je uz uzorke nanosen u prvi „bunar“ svakog gela. Aparatura pomoću koje je sprovedena metoda je komercijalno dostupna kao sistem za vertikalnu elektroforezu (engl. *Mini-PROTEAN Tetra Cell*) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, SAD). Nakon nanošenja, ostatak uzorka je odlagan na -20 °C do sledeće upotrebe.

### 3.10.2. Transfer proteina na noseću membranu

Prenošenje svih proteina, prethodno razdvojenih elektroforezom, u identičnom rasporedu sa gela na membranu od poliviniliden-difluorida (PVDF) predstavlja naredni korak *Western blot* metode. To značajno olakšava dalje rukovanje zbog boljih fizičkih i hemijskih svojstava membrane u odnosu na gel. Aparatura pomoću koje je sprovedena ova metoda je komercijalno dostupna kao vertikalni sistem za elektro-transfer (engl. *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell*) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California). Sastav svih korišćenih rastvora dat je u tabeli 3.2.

Membrana se prvobitno hemijski aktivira potapanjem u čist metanol što povećava afinitet za vezivanje proteina, a potom se priljubljuje direktno uz gel. Par gel-membrana se umeće između listova gustog filter papira a zatim se ovaj „sendvič“ postavlja između elektroda i ceo sklop potapa u kadicu sa puferskim rastvorom za prenos. Radi smanjenja toplote koja se stvara pri strujnom otporu, transfer je obavljan tokom noći, pri konstantnoj jačini struje od 0,2 A, na 4 °C. Proteini pod dejstvom električne struje putuju kroz gel ka pozitivnoj elektrodi i na tom putu se zadržavaju na PVDF membrani i vezuju za njenu površinu hidrofobnim interakcijama. Bojenjem membrane u ponso s rastvoru potvrđeno je da se transfer proteina zaista desio.

### 3.10.3. Detekcija i vizualizacija proteina

Nakon ispiranja u PBS membrane su inkubirane sat vremena u rastvoru za blokiranje na sobnoj temperaturi radi blokiranja nespecifičnih mesta za koje bi moglo da se veže primarno antitelo. Zatim je membrana izložena rastvoru primarnog antitela (tabela 3.4) preko noći na 4 °C uz blago mešanje. Nakon ispiranja u rastvoru za ispiranje, membrana je inkubirana sa odgovarajućim sekundarnim antitelom spregnutim sa HRP obeleživačem (tabela 3.5), u trajanju od 90 minuta na sobnoj temperaturi uz sporo mešanje. Nakon ispiranja u rastvoru za ispiranje a zatim u čistom PBS-u, membrane su izložene imunoblot rastvoru supstrata što je dovelo do aktiviranja HRP na sekundarnom antitelu i stvaranja luminiscentnih proizvoda detektovanih 16-bitnom CCD kamerom u komercijalno dostupnom

uređaju (engl. *iBright CL1500 Western Blot Imaging System*) (Thermo Fisher Scientific, SAD). Posle detekcije, membrane su oslobođene od vezanih antitela inkubacijom 15 min u 0,2 M NaOH čime je omogućeno njihovo ponovno izlaganje antitelima druge specifičnosti.

### 3.11. Denzitometrijska analiza proteinskih traka

Intenziteti imunopozitivnih traka proteina od interesa su izmereni denzitometrijski uz pomoć ImageJ softvera za analizu slika i normalizovani na vrednosti intenziteta imunopozitivnih traka  $\beta$ -aktina (kontrolne jednakog nanošenja uzorka na gel) u istom uzorku, što odgovara relativnom nivou proteina od interesa u datom uzorku. Ispitivanje ovom metodom je izvršeno na 16 uzoraka sklerotičnih hipokampusa HS1, četiri uzorka HS2 i devet uzoraka kontrolnog tkiva. Rezultati su prikazani u arbitrarnim jedinicama.

### 3.12. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka je sprovedena pomoću softverskih paketa IBM SPSS 25 (IBM, SAD) i GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, SAD). Homogenost varijanse proveravana je Levinovim testom u svakom zasebnom skupu podataka. Studentovim t-testom ispitano je postojanje značajnih razlika u srednjim vrednostima promenljivih između dve grupe sa homogenom varijansom, odnosno Man-Vitnijevim U testom, za grupe sa nehomogenom varijansom. Razlike među varijansama više od dve promenljive u okviru jedne grupe ispitivane su testom ANOVA uz Danetov ili Tukijev *post hoc* test, odnosno Kruskal-Valis H testom ukoliko su varijanse bile nehomogene. Korelacione analize urađene su izračunavanjem Pirsonovog R koeficijenta za linearne veze ispitivanih varijabli odnosno neparametarskog Spirmanovog  $\rho$  koeficijenta za druge monotone veze. Nivo korelacije označavan je u odnosu na opseg vrednosti odgovarajućih koeficijenata korelacije kao: visoka korelacija (0,80 – 1), umereno visoka (0,60 – 0,79), umerena (0,40 – 0,59), niska (0,20 – 0,39) i nije u korelaciji (0 – 0,19). Razlike srednjih vrednosti sa nivoom verovatnoće manjim od 0,05 su prihvaćene kao statistički značajne. Nivo inter- i intragrupne varijabilnosti četiri uobičajeno korišćene interne kontrole jednakog nanošenja uzoraka za imunoblot ( $\beta$ -aktina,  $\alpha$ -tubulina, TATA vezujućeg proteina i gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze) ispitan je pomoću *NormFinder* softvera koji numeričkom vrednošću opisuje nivo varijabilnosti (0 = odsustvo varijabilnosti). Broj ispitivanih uzoraka (n) naveden je u opisu svake metode. Rezultati su predstavljeni kao aritmetičke srednje vrednosti uz standardnu grešku (engl. *mean  $\pm$  sem*).

## IV. Poglavlje

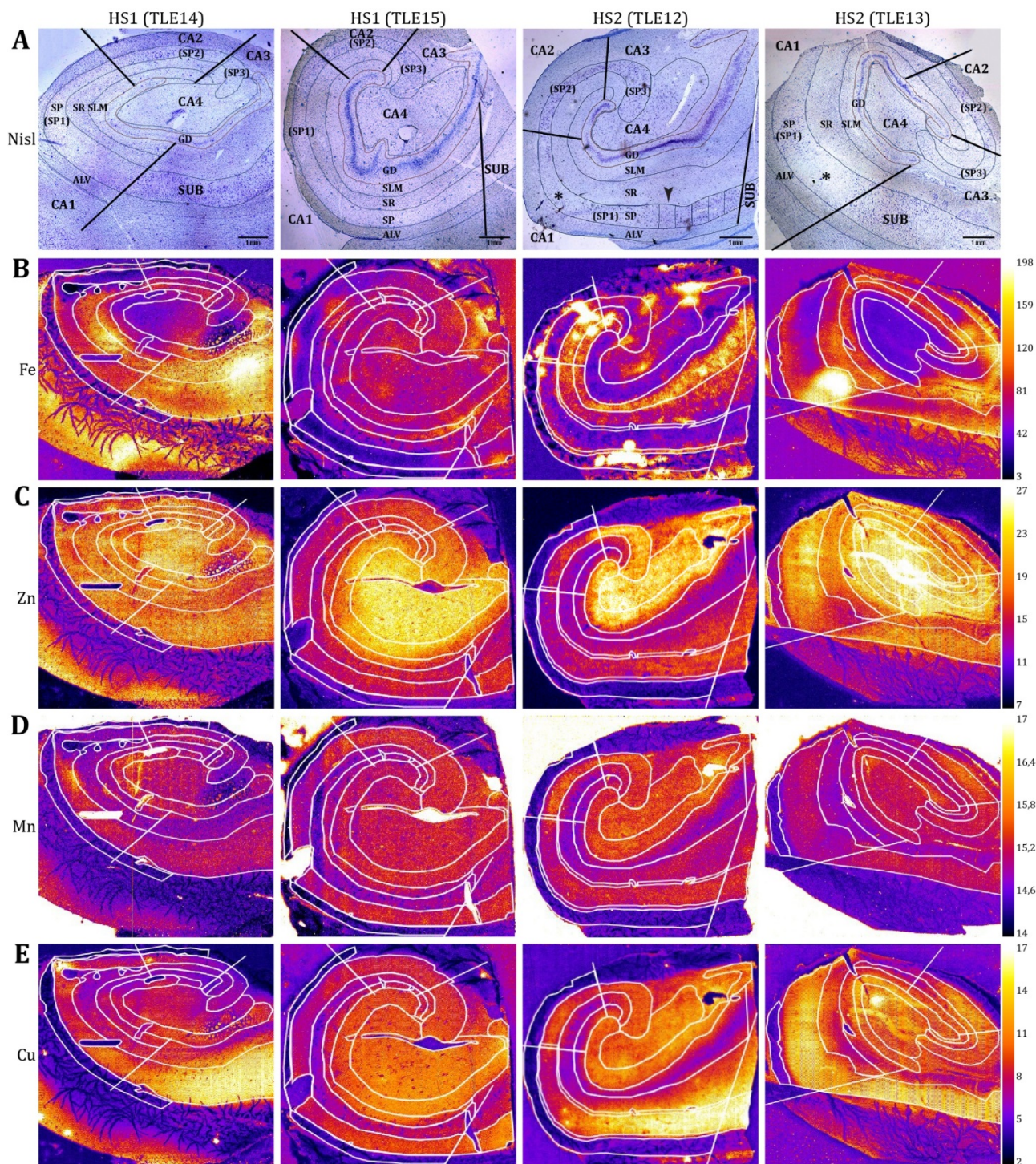
# REZULTATI

## 4.1. Koncentracije metala u sklerotičnom hipokampusu pacijenata sa TLE

### 4.1.1. Histološko ispitivanje sklerotičnih hipokampususa

Radi utvrđivanja prostorne raspodele i koncentracije metala u kontekstu hipokampusne skleroze u mTLE, neophodno je bilo izvršiti histološko ispitivanje dobijenih koronalnih preseka hipokampususa na Nislovom bojenju (slika 4.1A). Ispitivani su sklerotični hipokampusi sa izraženim nivoom skleroze – HS1 i diskretnim nivoom skleroze – HS2. Bojenjem se jasno ističu ćelijski slojevi sa telima glavnih nervnih ćelija – granularni neuroni u GD i piramidalni neuroni u SP i SUB. Pored ovih, uočavaju se i slabije obojeni regioni neuropila i regioni sa retkim interneuronima – ALV, SR, SLM.

Gubitak piramidalnih neurona u HS1 se uočava duž čitavog SP u poljima CA1 i CA4 dok u poljima CA2 i CA3 ovaj gubitak varira i neuroni su relativno očuvani. Za HS2 tip skleroze karakteristične su diskretne zone potpunog gubitka neurona uglavnom ograničene samo na CA1 polje sa relativno očuvanim ćelijama u ostalim poljima (slika 4.1A, zona skleroze obeležena zvezdicom). SUB se uočava kao ćelijski očuvana struktura, nepogođena sklerozom, na svim presecima.



**Slika 4.1. Mikrografije sa Nislovim bojenjem i LA-ICP-MS mape metala na koronalnim presecima hipokampusa sa sklerozom tipa 1 (HS1) i sklerozom tipa 2 (HS2). (A)** Preseci obojeni po protokolu Nislovog bojenja. Morfo-anatomske mikrostrukture i oblasti od interesa obeležene su tankim crnim krivama. Deblje prave linije obeležavaju granice između CA polja i SUB. Zvezdica obeležava regione potpunog gubitka neurona u HS2. Glava strelice na mikrografiji TLE12 naznačava primere koraka za određivanje neuronske gustine duž SP. **(B-E)** Kalibrisane LA-ICP-MS mape gvožđa, cinka, mangana i bakra. Bele linije označavaju morfo-anatomske mikrostrukture i oblasti od interesa prenesene sa Nislovog bojenja. Kalibracione skale u pseudoboji prikazane su za svaki element sa desne strane, u  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  tkiva. TLE12–15 predstavljaju oznake pacijenata. HS1 i HS2, hipokampusna skleroza tip 1 i 2; SUB, subiculum; CA1–4, cornu Ammonis polja 1-4; SP, stratum pyramidale; SP1–3, stratum pyramidale u polju CA1-3; SR, stratum radiatum; SLM, stratum lacunosum i stratum moleculare; GD, gyrus dentatus. Razmera od 1 mm na preseku obojenom Nislovim bojenjem odnosi se i na mape metala odgovarajućeg uzorka.



## 4.1.2. Kvantitativno prostorno određivanje raspodele metala

Koncentracije gvožđa, cinka, mangana i bakra dobijene LA-ICP-MS metodom oslikavanja elemenata su prikazane u vidu mapa u pseudobojaama (slika 4.1B–E) i izražene kao  $\mu\text{g}$  elementa na  $\text{g}$  tkiva ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ). Korišćenje sukcesivnih preseka za dva različita obeležavanja (Nislovo bojenje i LA-ICP-MS) omogućilo je prostornu analizu metala u kontekstu struktura hipokampusa. Humani hipokampus pokazuje visok nivo prostorne organizacije metala čija je analiza data na slici 4.2. Uočava se da se metali različito koncentrišu u zavisnosti od histoloških oblasti hipokampusa. Analiza je organizovana tako da prati raspodelu metala u oblastima gde dominiraju tela glavnih neuronskih ćelija (SP1-3, CA4 i GD) i oblastima koje su uglavnom sačinjene od neuronskih nastavaka, aksona i dendrita (ALV, SR i SLM). SR i SLM su ispitivani i kao objedinjena oblast (slika 4.2A) i parcijalno, u zavisnosti od CA polja kome pripadaju (slika 4.2B).

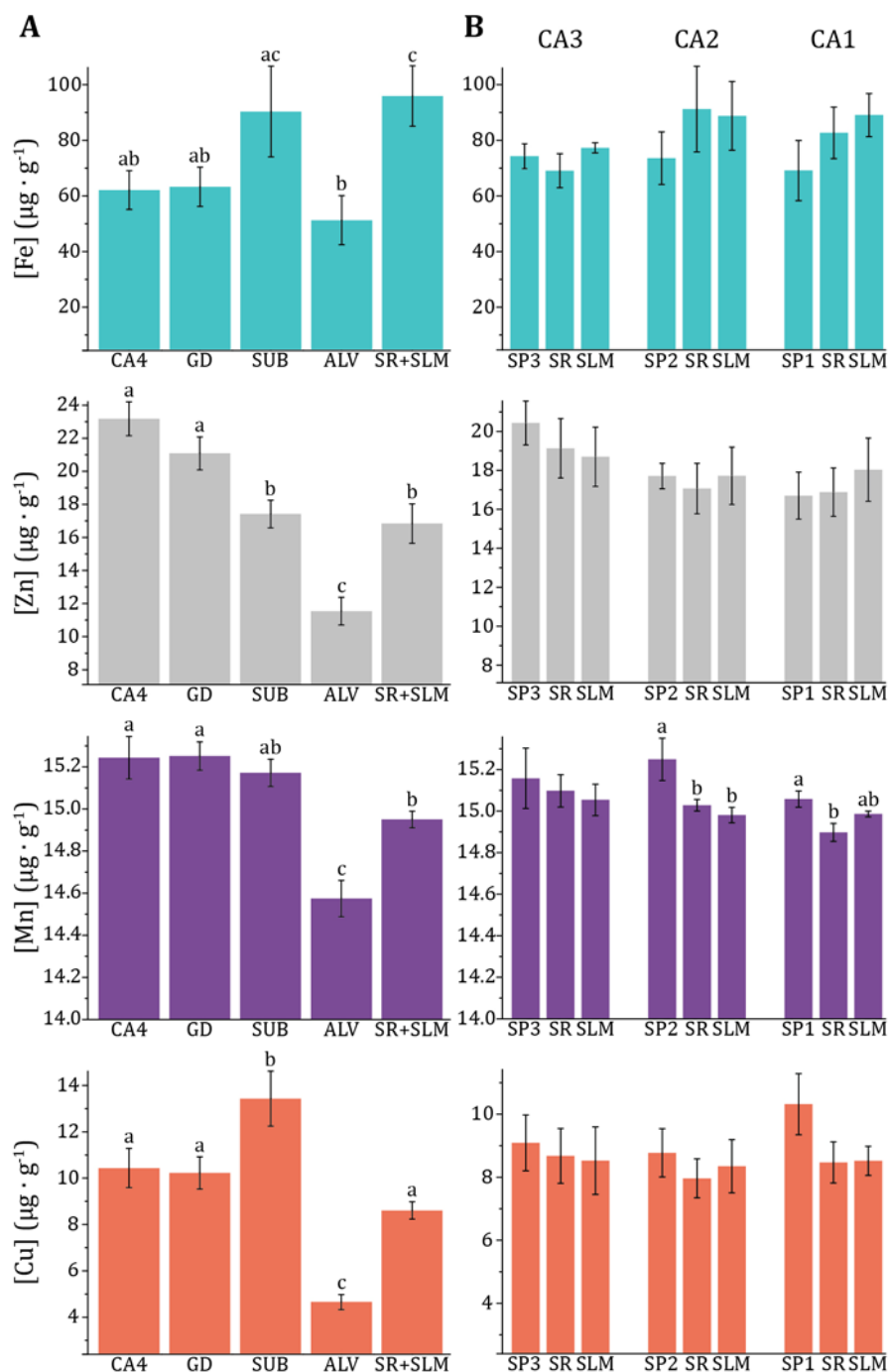
Gvožđe je pokazalo karakterističan obrazac raspodele, naizgled obrnuto od ostalih metala, sa povećanim koncentracijama u radijalnom i lakunarnom/molekularnom sloju (SR+SLM:  $(95,96 \pm 10,95) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ) oko rudimentarne hipokampusne brazde, što je u koincidenciji sa položajem glavnih vaskularnih puteva (slika 4.1B). Umereno visoke koncentracije Fe su pronađene i u SUB. ALV, aksonski sloj, je sadržao najmanju koncentraciju Fe ( $(50,94 \pm 8,92) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ), sličnu kao i u slojevima glavnih neuronskih ćelija, CA4 i GD (slika 4.2A). Kada su se SR i SLM posmatrali ograničeno u okviru polja CA1-3, primećen je trend višeg nivoa Fe u ovim regionima u odnosu na SP1 i SP2, međutim nisu primećene statistički značajne razlike (slika 4.2B). Pojedini regioni su imali tačkaste akumulacije Fe sa izuzetno visokim koncentracijama koje su izbačene iz merenja. Ove nakupine Fe se verovatno mogu pripisati prisustvu krvi.

Koncentracije cinka u CA4, GD i SP3 (regionima sa telima glavnih neuronskih ćelija i mahovinastim vlaknima) su bile najveće izmerene koncentracije i značajno veće od koncentracija Zn u regionima gde dominiraju aksoni i dendriti piramidalnih neurona (ALV, SR+SLM) (slike 4.1C i 4.2A). Zn je jedini od ispitivanih metala za kog je analiza varijanse pokazala značajne razlike u koncentracijama između piramidalnih slojeva različitih polja sa najvećom koncentracijom u CA4 ( $(23,18 \pm 1,02) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ). Koncentracija Zn u CA4 je bila značajno veća u odnosu na SP2 ( $p = 0,003$ ) i SP1 ( $p = 0,01$ ), dok je SP1 imao nivo Zn značajno niži i od SP3 ( $p = 0,03$ ). SUB, kao region sa telima piramidalnih neurona, nije imao različitu koncentraciju Zn od pretežno dendritskih regiona (SR+SLM) ali je sadržao značajno manje Zn od regiona sa mahovinastim vlaknima (CA4 i GD) i značajno više u odnosu na aksonski region, ALV. Slojevi SR i SLM u CA1 i CA2 su imali sličnu koncentraciju Zn u poređenju sa odgovarajućim piramidalnim slojem (SP1 i SP2) (slika 4.2B). Od svih ispitivanih regiona ALV je sadržao najmanju koncentraciju Zn ( $(11,54 \pm 0,83) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ).

Koncentracije mangana su bile značajno veće u CA4, GD i SUB u poređenju sa pretežno dendritskim i aksonskim regionima (ALV i objedinjenim SR i SLM) (slike 4.1D i 4.2A). Analiza raspodele Mn u SP1-3 i odgovarajućim SR i SLM pokazala je da je SP2 sloj sadržao značajno veće koncentracije Mn u odnosu na SR i SLM, dok je SP1 imao značajno veći nivo Mn samo u poređenju sa SR (slika 4.2B). Najveća koncentracija Mn zabeležena je u GD ( $(15,25 \pm 0,07) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ) a najmanja u ALV ( $(14,57 \pm 0,09) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ).

Oblast sa najvećom izmerenom koncentracijom bakra bio je region rezistentan na sklerozu, SUB ( $(13,43 \pm 1,19) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ) u kome je koncentracija Cu bila značajno veća i u poređenju sa ostalim regionima sa telima piramidalnih neurona, SP1–3. Ova koncentracija Cu u SUB bila je značajno veća i od CA4, GD, ALV i objedinjenih SR i SLM (slike 4.1E i 4.2A). Kao i u slučaju drugih ispitivanih metala, ALV je bio najsiromašniji bakrom ( $(4,66 \pm 0,33) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ). Nije bilo značajne razlike u koncentracijama Cu među različitim slojevima piramidalnih

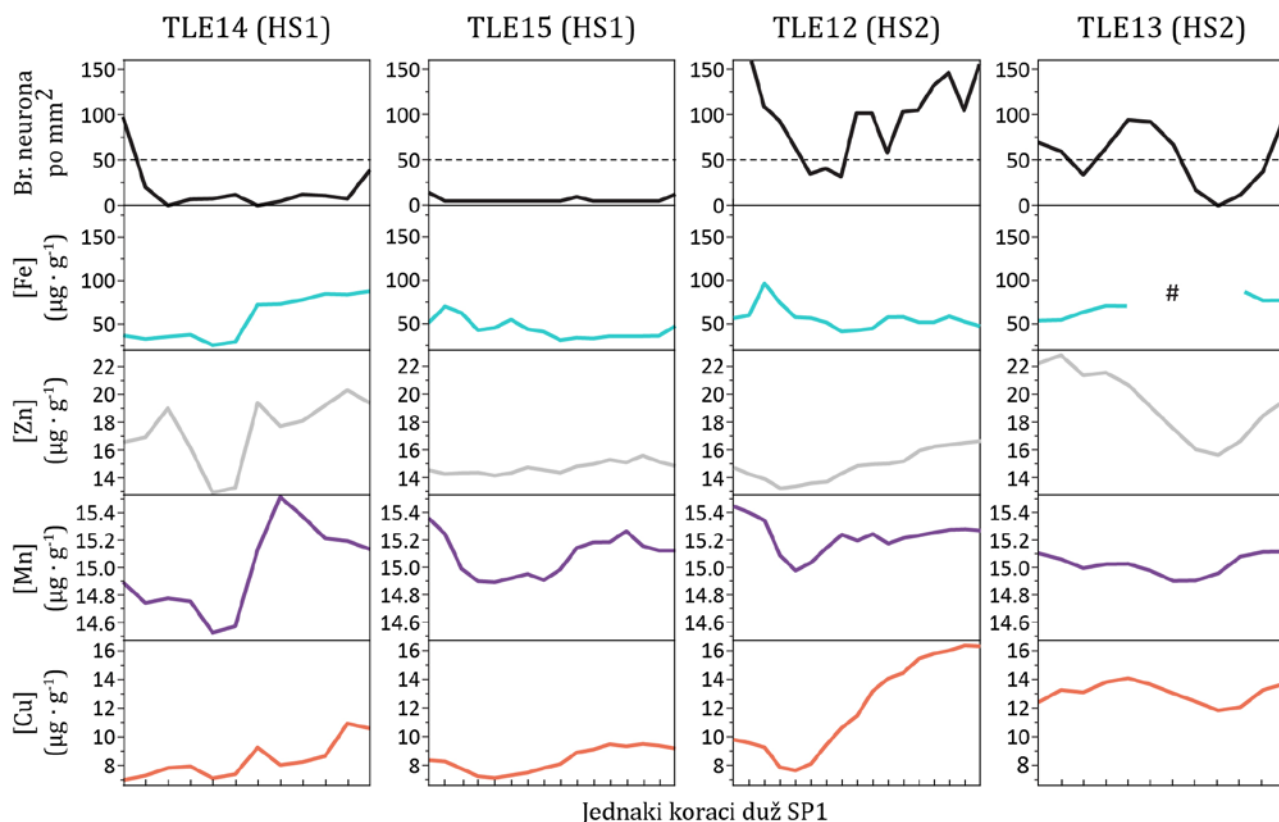
neurona (SP1–3 i CA4). U okviru polja CA1–3 koncentracije Cu u ispitivanim slojevima su bile relativno ujednačene, bez statistički značajnih promena (Slika 4.2B).



**Slika 4.2. Koncentracije gvožđa, cinka, mangana i bakra merene LA-ICP-MS metodom u različitim histološkim regionima sklerotičnih hipokampusa. (A)** Poređenje koncentracija u oblastima sa, predominantno, telima neurona (CA4, *cornu Ammonis* polje 4; GD, *gyrus dentatus*; SUB, *subiculum*) i oblastima neuropila sa retkim interneuronima (ALV, *alveus*; SR+SLM, *stratum radiatum* zajedno sa *stratum lacunosum* i *stratum moleculare*). **(B)** Poređenje koncentracija između različitih slojeva pojedinačnih CA polja (CA1–3, *cornu Ammonis* polja 1 do 3; SP1-3, *stratum pyramidale* u polju CA1-3; SR, *stratum radiatum*; SLM, *stratum lacunosum* i *stratum moleculare*). Statistički značajne razlike su prisutne između regiona čiji stubovi ne dele isto slovo (ANOVA sa Dankanovim *post hoc* testom;  $p < 0,05$ ).  $n = 4$ . Rezultati su dati kao srednje vrednosti  $\pm$  SEM.

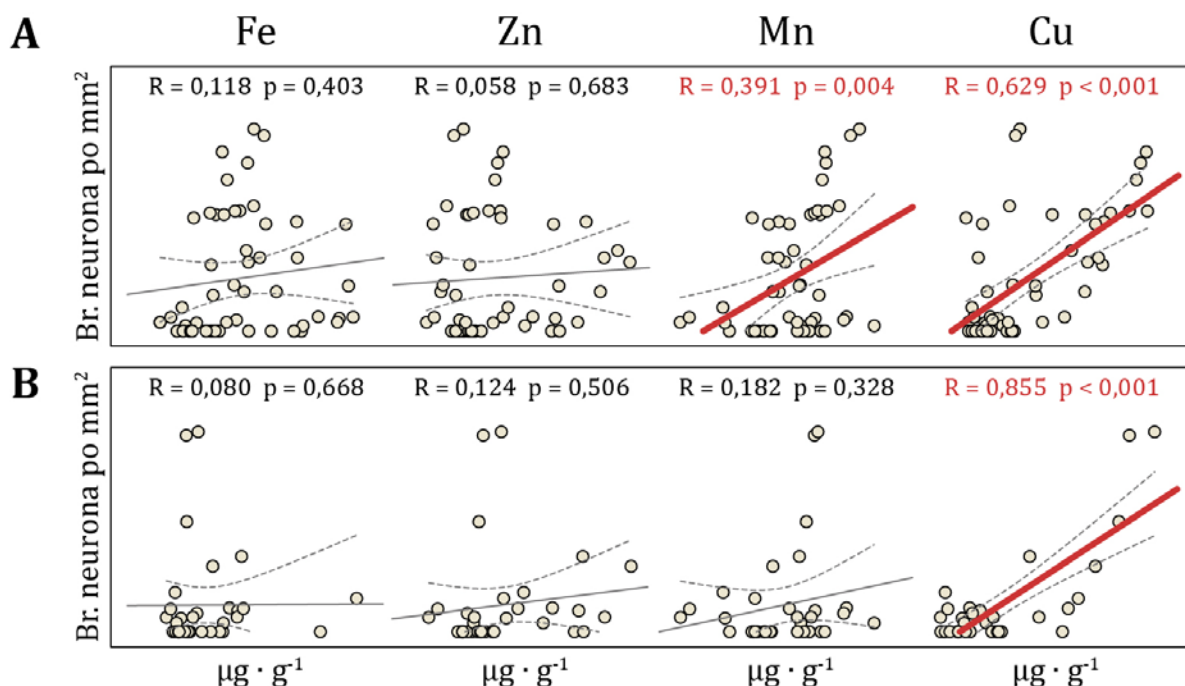
### 4.1.3. Uporedne i korelacione analize gustine neurona i količine metala

Na slici 4.3 su prikazani uporedni histogrami gustine piramidalnih neurona i količine metala u definisanim koracima duž anatomskih granica SP1, regije koja je veoma osetljiva na gubitak neurona u oba tipa hipokampusne skleroze (primer koraka za određivanje neuronske gustine dat na preseku TLE12 na slici 4.1A). Primećeno je da se koraci koji su sadržali manje od 50 tela neurona po mm<sup>2</sup> (isprekidana linija) podudaraju sa zonama skleroze određenim uz pomoć Nislovog bojenja. Uočavaju se diskretne zone totalnog gubitka neurona (sklerotične zone), u HS2, ili opšti gubitak neurona u čitavom sloju, u HS1. Izuzev gvožđa, histogrami cinka, mangana i bakra sugerišu da prostorna organizacija metala prati trend gustine neurona, što je ispitano korelacionim analizama.



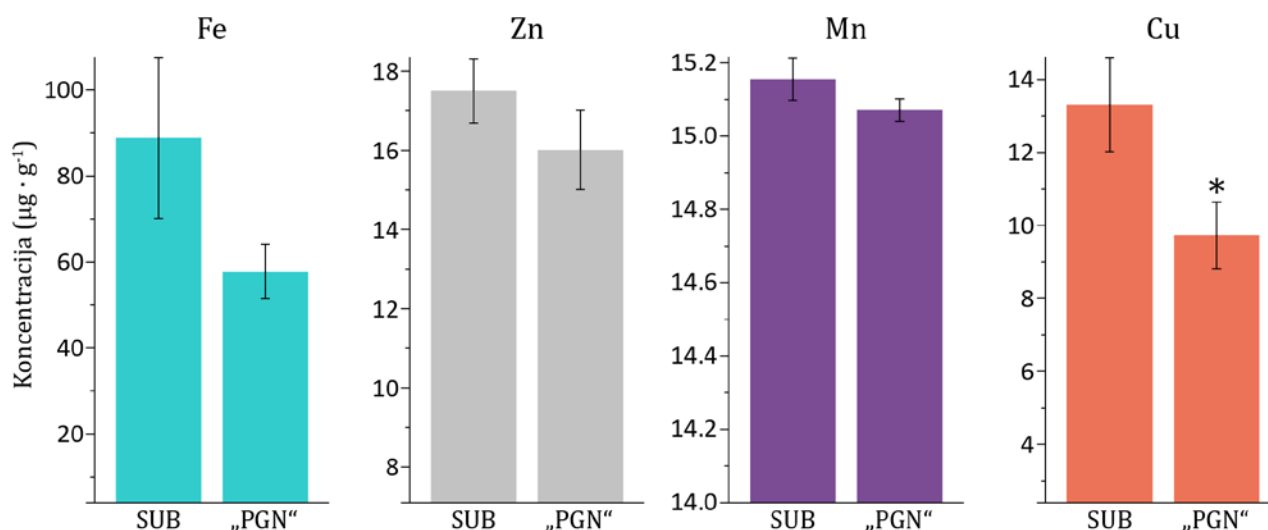
**Slika 4.3. Histogrami raspodele ćelijskih tela i količine metala u sklerotičnim hipokampusima duž anatomskih granica sloja *stratum pyramidale* u polju CA1.** Br. neurona po mm<sup>2</sup> oslikava gustinu tela piramidalnih neurona. Isprekidana linija označava nivo gustine neurona ispod kog se koraci poklapaju sa histopatološki proglašenim zonama skleroze. Jednaki koraci dužine 460 µm prikazani su na x osi, u smeru CA2 → SUB. #, tačka izuzetno visoke koncentracije gvožđa, isključena iz analize; HS1 i HS2, hipokampusna skleroza tip 1 i 2; SP1, *stratum pyramidale* ograničen na CA1 polje. TLE12–15, interne oznake pacijenata.

Utvrđivanje i ispitivanje veze distribucije neuronske gustine i količine metala prikazano je korelacionim analizama na slici 4.4. Poređenja između gustine neurona i koncentracije metala na celokupnom sloju SP1 pokazala su umereno visoku pozitivnu korelaciju za bakar ( $R = 0,629$ ;  $p < 0,001$ ) i nisku pozitivnu korelaciju za mangan ( $R = 0,391$ ;  $p = 0,004$ ), dok za gvožđe i cink nije bilo uočenih veza (slika 4.4A). Kada se uvelo ograničenje korelacione analize samo na sklerotične oblasti SP1, pokazalo se da postoji visoka korelacija između gustine neurona i distribucije Cu ( $R = 0,855$ ;  $p = 0,004$ ), dok u slučaju Mn ova dva parametra u sklerotičnim oblastima ne pokazuju povezanost (slika 4.4B).



**Slika 4.4.** Dijagrami raspršenja sa regresionim linijama i koeficijentima korelacije između gustine neurona i koncentracija metala u celokupnom SP1 (A) i sklerotičnoj oblasti SP1 (B). Crvenom bojom su istaknute statistički značajne korelacije (Pirsonov koeficijent korelacije R i pripadajuća p vrednost prikazani su za svako poređenje). Br. neurona po mm<sup>2</sup> oslikava gustinu tela piramidalnih neurona. Isprekidane linije označavaju intervale poverenja (95%). SP1, deo *stratum pyramidale* ograničen na CA1 polje.

Poređenje koncentracije metala u SUB (*i.e.* očuvanom regionu u svim tipovima HS) sa zonama potpunog gubitka piramidalnih neurona u CA1 na slici 4.5 je otkrilo trend pada koncentracija svih metala u sklerozom zahvaćenim oblastima, dok je značajno smanjena koncentracija primećena samo za bakar ((13,32 ± 1,29) µg · g<sup>-1</sup> naspram (9,73 ± 0,91) µg · g<sup>-1</sup>; p < 0,05).



**Slika 4.5.** Koncentracije metala u sklerotičnim zonama potpunog gubitka neurona u *stratum pyramidale* u *cornu Ammonis* polju 1 i očuvanom subikulumu. Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti ± SEM; n = 4. Zvezdica označava statističku značajnost (p < 0,05) izračunatu Man-Vitnijevim U testom. PGN, zone potpunog gubitka neurona u CA1; SUB, *subiculum*.

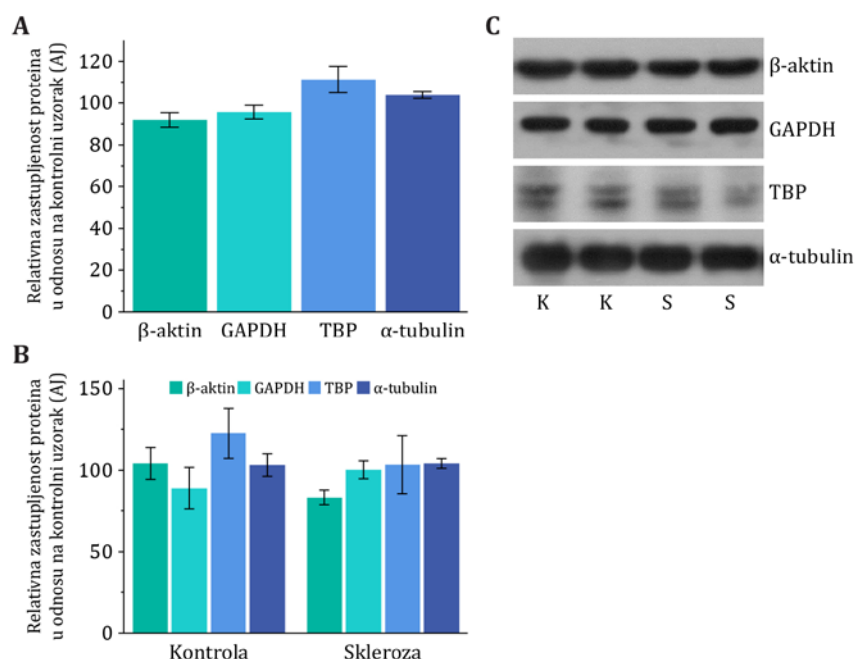
## 4.2. Metabolizam bakra u sklerotičnom hipokampusu

Nakon prethodno pokazanog smanjenja nivoa Cu u sklerotičnom hipokampusu pacijenata sa mTLE-HS (Ristić i sar., 2014) i u ovom radu utvrđene veze između gustine neurona i koncentracije Cu u sklerotičnoj oblasti piramidalnog sloja, pristupilo se ispitivanju membranskog, unutarćelijskog i mitohondrijskog transporta ovog metala, odnosno ispitivanju transportne mašinerije za unos i dostavu ovog metala u mitohondrije i ugradnju u metaloenzime. Odabrani put koji je ispitivan uključuje:

- i) SLC31A1, membranski transporter za unos  $\text{Cu}^+$  u ćeliju,
- ii) ATOX1, šaperon za dostavu bakra do Goldžijevog aparata,
- iii) COX17, mitohondrijski šaperon za dostavu bakra do COX11 u mitohondrijama i
- iv) COX11, mitohondrijski šaperon za umetanje bakra u COX u mitohondrijama.

### 4.2.1. Membranski i unutarćelijski transport

Kako bismo utvrdili koji od proteina, koji se uobičajeno koriste kao referentne kontrole jednakog nanošenja uzoraka za imunoblot, pokazuje najveći stepen stabilnosti ekspresije, ispitali smo unutar- i međugrupnu varijabilnost u kontrolnim i sklerotičnim hipokampusima za  $\beta$ -aktin, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (GAPDH), TATA – vezujući protein (TBP) i  $\alpha$ -tubulin. Ispitivanje je izvršeno pomoću NormFinder softvera a na osnovu rezultata denzitometrije imunoblota navedenih proteina. Relativan nivo ovih proteina, korišćen kao ulazna vrednost za softversko računanje, prikazan je na slici 4.6.



**Slika 4.6. Prikaz relativnog nivoa referentnih kontrola jednakog nanošenja uzoraka za imunoblot.** Grupe: K, kontrola (n = 7); S, skleroza (n = 9). **(A)** Kvantifikacija nivoa proteina (obe grupe, n = 16) za procenu međugrupne varijabilnosti pomoću NormFinder softvera. **(B)** Kvantifikacija nivoa proteina po grupama za procenu unutargrupne varijabilnosti pomoću NormFinder softvera. **(C)** Reprerentativni snimci imunoblota. Dobijeni imunoblotovi su denzitometrijski ispitani pomoću softvera ImageJ. Nivo proteina je određen u ukupnim tkivnim lizatima hipokampusu, normalizovan u odnosu na jedan isti kontrolni uzorak u svakom imunoblotu i izražen u arbitrarnim jedinicama (AJ). Rezultati su dati kao srednje vrednosti  $\pm$  SEM. GAPDH, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza; TBP, protein koji se vezuje za TATA sekvencu.

Unutargrupna i međugrupna varijabilnost za svaki od ispitivanih proteina u kontrolnim i sklerotičnim hipokampusima procenjena je pomoću NormFinder softvera i data je u tabeli 4.1.

**Tabela 4.1. Unutargrupna i međugrupna varijabilnost ekspresije  $\beta$ -aktina, GAPDH, TBP i  $\alpha$ -tubulina.**

Protein	Unutargrupna varijabilnost		Međugrupna varijabilnost
	kontrola	skleroza	kontrola - skleroza
$\beta$ -aktin	226,58	12,77	6,97
GAPDH	348,49	76,01	-9,16
TBP	353,87	784,75	6,16
$\alpha$ -tubulin	171,90	69,19	-3,96

Vrednosti varijabilnosti su izračunate pomoću softverskog dodatka NormFinder. GAPDH, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza; TBP, protein koji se vezuje za TATA sekvencu.

Na osnovu dobijene unutargrupne i međugrupne varijabilnosti, NormFinder softverom su dalje izračunati M parametri koji predstavljaju procenu stabilnosti ekspresije za svaki od proteina (tabela 4.2).

**Tabela 4.2. Stabilnost ekspresije  $\beta$ -aktina, GAPDH, TBP i  $\alpha$ -tubulina.**

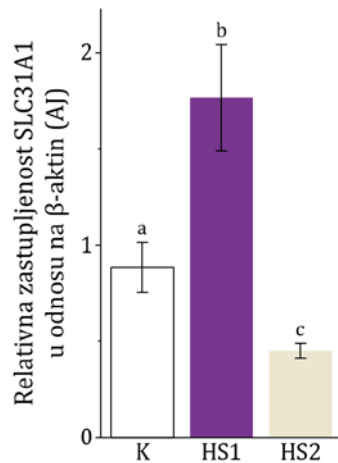
Protein	Stabilnost ekspresije (M)
$\beta$ -aktin	10,57
GAPDH	13,65
TBP	13,72
$\alpha$ -tubulin	8,55

Parametar M označava procenu stabilnosti ekspresije izračunatu pomoću NormFinder softvera, na osnovu unutar- i međugrupne varijabilnosti. Niža M vrednost znači stabilniju ekspresiju. GAPDH, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza; TBP, protein koji se vezuje za TATA sekvencu.

Pokazalo se da među odabranim referentnim kontrolama najmanje varira  $\alpha$ -tubulin što ga je izdvojilo kao najpodobnijeg za ovu grupu ispitivanih uzoraka. Najbolja kombinacija dva proteina izračunata je za  $\beta$ -aktin i GAPDH, sa M vrednošću od 4,82. Kao protein sa najnestabilnijom ekspresijom označen je TBP. Ovim ispitivanjem je pokazano da strukturni proteini ( $\beta$ -aktin i  $\alpha$ -tubulin) predstavljaju bolje referentne kontrole u odnosu na metaboličke enzime (GAPDH) i transkripcione faktore (TBP) u datom setu uzoraka. Na osnovu dobijenih rezultata odabrano je da se za normalizaciju nivoa ekspresije SLC31A1 i ATOX1 u imunoblot metodi koristi  $\beta$ -aktin usled niske unutargrupne varijabilnosti u sklerotičnim hipokampusima.

#### 4.2.1.1. Zastupljenost SLC31A1 transportera u izolatu tkiva sklerotičnog hipokampusa

U cilju ispitivanja veze između alteracije koncentracija bakra u sklerotičnim i kontrolnim hipokampusima i ekspresije SLC31A1, membranskog transportera za unos  $\text{Cu}^+$  u ćeliju, uzorci ukupnih proteinskih ekstrakata su ispitivani metodom imunoblota (slika 4.7).

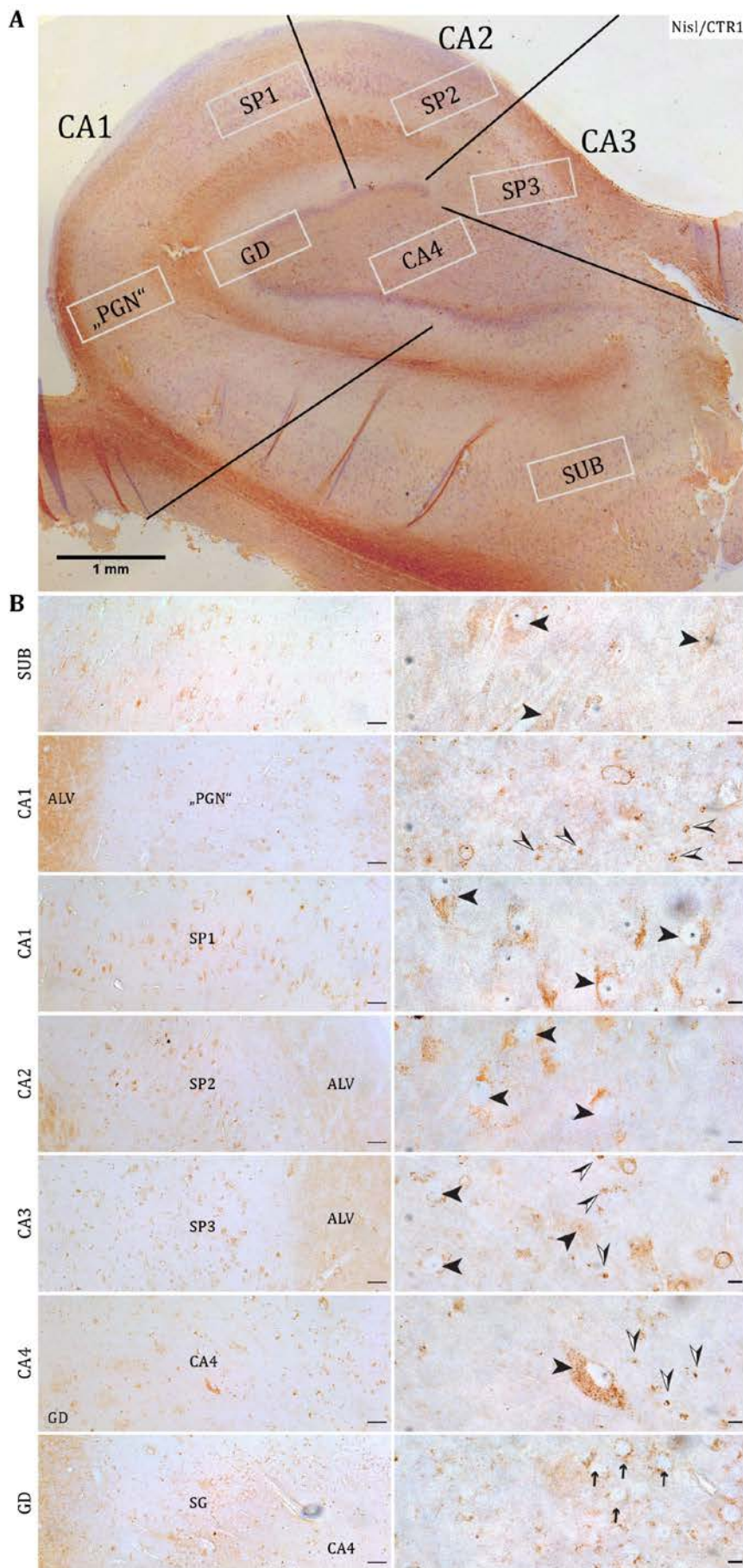


**Slika 4.7. Ispitivanje proteinske ekspresije SLC31A1 metodom imunoblota na kontrolnim i sklerotičnim hipokampusima tipa HS1 i HS2.** Grupe: K, kontrolni hipokampusi (n = 9); HS1, hipokampusna skleroza tipa 1 (n = 12); HS2, hipokampusna skleroza tipa 2 (n = 4). Relativni nivo proteina je određen u ukupnim ćelijskim izolatima hipokampusu. Dobijeni imunoblotovi su denzitometrijski ispitani pomoću softvera ImageJ. Optičke gustine traka cilljnog proteina normalizovane su u odnosu na β-aktin za svaki uzorak i vrednosti su izražene u arbitrarnim jedinicama (AJ). Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti ± SEM. Statistički značajne razlike su prisutne između grupa čiji stubovi ne dele isto slovo (Man-Vitni U test;  $p < 0,05$ ).

Prilikom detekcije SLC31A1 proteina dobijena je jedna imunopozitivna traka odgovarajuće molekulske mase približno 55 kDa za SLC31A1 dimer. Reprezentativni imunoblotovi su dati u prilogu 1. Primećena je značajna razlika u nivou SLC31A1 proteina među ispitivanim grupama. Utvrđeno je da je nivo ovog proteina bio značajno veći u HS1 hipokampusima u odnosu na kontrolnu grupu ( $p = 0,003$ ) kao i u odnosu na HS2 grupu ( $p = 0,002$ ). Detektovan je i statistički značajno manji nivo SLC31A1 proteina ( $p = 0,02$ ) u HS2 hipokampusima u odnosu na kontrolnu grupu (slika 4.7).

#### 4.2.1.2. Tkivna distribucija SLC31A1 transportera u sklerotičnom hipokampusu

Tkivna i ćelijska prostorna raspodela ekspresije SLC31A1 proteina ispitana je metodom imunohistohemije na sklerotičnim hipokampusima tipa HS2 (slika 4.8). Ekspresija SLC31A1 pokazuje karakterističnu prostornu raspodelu u kontekstu anatomije hipokampusu što se uočava na panoramskoj mapi uporednog prikaza Nislovog bojenja i imunohistohemijskog obeležavanja na sukcesivnim presecima tkiva (slika 4.8A). Citoplazma tela piramidalnih neurona u SUB ravnomerno ekspirira SLC31A1 protein (slika 4.8B). U CA1 polju koje je prevashodno pogođeno sklerozom kod HS2 tipa, uočavaju se dve zone: zona potpunog gubitka piramidalnih neurona (PGN) i relativno očuvana SP1 zona uz granicu sa CA2 poljem (slika 4.8A). U relativno očuvanoj zoni SP1, tela piramidalnih neurona pokazuju tačkasti imunopozitivni produkt rasprostranjen u citoplazmi, koji nije ravnomerno raspoređen već je izrazit u perinukleusnoj zoni i zoni apikalnog dendrita (slika 4.8B). PGN zona se odlikuje imunopozitivnim produktom koji se uočava u malim diskretnim nakupinama što može predstavljati ćelije glije i/ili degenerisane neurone. Tela piramidalnih neurona CA2 polja su takođe imunopozitivna na SLC31A1. Slično kao kod očuvanih CA1 neurona, agregati imunopozitivnog produkta se i ovde javljaju perinukleusno. U neposrednoj blizini SLC31A1 pozitivnih neurona u CA3 i CA4 poljima uočavaju se tačkasti imunopozitivni produkti slični kao u zoni PGN. Granularni neuroni zubate vijuge takođe ekspiriraju SLC31A1 u vidu sitnih granularnih agregata u membranskim zonama ćelijskih tela (slika 4.8B).

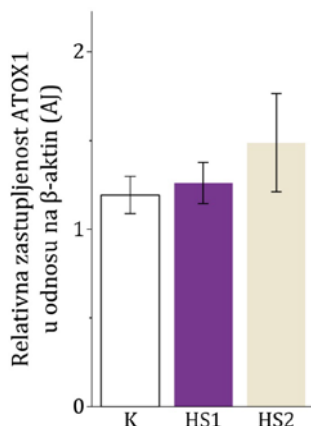


**Slika 4.8. Lokalizacija ekspresije SLC31A1, membranskog transportera za bakar, na koronalnom preseku reprezentativnog sklerotičnog (HS2) hipokampusa. (A)** Paralelni prikaz imunohistohemijskog obeležavanja SLC31A1 (braon boja HRP/DAB imunopozitivne reakcije) u kombinaciji sa Nislvim bojenjem (ljubičasta boja). Crne linije označavaju granice CA polja i SUB. Belim pravougaonicima su označeni regioni od interesa koji su prikazani na većem uveličanju. **(B)** SLC31A1 imunopozitivna reakcija u telima piramidalnih neurona SUB, SP1-3 i CA4 (velike crne strelice), tačkastim nakupinama („PGN“, SP3 i CA4) koje mogu predstavljati degenerisane neurone i/ili glijske ćelije (crno-bele strelice) i membrani granularnih neurona GD (male crne strelice). Levi stubac mikrografija sa razmerom od 50  $\mu\text{m}$ . Desni stubac mikrografija sa razmerom od 10  $\mu\text{m}$ . n = 4. CA1-4, *cornu Ammonis* polja 1-4; „PGN“, potpuni gubitak neurona; ALV, *alveus*; SP1-3, *stratum pyramidale* u polju CA1-3; SUB, *subiculum*; GD, *gyrus dentatus*; SG, *stratum granulosum*.



### 4.2.1.3. Nivo ATOX1 šaperona

Nakon ispitivanja ekspresije i distribucije membranskog transportera SLC31A1, pristupilo se ispitivanju ekspresije citoplazmatskog šaperona ATOX1 koji transportuje Cu od SLC31A1 do Goldžijevog aparata. U tom cilju, metodom imunoblota su ispitivane tri grupe uzoraka ukupnih proteinskih ekstrakata hipokampusu (slika 4.9).



**Slika 4.9. Ispitivanje proteinske ekspresije ATOX1 metodom imunoblota na kontrolnim i sklerotičnim hipokampusima tipa HS1 i HS2.** Grupe: K, kontrolni hipokampusi (n = 9); HS1, hipokampusna skleroza tipa 1 (n = 12); HS2, hipokampusna skleroza tipa 2 (n = 4). Relativni nivo proteina je određen u ukupnim ćelijskim izolatima hipokampusu. Dobijeni imunoblotovi su denzitometrijski ispitani pomoću softvera ImageJ. Optičke gustine traka ciljnih proteina normalizovane su u odnosu na  $\beta$ -aktin za svaki uzorak i vrednosti su izražene u arbitrarnim jedinicama (A). Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti  $\pm$  SEM. Nije bilo statistički značajnih razlika između grupa (Man-Vitni U test;  $p < 0,05$ ).

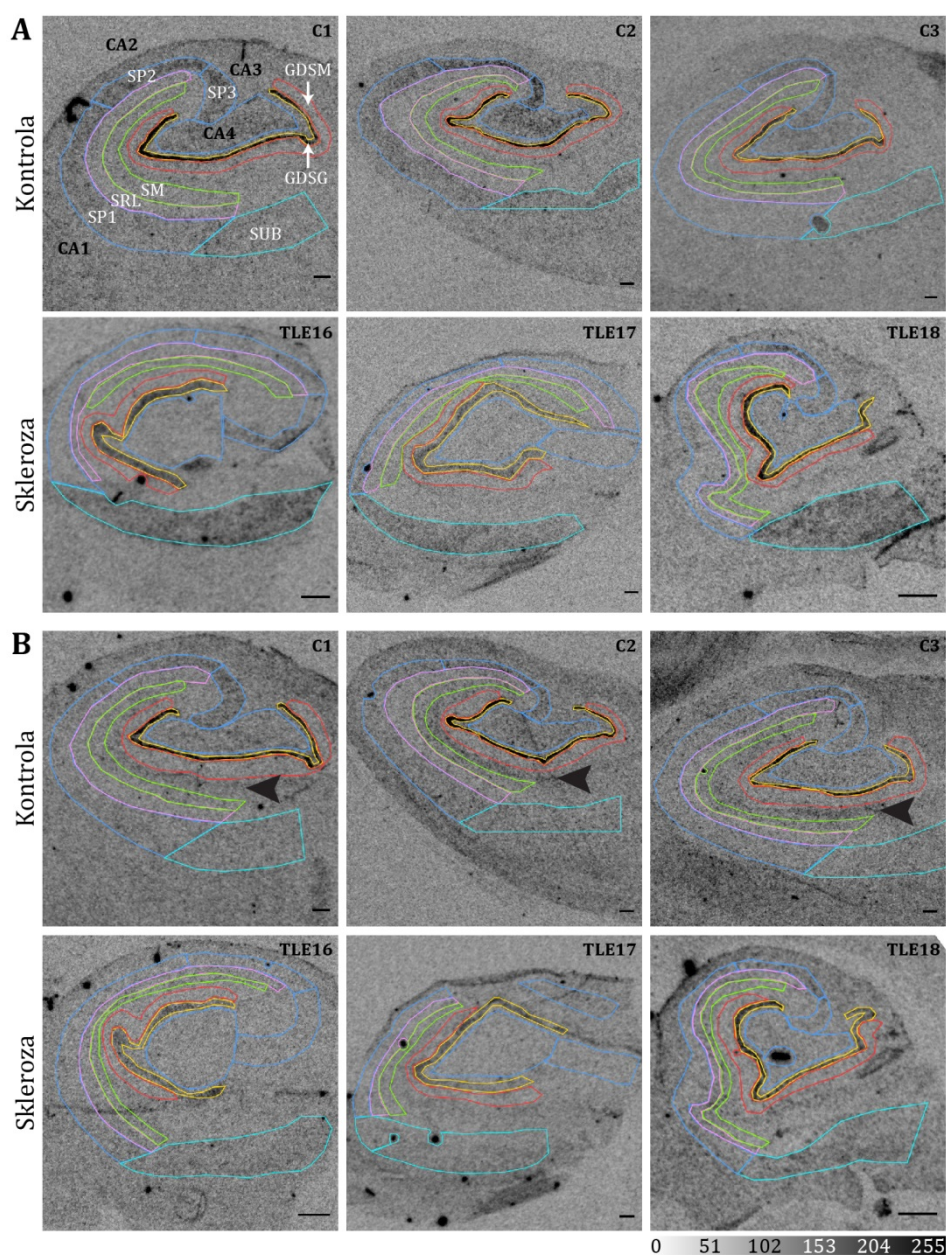
Prilikom detekcije ATOX1 proteina, dobijena je jedna imunopozitivna traka odgovarajuće molekulske mase približno 8 kDa. Reprezentativni imunoblotovi su dati u prilogu 1. Nije primećena razlika u nivou ATOX1 proteina u okviru ispitivanih grupa (slika 4.9).

## 4.2.2. Mitochondrijski transport

Imajući u vidu prethodno pokazane promene u membranskom unosu bakra u ćeliju i izostanak promena u unutarćelijskom transportu ka Goldžijevom aparatu, dalje se pristupilo ispitivanju mitohondrijskog transporta bakra i njegovoj ugradnji u kompleks COX. U tu svrhu, ispitivani su sklerotični (HS1) i kontrolni hipokampusi metodom *in situ* hibridizacije, sa ciljem detekcije promena u količini iRNK za COX11 i COX17 šaperone odgovorne za transport bakra i maturaciju kompleksa COX u mitohondrijama.

### 4.2.2.1. Regionalna raspodela COX11 i COX17 iRNK

Dobijeni autoradiogrami *in situ* hibridizacije pokazali su da se iRNK šaperona COX11 i COX17 eksprimira u ispitivanim uzorcima (slika 4.10).



**Slika 4.10. Autoradiogrami *in situ* hibridizacije na koronalnim presecima hipokampusu. (A)** Regionalna distribucija COX11 iRNK. **(B)** Regionalna distribucija COX17 iRNK. Linijama u boji su ucrtane anatomske oblasti od interesa prenesene sa Nislovog bojenja. Crna strelica označava zonu rudimentarne hipokampusne brazde. Siva skala prikazana u dnu predstavlja relativnu optičku gustinu (0–255) srazmernu količini iRNK. SUB, subiculum; CA1–4, cornu Ammonis polja 1–4; SP1–3, stratum pyramidale u CA1–3; SRL, stratum radiatum i

*lacunosum*; SM, *stratum moleculare*; GDSM, *stratum moleculare u gyrus dentatus*; GDSG, *stratum granulosum u gyrus dentatus*. C1–3 predstavljaju interne oznake kontrolnih uzoraka. TLE16–18 su interne oznake pacijenata. Razmera: 1 mm.

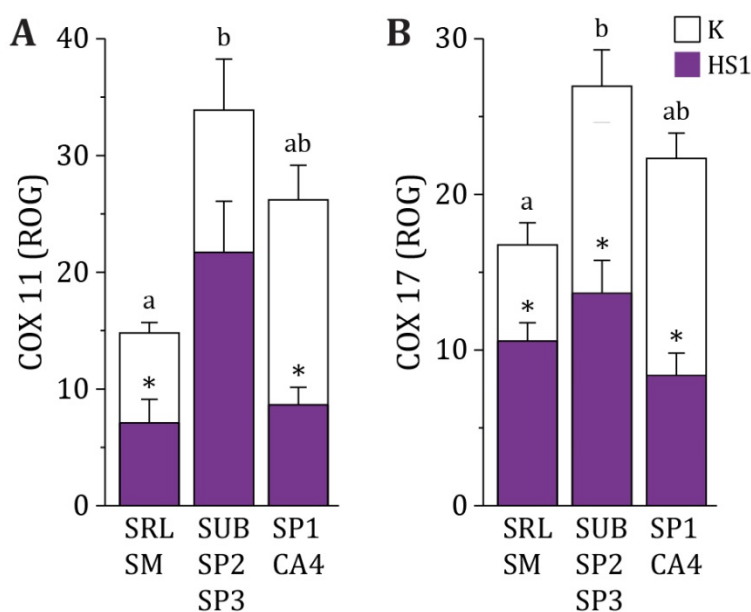
Na autoradiogramima se uočava različita distribucija jačine signala kod oba šaperona, kako među slojevima i zonama unutar grupe kontrolnih ili grupe sklerotičnih hipokampusa tako i između ovih grupa.

Najintenzivniji signal obeležene iRNK šaperona COX11 (slika 4.10A) zapaža se u GDSG kontrolnih hipokampusa dok je kod sklerotičnih hipokampusa signal u ovom sloju nešto umereniji. Među kontrolnim hipokampusima, zapaža se „gradijentna“ distribucija intenziteta signala duž SP u CA1–4 poljima i SUB. Ovo zapažanje se gubi kod sklerotičnih hipokampusa, kod kojih se najjači signal detektuje u SUB.

Opšti utisci dobijeni ispitivanjem ekspresije iRNK za COX17 (slika 4.10B) su da je intenzitet signala kod kontrolnih hipokampusa ujednačen, sa neznatnim pojačanjem signala u zoni vestigijalnog hipokampusnog sulkusa (crna strelica) i opšte smanjenje intenziteta signala kod sklerotičnih hipokampusa. Slično kao kod COX11, najintenzivniji signal obeležene iRNK šaperona COX17 uočava se u granularnom sloju GD. SUB sklerotičnih hipokampusa ne pokazuje intenzivan signal u odnosu na SUB kontrolnih hipokampusa kao u slučaju COX11.

#### 4.2.2.2. Kvantitativna analiza regionalne raspodele COX11 i COX17 iRNK

Kvantitativna analiza relativne količine iRNK za oba ispitivana šaperona izvršena je denzitometrijski na osnovu relativne optičke gustine intenziteta autoradiografskog signala (slika 4.11). Za poređenje i analizu regionalne raspodele nivoa iRNK šaperona COX11 i COX17, odabrani regioni i slojevi su grupisani u zajedničke celine: i) neuropil i slojevi sa dendritima i retkim interneuronima (SRL + SM), ii) regioni tela piramidalnih neurona (SUB + SP2 + SP3) koji su kod HS1 rezistentni ili minimalno pogođeni sklerozom i iii) regioni tela piramidalnih neurona (SP1 + CA4) koji su kod HS1 izrazito osetljivi na sklerozu. Najpre su ispitivane razlike u ovim celinama unutar grupe kontrolnih hipokampusa i unutar grupe hipokampusa poreklom od pacijenata obolelih od mTLE-HS1.



**Slika 4.11. Upporedni kvantitativni prikaz raspodele količine iRNK COX11 (A) i COX17 (B) u grupisanim regionima hipokampusa.** Grupe: SRL+SM, neuropil i slojevi sa dendritima i retkim interneuronima (n = 6); SUB+SP2–3, regioni rezistentni na sklerozu u HS1 (n = 9); SP1+CA4, regioni senzitivni na sklerozu u HS1 (n = 6). Zvezdice označavaju statistički značajne razlike između ispitivanih grupa u HS1 u odnosu na iste grupe u kontrolnim hipokampusima, utvrđene Studentovim t testom (p < 0,05). Stubovi koji ne dele isto slovo se

statistički značajno razlikuju unutar grupe kontrolnih uzoraka, na osnovu Kruskal-Valis H testa sa Danovim *post hoc* testom ( $p < 0,05$ ). Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosati  $\pm$  SEM. ROG, relativna optička gustina; K, kontrolni hipokampusi; HS1, sklerotični hipokampusi; SRL, *stratum radiatum* i *lacunosum*; SM, *stratum moleculare*; SUB, *subiculum*; SP1–3, *stratum pyramidale* u CA1–3; CA4, *cornu Ammonis* polje 4.

Unutar grupe kontrolnih uzoraka, međusobno poređenje zajedničkih celina otkrilo je da postoji statistički značajna razlika u nivou COX11 iRNK samo između regiona SUB + SP2 + SP3 i regiona neuropila (SR + SLM) gde je količina bila niža (slika 4.11A). Kada su se posmatrale definisane zajedničke celine unutar grupe pacijenata (HS1), nije bilo statistički značajnih razlika, ali se uviđa da je nivo iRNK za COX11 bio viši u regionima rezistentnim na sklerozu SUB + SP2 + SP3 (slika 4.11A). Regionalna raspodela iRNK za COX17 je imala slične razlike i trendove u svim ispitivanim zajedničkim celinama kao i COX11. Pronađena je značajna razlika u količini iRNK za COX17 između SUB + SP2 + SP3 i regiona neuropila (SR + SLM), kada su u obzir uzeti kontrolni uzorci. Kod uzoraka mTLE-HS1 hipokampusa nije bilo značajne razlike u količini iRNK ni u jednoj od upoređenih zajedničkih celina (slika 4.11B).

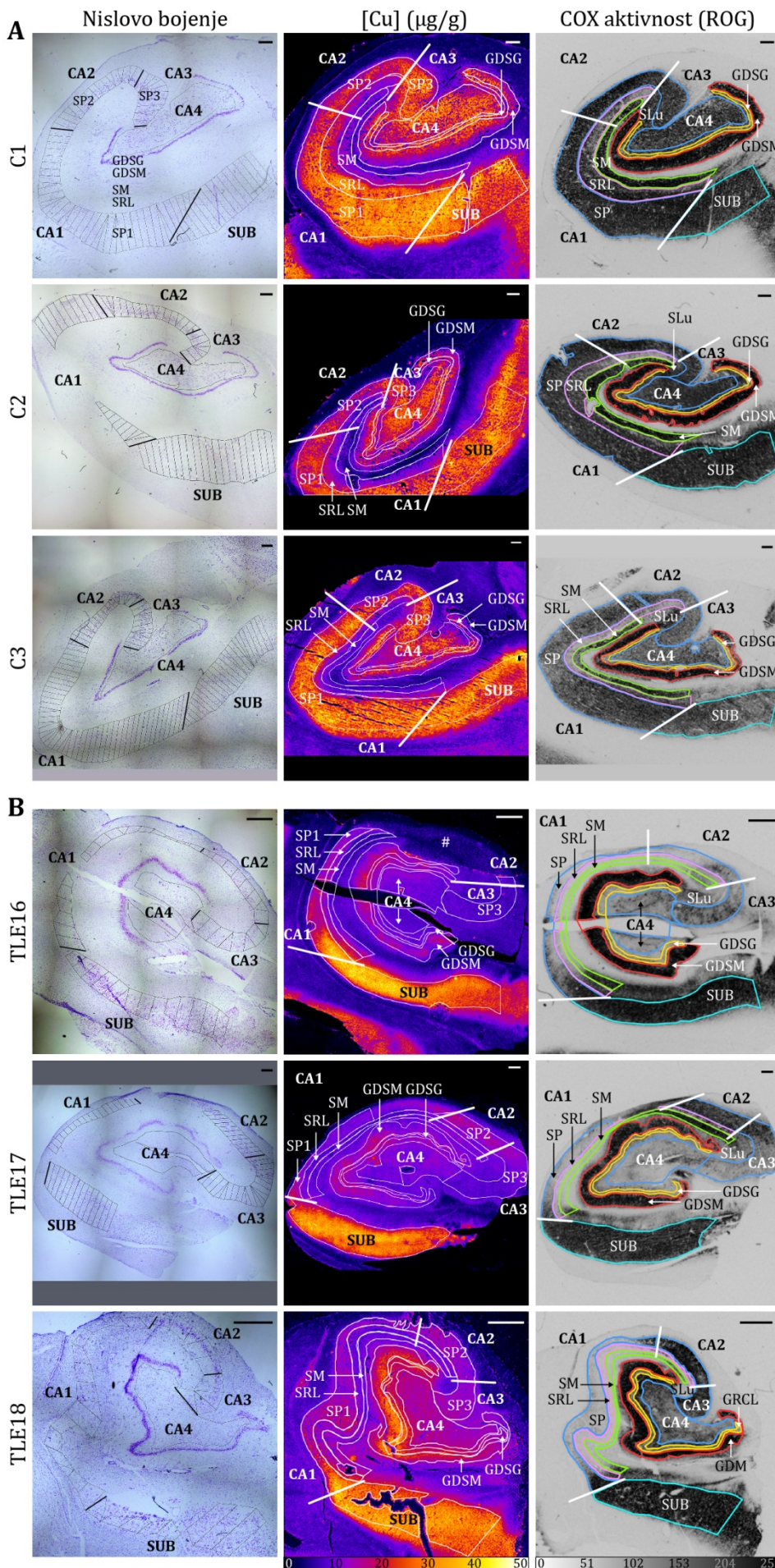
Nakon ovog ispitivanja, dalje su upoređeni kontrolni hipokampusi i hipokampusi pacijenata obolelih od mTLE, pri čemu je uočeno statistički značajno manje iRNK za COX11 kod pacijenata i to u grupi regiona neuropila (SR+SLM) i u grupi regiona senzitivnih na sklerozu (SP1+CA4). Ovaj trend smanjenja za COX11 se vidi i kod regiona rezistentnih na sklerozu iako bez statistički značajne razlike (slika 4.11A). Nivo iRNK za COX17 je bio značajno niži u svim ispitivanim zajedničkim celinama u uzorcima mTLE-HS1 hipokampusa u odnosu na kontrolne (slika 4.11B).

### 4.3. Efekat deficita bakra na energetske metabolizam u sklerotičnom hipokampusu

Prethodno uočene promene i patološke slike u ovom radu, dalje su ispitane u kontekstu energetskog metabolizma hipokampusa. Konkretno su na sklerotičnim i kontrolnim hipokampusima ispitivane veze između brojnosti piramidarnih neurona, tkivne raspodele Cu i regionalne aktivnosti COX enzimskog kompleksa, kao jednog od krajnjih „korisnika“ Cu u mitohondrijama (slike 4.12–14 i tabela 4.3).

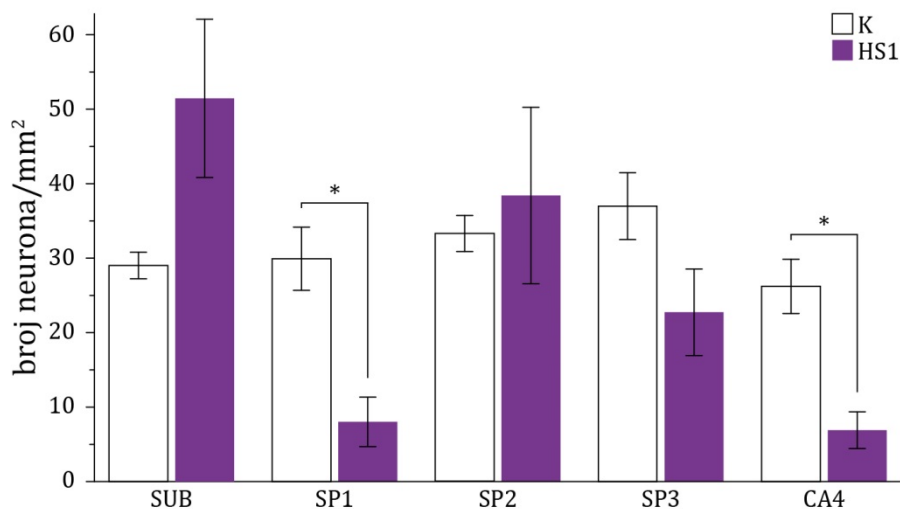
#### 4.3.1. Uporedno ispitivanje hipokampusne skleroze, regionalne raspodele koncentracija bakra i aktivnosti citohrom c oksidaze

Svaki uzorak hipokampusa je ispitivan pomoću tri različite metode, na sukcesivnim presecima tkiva što je omogućilo anatomsko preklapanje i poređenje. Na presecima na slici 4.12 je prikazano Nislovo bojenje, LA-ICP-MS oslikavanje sadržaja bakra i enzimske histoheмиjske bojenje aktivnosti COX. Na mikrografijama Nislovog bojenja se ističu regioni sa telima glavnih nervnih ćelija (GDSG, SP1–3, CA4 i SUB) i slojevi neuropila sa dendritima i retkim interneuronima, koji su slabije obojeni (SRL, SM i GDSM) (slika 4.12).



**Slika 4.12. Uporedni prikaz Nislovog bojenja, mapa koncentracija bakra i aktivnosti citohrom c oksidaze u sukcesivnim koronalnim presecima (A) kontrolnih i (B) sklerotičnih hipokampusa. (Nisl)** Nislovo bojenje neuronskih tela sa ucrtanim granicama CA polja i SUB (debele prave) i koramicama duž *stratum pyramidale* za korelacione analize. **(Cu)** Kalibrisane LA-ICP-MS mape koncentracija bakra. Kalibraciona skala u pseudoboji prikazana je u dnu slike ispod mapa, u  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  tkiva. **(COX)** Distribucija aktivnosti citohrom c oksidaze. Siva skala prikazana u dnu slike predstavlja relativnu optičku gustinu (0–255) srazmernu aktivnosti enzima. Tanke bele krive (mape Cu) ili krive u boji (aktivnost COX) označavaju morfoanatomske mikrostrukture i oblasti od interesa prenesene sa Nislovog bojenja. Debele bele prave označavaju granice CA polja i SUB. SUB, *subiculum*; CA1–4, *cornu Ammonis* polja 1–4; SP1–3, *stratum pyramidale* u CA1–3; SRL, *stratum radiatum i lacunosum*; SLu, *stratum lucidum*; SM, *stratum moleculare*; GDSM, *stratum moleculare* u *gyrus dentatus*; GDSG, *stratum granulosum* u *gyrus dentatus*. C1–3 predstavljaju interne oznake kontrolnih uzoraka. TLE16–18 su interne oznake pacijenata. Razmera: 1 mm.

Kvantitativna analiza gustine neuronskih tela u SUB i SP pokazala je da je gustina piramidarnih neurona u SP1 i CA4 polju sklerotičnih hipokampusu bila oko 70% niža nego u kontrolnim hipokampusima (slika 4.13).



**Slika 4.13. Prosečna gustina neuronskih tela (broj neurona po mm<sup>2</sup>) u *stratum pyramidale* različitih CA polja i SUB.** Grupe: K, kontrolni hipokampusi i HS1, sklerotični hipokampusi. Prikazane su srednje vrednosti ± SEM. Statistički značajne razlike između grupa su obeležene zvezdicom (Man-Vitni,  $p < 0,05$ ).  $n = 3$ . SUB, subikulum; SP1–3, *stratum pyramidale* u CA1–3; CA4, *cornu Ammonis* polje 4.

Trend smanjenja broja ćelija uočen je i u SP3 polju, ali bez statističke značajnosti. Regioni sklerotičnih hipokampusu bez trenda gubitka ćelija su bili SUB i SP2. Štaviše, uočen je trend povećanja gustine ćelija u SUB sklerotičnih hipokampusu u odnosu na SUB kontrolnih (slika 4.13). Pri poređenju gustine neurona SUB sa ostalim regionima piramidarnih neurona (SP1–3 i CA4) primećeno je da kod kontrolnih hipokampusu nije bilo značajne razlike ni za jedan sloj, dok je kod sklerotičnog tkiva gustina ovih ćelija bila značajno niža u SP1 i CA4 (tabela 4.3).

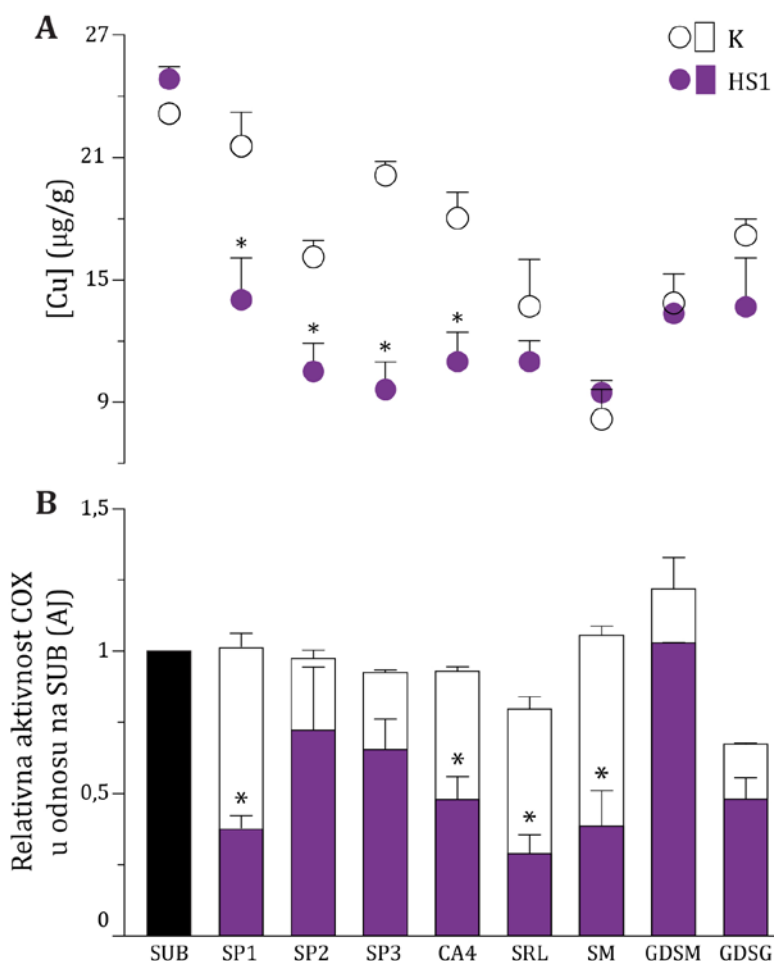
**Tabela 4.3. Poređenje neuronske gustine, sadržaja bakra i relativne aktivnosti COX između SUB i ostalih ispitivanih regiona, analizom varijanse u okviru kontrolnih i u okviru sklerotičnih hipokampusu.**

		SUB naspram:							
		SP1	SP2	SP3	CA4	SRL	SM	GDSM	GDSG
Br. neurona	K	nz	nz	nz	nz				
	HS1	*	nz	nz	*				
[Cu]	K	nz	*	nz	nz	*	*	*	*
	HS1	*	*	*	*	*	*	*	*
COX	K	nz	nz	nz	nz	nz	nz	nz	nz
	HS1	*	nz	nz	*	*	*	nz	*

Br. neurona označava gustinu piramidarnih neurona (broj ćelija po mm<sup>2</sup>); [Cu] označava koncentraciju bakra u  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  tkiva; COX označava relativnu aktivnost citohrom c oksidaze. Grupe: K, kontrolni hipokampusi i HS1, sklerotični hipokampusi. Statistički značajno smanjenje je obeleženo zvezdicom ( $p < 0,05$ ; ANOVA sa Dankanovim *post hoc* testom).  $n = 3$ . nz, nije značajno; SUB, *subiculum*; SP1–3, *stratum pyramidale* u poljima CA1–3; CA4, *cornu Ammonis* polje 4; SRL, *stratum radiatum/lacunosum*; SM, *stratum moleculare*; GDSM, *stratum moleculare* u *gyrus dentatus*; GDSG, *stratum granulosum* u *gyrus dentatus*.

Nakon ispitivanja gustine piramidarnih neurona, pristupilo se kvantitativnoj analizi LA-ICP-MS mapa bakra i relativne regionalne aktivnosti COX, u kontekstu zona i regiona od interesa, u grupi kontrolnih i sklerotičnih HS1 hipokampusu (slika 4.14). Trend povećane koncentracije bakra u regionima sa ćelijskim telima primarnih neurona (SUB, SP) u odnosu na regione neuropila (SRL, SM, GDSM) uočen je samo u grupi kontrolnih uzoraka. U obe grupe

uzoraka, najveće koncentracije bakra su uočene u SUB dok su najniže koncentracije izmerene u SM, bez značajne međugrupne razlike (slika 4.14A). Dalje ispitivanje je otkrilo da su SP1–3 i CA4 sadržali značajno manje bakra u sklerotičnim hipokampusima u odnosu na kontrolne. Bitno je istaći da je uporedno ispitivanje koncentracija Cu i gustine piramidalnih neurona ukazalo na pad koncentracije bakra u slojevima SP2 i SP3 sklerotičnih hipokampusa u odnosu na kontrolnu grupu (slika 4.14A) iako nije bilo značajne razlike u gustini piramidalnih neurona između istih slojeva obe ispitivane grupe uzoraka (slika 4.13). Slojevi u GD (GDSM i GDSG) su imali slične koncentracije bakra u obe grupe. Pri poređenju sa SUB, svi regioni sklerotičnih hipokampusa su imali manje bakra (tabela 4.3).

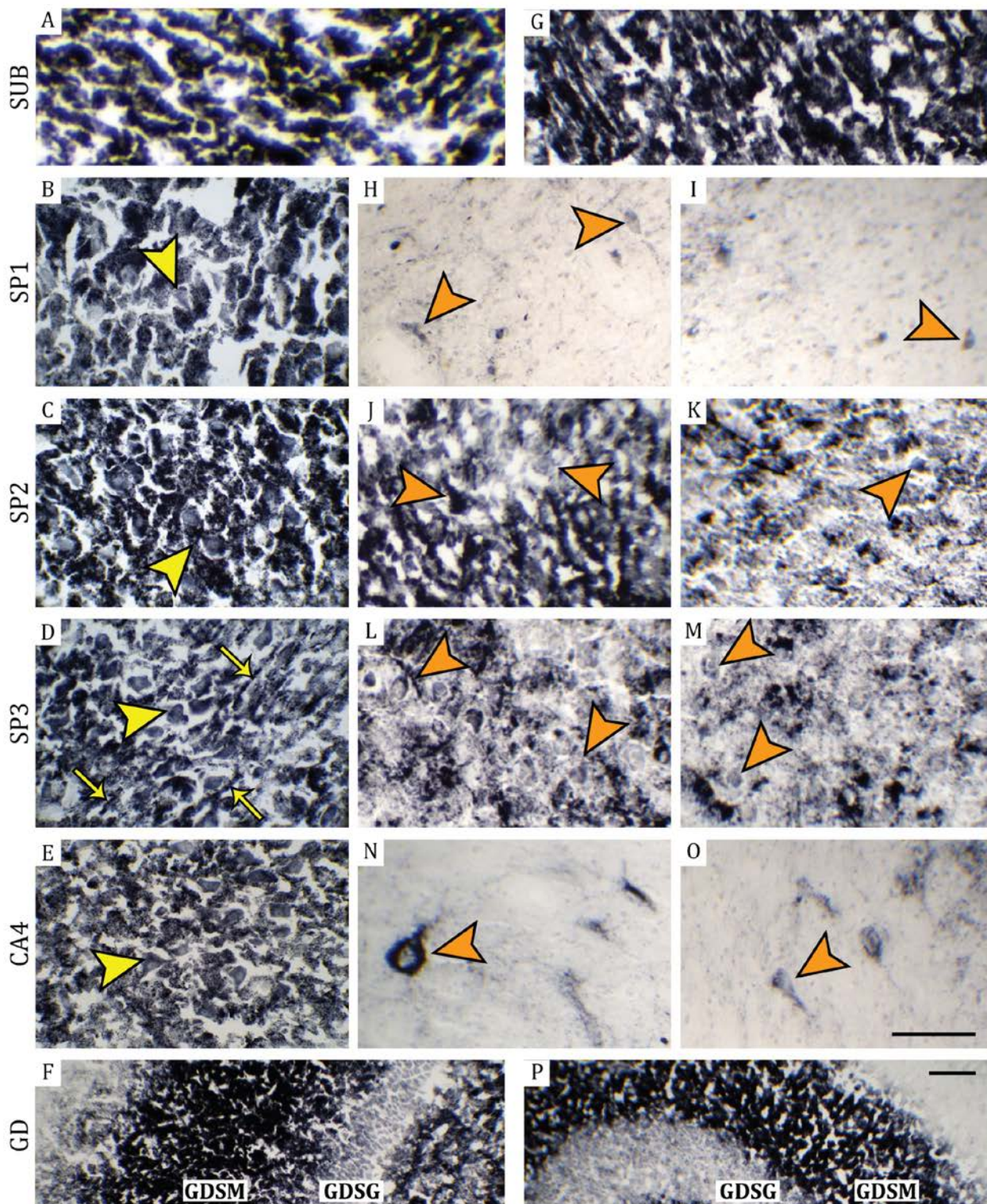


**Slika 4.14. Uporedni kvantitativni prikaz raspodele koncentracija bakra i relativne aktivnosti citohrom c oksidaze (COX) u regionima od interesa na koronalnim presecima kontrolnih i sklerotičnih hipokampusa. (A)** Kvantifikacija koncentracija bakra izmerenih LA-ICP-MS metodom. **(B)** Kvantifikacija relativne aktivnosti COX izmerene denzitometrijski na presecima obojenim metodom enzimske histochemije, normalizovane na SUB iz istog preseka (crni stub) izražene u arbitrarnim jedinicama (AJ). Grupe: K, kontrolni hipokampusi i HS1, sklerotični hipokampusi. Zvezdica označava statistički značajnu razliku u odnosu na isti region u kontrolnom uzorku, utvrđeno Studentovim t testom. n = 3. Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti ± SEM. SUB, *subiculum*; SP1–3, *stratum pyramidale* u poljima CA1–3; CA4, *cornu Ammonis* polje 4; SRL, *stratum radiatum i lacunosum*; SM, *stratum moleculare*; GDSM, *stratum moleculare u gyrus dentatus*; GDSG, *stratum granulosum u gyrus dentatus*.

Nivo aktivnosti COX u SUB je bio veoma sličan između kontrolnih i sklerotičnih hipokampusa, za razliku od međusobnih vrednosti drugih ispitivanih regiona. Stoga je SUB iskorišćen kao interna referentna vrednost za normalizaciju relativnog nivoa aktivnosti enzima u ostalim ispitivanim regionima (slika 4.14B). Značajan pad aktivnosti primećen je kod skleroze i zabeležen za SP1, CA4, SRL i SM u odnosu na aktivnost u kontrolnim presecima. Kod kontrolnih hipokampusa je uočen sličan nivo aktivnosti u svim ispitivanim regionima. Sa

druge strane, široko rasprostranjen pad aktivnosti u odnosu na SUB uočen je u hipokampusnoj sklerozi (tabela 4.3).

Nakon kvantitativne analize, u nastavku se pristupilo histološkom ispitivanju distribucije reakcionog produkta aktivnosti COX na reprezentativnim mikrografijama preseka kontrolnih i sklerotičnih hipokampusa obojenih metodom enzimske histoemije (slika 4.15).



**Slika 4.15. Reprezentativne mikrografije koronalnih preseka kontrolnih i sklerotičnih hipokampusa histoemijski obojenih na aktivnost COX. (A-E) Kontrolni preseki u nivou piramidalnih neurona SUB i CA polja. Velike žute strelice označavaju lokalizovanu aktivnosti COX u ćelijskim telima piramidalnih neurona u SP1-3 i CA4. Male žute strelice označavaju aktivnost COX u nastavcima oko neurona u SP3. (G-O) Preseki sklerotičnih**

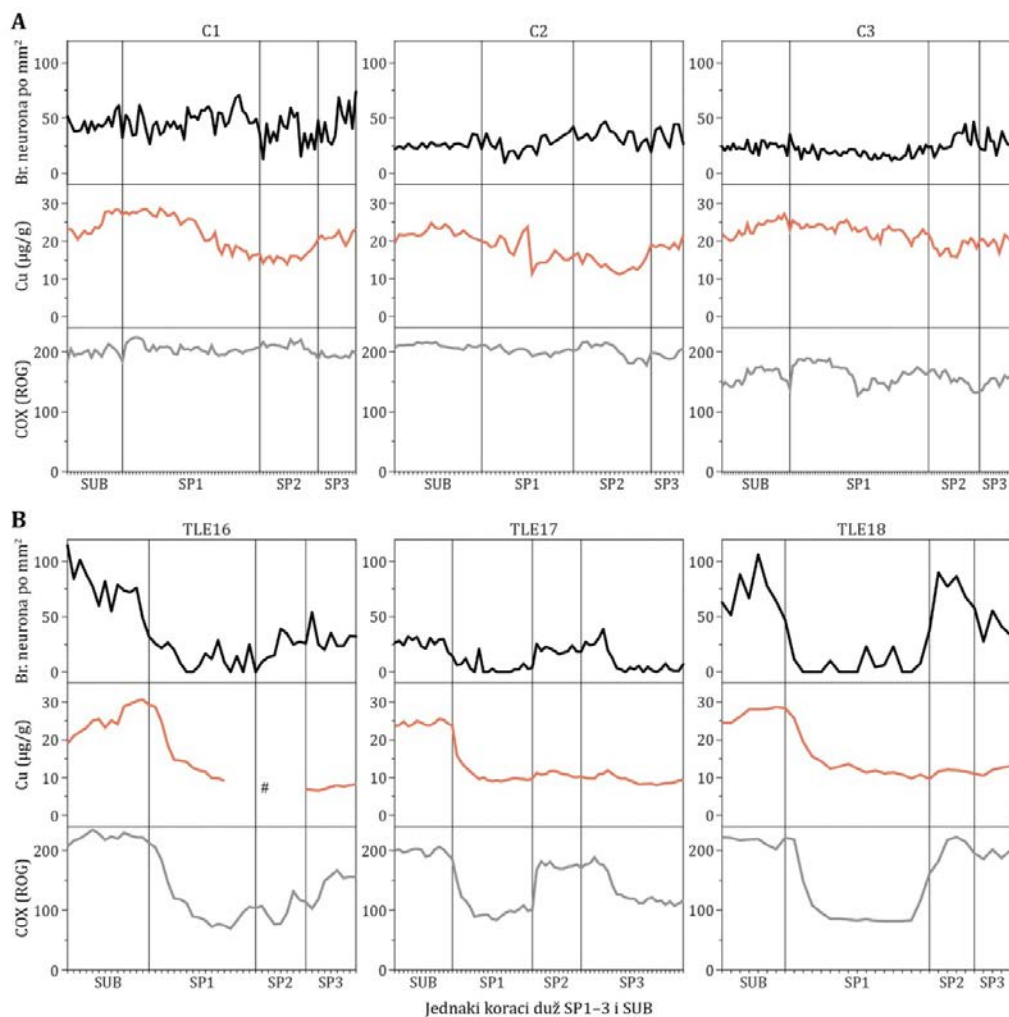


hipokampusa u nivou piramidalnih neurona SUB i CA polja. Velike narandžaste strelice označavaju preživjele neurone u SP1–3 i hipertrofirane neurone CA4. GD kontrolnih (**F**) i sklerotičnih hipokampusa (**P**) bez očigledne razlike u metaboličkoj aktivnosti. Razmera: 100  $\mu$ m. Skala na panelu O se odnosi i na panele A–E i G–N. Skala na panelu P se odnosi i na panel F. SUB, *subiculum*; SP1–3, *stratum pyramidale* u poljima *cornu Ammonis* 1–3; CA4, *cornu Ammonis* polje 4; GD, *gyrus dentatus*; GDSM, *stratum moleculare* u GD; GDSG, *stratum granulosum* u GD.

Zapaženo je da je reakcioni produkt aktivnosti enzima bio najviše smešten u ćelijskim telima piramidalnih neurona i kod kontrolnih (slika 4.15A–E) i kod sklerotičnih hipokampusa (slika 4.15G–O) kao i u molekularnom sloju zubate vijuge koji sadrži dendrite granularnih neurona i sinapse sa komisuralnim i septalnim vlaknima i vlaknima perforantnog puta (slika 4.15F, P). Sporadična i slaba aktivnost COX zabeležena je u preživelim ćelijama u zonama potpunog gubitka neurona polja SP1 (slika 4.15H, I). Bojenje regionalne aktivnosti COX je pokazalo da se CA4 region u sklerotičnim hipokampusima karakteriše izraženim gubitkom neurona i pojavom krupnih neurona sa nekoliko puta većom somom u poređenju sa kontrolnim ćelijama istog regiona (slika 4.15N, O). Bojenje je dodatno pokazalo gusto raspoređena neuronska tela piramidalnih neurona u SP2 polju kontrolnih hipokampusa (slika 4.15C), dok je kod sklerotičnih hipokampusa ovaj raspored bio delimično (slika 4.15J) ili ekstremno narušen (slika 4.15K). Tela neurona sklerotičnog hipokampusa u SP3 (slika 4.15L, M, strelice) imaju slabiju histoheмиjsku reakciju u poređenju sa telima kontrolnih SP3 neurona (slika 4.15D, velike žute strelice). Primećuje se i gubitak aktivnosti u nastavcima oko SP3 neurona sklerotičnog hipokampusa u odnosu na kontrolni hipokampus (slika 4.15D, male žute strelice). Pored ovoga, *stratum lucidum* (mahovinasta vlakna) i nastavci oko preživelih tela piramidalnih neurona u SP3 su pokazali pad u aktivnosti COX enzima od oko 50% u odnosu na kontrolne hipokampuse (slika 4.12).

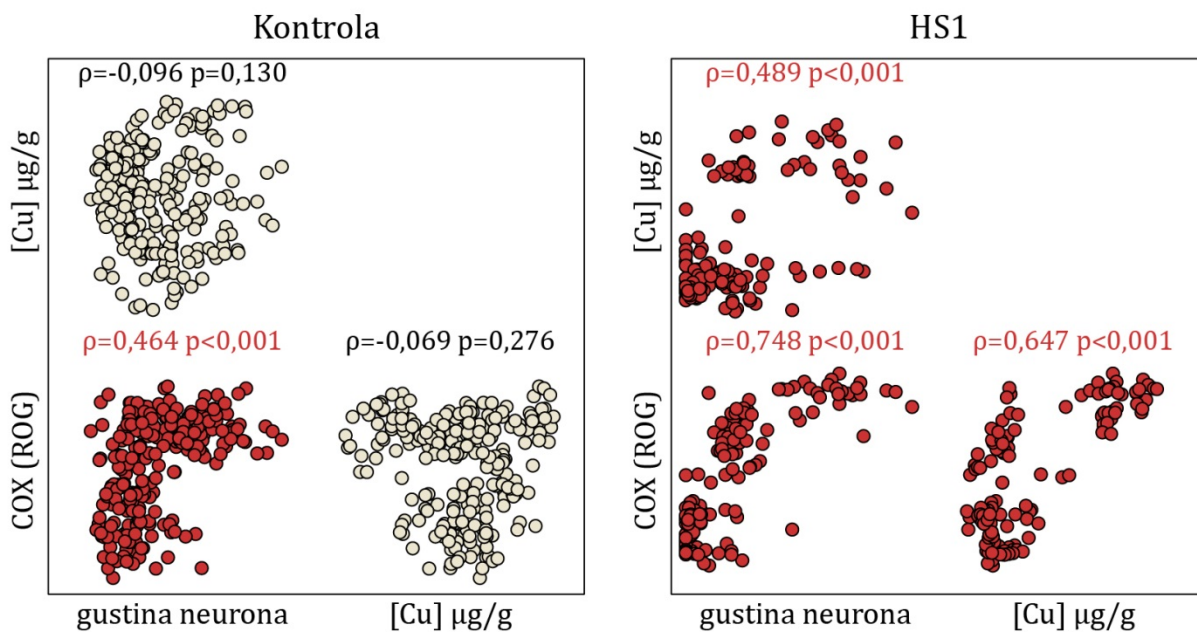
### 4.3.2. Korelacione analize gustine neurona, količine bakra i intenziteta aktivnosti COX

Konačno, nakon sprovedenih histoloških ispitivanja i utvrđenih kvantitativnih razlika u gustini piramidarnih neurona, koncentraciji bakra i intenzitetu aktivnosti COX, pristupilo se uporednoj korelativnoj analizi i dovođenju ova tri parametra u vezu u kontrolnim i u sklerotičnim HS1 hipokampusima. Uporedni histogrami gustine piramidarnih neurona, koncentracije bakra i intenziteta aktivnosti COX (slika 4.16) izrađeni su na osnovu jednakih, predefinisanih koraka duž anatomskih granica SP1–3 i SUB, koji se mogu videti na Nislovom bojenju na slici 4.12.



**Slika 4.16. Histogrami raspodele gustine tela piramidarnih neurona, količine bakra i intenziteta aktivnosti COX duž anatomskih granica SUB i SP1–3 kontrolnih (A) i HS1 hipokampusa (B).** Gustine tela piramidarnih neurona izražene su kao br. neurona po mm<sup>2</sup>. Jednaki koraci dužine 500 µm duž SUB i SP1–3 označeni su na x osama (i prikazani na Nislovom bojenju na slici 4.12). #, tačka oštećenja tkiva koja je isključena iz analize. ROG, relativna optička gustina; SUB, *subiculum*; SP1–3, *stratum pyramidale* u poljima *cornu Ammonis* 1–3; C1–3, interne oznake kontrolnih uzoraka; TLE16–18, interne oznake pacijenata (sklerotičnih hipokampusa).

Na osnovu dobijenih histograma, u kontrolnim hipokampusima se gustina neurona, prostorna distribucija koncentracije bakra i aktivnost COX čine ujednačenim duž celog SUB i SP1–3 (slika 4.16A). Sa druge strane, moguće je uočiti opšti pad gustine piramidarnih neurona karakterističan za HS1 tip skleroze, naročito u delu SP1 regiona, kao i da prostorna distribucija koncentracije bakra i aktivnosti COX prate ovaj trend gubitka ćelija, i to takođe prvenstveno u SP1 (slika 4.16B). Detaljnija veza ova tri parametra je dalje ispitana korelacionim analizama (slika 4.17).



**Slika 4.17. Dijagrami raspršenja sa koeficijentima korelacija i pripadajućim p vrednostima između gustine piramidalnih neurona, koncentracije bakra i aktivnosti COX kod kontrolnih i sklerotičnih hipokampusa.** Za analizu je korišćen Spirmanov  $\rho$  koeficijent korelacije. Crvenom bojom su istaknute statistički značajne korelacije. Gustina neurona je izražena kao broj ćelija po mm<sup>2</sup>. HS1, sklerotični hipokampusi tipa HS1; COX, citohrom c oksidaza; ROG, relativna optička gustina.

Histogramska zapažanja potvrđena su korelacionim analizama. Značajna korelacija uočena je između gustine neurona i aktivnosti COX i kod kontrola (umerena pozitivna korelacija) i HS1 (umereno visoka pozitivna korelacija). Dodatno su kod HS1 ustanovljene i umereno visoka pozitivna korelacija između koncentracije bakra i aktivnosti COX, i pozitivna korelacija umerenog nivoa između koncentracije bakra i gustine neuronskih tela (slika 4.17).

Nakon šire procene na celokupnim SUB i SP1-3, detaljnije je ispitana korelaciona veza između koncentracije bakra i aktivnosti COX u svakom od SP1-3 polja i SUB, pojedinačno (prilog 2). Na taj način je utvrđeno je da je kod sklerotičnih hipokampusa između ova dva parametra postojala značajna pozitivna korelacija umerenog nivoa, u svakom od ispitanih regiona (SUB:  $\rho = 0,405$ ; SP1:  $\rho = 0,463$ ; SP2:  $\rho = 0,500$  SP3:  $\rho = 0,543$ ), dok je ova veza izostala kod kontrolnih hipokampusa, kod kojih je uočena umerena, negativna korelacija u SP2 ( $\rho = -0,555$ ), čime je zaključena analiza.

V. Poglavlje

---

DISKUSIJA

Humana mTLE spregnuta sa HS, kao glavnim histopatološkim poremećajem koji je prati, predstavlja najučestaliji i najintenzivnije proučavan epileptički sindrom kod ljudi, koji se izdvaja sa jasnom kliničkom slikom (Tatum, 2012; Balestrini i sar., 2021). Najčešća patološka promena koja se uočava kod pacijenata sa mTLE otpornom na tretman farmakološkim agensima je upravo HS, koja podrazumeva strukturne promene u hipokampusu i reorganizaciju neuronskih veza. Glavno obeležje HS čini različit intenzitet masovnog propadanja piramidalnih neurona sa karakterističnim obrascima vezanim za CA polja, ali i patološka disperzija granularnih neurona u GD. Gubljenje piramidalnih neurona je često povezano sa reaktivnom astrogliozom (Blümcke i sar., 2012). Povrh toga, narušena homeostaza i metabolizam metala, posebno redoks aktivnih metala, su takođe uključeni u patologiju mTLE-HS. Ristić i sar. su pokazali da su ukupne koncentracije Cu i Mn u sklerotičnom hipokampusnom tkivu pacijenata smanjene u odnosu na kontrolne vrednosti (Ristić i sar., 2014), dok razlike nisu detektovane za Fe i Zn. Uključenost redoks procesa u patološke mehanizme epilepsije implicirana je kroz narušenu funkciju mitohondrija, oksidativna oštećenja i metaboličke poremećaje koji su primećeni u sklerotičnom hipokampusu kod ljudi i u animalnim modelima epilepsije (Zsurka i sar., 2010; Ristić i sar., 2015). Studija u kojoj su Ristić i sar. izvršili ispitivanje oksidativnog sistema u HS kod ljudi pokazala je opšte povećanje njegove aktivnosti ali i značajne promene u aktivnosti i količini nekih antioksidativnih enzima (Ristić i sar., 2015). Drastično su povećani količina i enzimaska aktivnost enzima za uklanjanje vodonik-peroksida (katalaze i glutation peroksidaze i reduktaze). Pored ovoga, u humanim sklerotičnim hipokampusima detektovan je i povećan nivo mitohondrijskog enzima mangan superoksid dismutaze u odnosu na kontrolne hipokampuse (Ristić i sar., 2015).

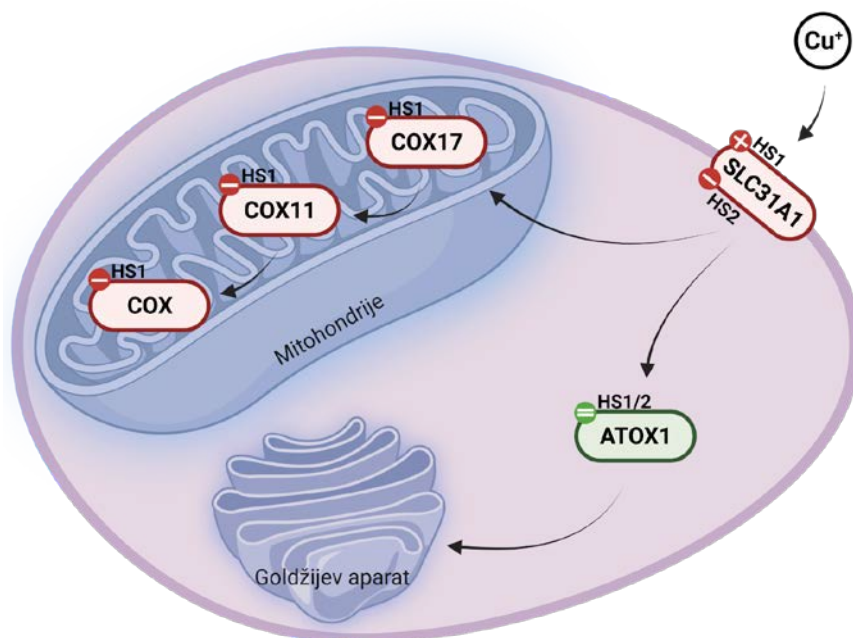
Upravo su promene u homeostazi metala i redoks procesa poslužile kao početna tačka za istraživanja u ovoj disertaciji, koja su organizovana tako da identifikuju potencijalnu vezu između skleroze i koncentracija metala (Fe, Zn, Mn i Cu) na nivou morfoloških i histoloških regiona i subregiona hipokampusa. U narednom koraku se pristupilo ispitivanju promena na nivou metabolizma bakra, kao metala koji je pokazao značajnu korelaciju sa sklerozom, a u cilju da se identifikuju kritične tačke u metalomu, počevši od membranskog transporta, unutarćelijskog transporta, do konačnih „korisnika“, odnosno metaloenzima kojima Cu služi kao kofaktor. Cilj je bio bolje razumevanje značaja i uloge redoks-aktivnih i esencijalnih metala (posebno bakra ali i gvožđa, mangana i cinka) i njihove uloge i veze sa patološkim karakteristikama HS u humanoju mTLE, što treba da omogući i razvoj novih terapijskih pristupa i lekova. Korišćene su moderne analitičke metode, a kombinovano je ispitivanje uzoraka pacijenata sa HS1 i HS2. Kao što je napomenuto, skleroza u HS1 tipu predstavlja viši nivo oštećenja u odnosu na sklerozu u HS2 i zahvaćen je skoro čitav CA, pa je ispitivanje ova dva tipa HS bilo od posebnog značaja za preciznije utvrđivanje veze između nivoa poremećaja strukture hipokampusa i prometa bakra. Lokalizovana i „umerenija“ HS2 je ispitivana kada je bilo neophodno histološko poređenje regiona zahvaćenih sklerozom sa regionima koji su ostali relativno očuvani, u okviru istog uzorka.

Ustanovljeno je da je koncentracija bakra značajno smanjena u regionu sa potpunim gubitkom neurona u CA1 u odnosu na subikulum koji je korišćen kao kontrolni region koji je analogan stratum pyramidale u CA regionima, u smislu da takođe poseduje piramidalne neurone kao primarne neuronske ćelije, nalazi se u nastavku CA ali je anatomski odvojen od njega, poseduje samo tri sloja i sačuvan je od skleroze i glioze (O'Mara i sar., 2009; Malmgren i Thom, 2012). Dalje je utvrđena značajna pozitivna korelacija između broja piramidalnih neurona i koncentracije Cu u HS, tj. gde je skleroza izraženija (ima manje neurona) bilo je i manje bakra.

Dovođenje manjka bakra u vezu sa epileptičnim napadima pokazano je i kroz studiju na miševima, nokautima za dopamin β-hidroksilazu, metaloenzim koji sadrži dva Cu jona i prevodi dopamin u noradrenalin. Šank i sar. su pokazali da ovi miševi, koji su izuzetno skloni epileptičnim napadima i nemaju noradrenalin, nemaju pozitivan odgovor na tretman napada valproatom, široko korišćenog leka za kontrolu epilepsije (Schank i sar., 2005). Moglo bi se pretpostaviti da deficit bakra može biti uključen u stvaranje epileptičnih napada mehanizmom ograničene aktivnosti dopamin β-hidroksilaze, pa posledičnim nedostatkom noradrenalina i ulogom u epileptogenezi. Pored toga, amiloid prekursorski protein za kog je ranije pokazano da se nagomilava u sklerotičnim hipokampusima pacijenata sa mTLE, vezuje za sebe bakar (Sheng i sar., 2002; Inestrosa i sar., 2005; Leong i sar., 2007).

Što se tiče uticaja prateće astroglioze na promet Cu pokazano je da astrociti imaju intenzivan metabolizam i visok kapacitet za akumulaciju ovog metala (Brown, 2004; Witt i sar., 2021). Glija vrši funkciju medijatora prenosa Cu od endotelijuma do neurona, i čak je opisana kao „sunđer za Cu“ (Bhattacharjee i sar., 2020). Osim toga, ustanovljeno je prisustvo pozitivne korelacije između broja astrocita i koncentracije Cu u više moždanih regiona (Ashraf i sar., 2019). Navedeni nalazi vezani za bakar i astrogliozu, amiloid prekursorski protein i dopamin β-hidroksilazu, zajedno sa registrovanom vezom između skleroze i Cu u ovoj disertaciji sugerišu da deficit Cu verovatno prethodi gubitku neurona.

Među različitim strukturnim delovima mozga, hipokampus pokazuje najviše koncentracije bakra (DeBenedictis i sar., 2020). Velika „potreba“ za Cu ukazuje da hipokampus ima razvijen i intenzivan metabolizam ovog metala, što ukazuje na njegov izražen značaj za funkcionisanje hipokampusa. Upravo je na nivou metaloma bilo važno identifikovati potencijalan problem, odnosno slabu tačku, te je u kontekstu metabolizma ispitivan put unosa i transporta ovog metala do ciljnog enzima. Svi dobijeni rezultati su sublimirani na slici 5.1. u smislu promena u prometu bakra u HS u odnosu na kontrolne/nesklerotične hipokampuse.



**Slika 5.1. Shematski prikaz promena u komponentama prometa bakra između kontrolnih i sklerotičnih (HS1 i HS2) hipokampusa.** SLC31A1: znak plus označava povećanje a znak minus smanjenje relativnog nivoa SLC31A1 u HS1 ili HS2 u odnosu na kontrolne uzorke. ATOX1: znak jednakosti označava nepromenjen relativni nivo ATOX1 šaperona. COX17, COX11 i COX: znak minus označava relativno smanjenje iRNK za šaperone COX11 i COX17, odnosno relativno smanjenje aktivnosti enzima COX u HS1. HS1/2, hipokampusna skleroza tip 1 i 2; SLC31A1, transporter za unos bakra (engl. *solute carrier family 31 member 1*); ATOX1, antioksidativni šaperon bakra 1; COX17, šaperon bakra za citohrom c oksidazu COX17; COX11, šaperon bakra za citohrom c oksidazu COX11; COX, citohrom c oksidaza kompleks. Sastvljeno pomoću <https://biorender.com/>

Hipokampusno tkivo kod HS1 je pokazalo značajno povećanu ekspresiju SLC31A1 u odnosu na kontrole. Dakle, intenzivno oštećenje tkiva u HS1 je povezano sa smanjenjem koncentracije bakra i povećanjem u nivou ključnog membranskog proteina za unos Cu. U HS1, povećanje ekspresije SLC31A1 predstavlja kompenzatorni mehanizam i zajedno sa ostalim uočenim promenama ukazuje na potpun gubitak homeostaze bakra. Ekspresija SLC31A1 se povećava kada postoji deficit Cu (Kuo i sar., 2006), što ukazuje da kod potpune skleroze (HS1) hipokampusno tkivo ne dobija dovoljne količine ovog metala usled narušene strukture i funkcije tkiva. Osim toga, pokazano je da prooksidativni uslovi odnosno reaktivne vrste kiseonika indukuju ekspresiju SLC31A1 (Chen i sar., 2020a). Smisao ovakvih promena je verovatno bezbedno uklanjanje Cu kako bi se sprečila njegoa intenzivna prooksidativna aktivnost (Spasojević i sar., 2010). S ovim u vezi, pokazano je da je tkivo u HS1 izloženo intenzivnom oksidativnom stresu (Ristić i sar., 2015) i može se pretpostaviti da i ovo doprinosi povećanoj ekspresiji SLC31A1. Konačno, treba istaći da je ekspresija SLC31A1 indukovana i u hipoksičnim uslovima (White i sar., 2009; Pourvali i sar., 2012), koji mogu biti povezani sa oksidativnim stresom (Murphy, 2008).

Smanjena ekspresija SLC31A1 transportera uočena je u HS2, koja se karakteriše lokalnim ograničenim propadanjem neurona u CA1 polju. Uporedno histološko ispitivanje Nislovog bojenja i imunohistohemijskog obeležavanja ovog transportera sugerisalo je njegovu pretežno neuronsku ekspresiju, kako u degenerisanim tako i u očuvanim nervnim ćelijama, ali su u manjoj meri registrovani i imunopozitivni depoziti koji mogu predstavljati ćelije glije, budući da je pokazano da se SLC31A1 eksprimira i na astrocitima i mikrogliji (Dringen i sar., 2013; Gromadzka i sar., 2020). Povrh toga, izgledalo je da ekspresija nije bila ograničena strogo na ćelijsku membranu već se imunopozitivni produkt uočavao i u citoplazmi, što je slučaj kada se dešava brza internalizacija transportera sa membrane ili recikliranje nazad u slučaju povišene potrebe ćelije za bakrom (Clifford i sar., 2016). Smanjenje ekspresije SLC31A1 u HS2 verovatno predstavlja autentičnu komponentu epileptogeneze gde se jasno može povući paralela sa Menkesovom bolešću u kojoj su konvulzije i drugi simptomi povezani upravo sa smanjenom ekspresijom važne komponente u transportu Cu. Hipokampusni neuroni poseduju unutarćelijski rezervoar labilnog (lako dostupnog, ali ne i slobodnog) bakra, koji, ako se smanji, dovodi do spontanog generisanja akcionih potencijala. Ovo se eksperimentalno može indukovati helatorima Cu ili smanjenjem ekspresije SLC31A1 (Dodani i sar., 2014; Ackerman i Chang, 2018). Poznati su primeri u kojima je helatorska terapija Vilsonove bolesti dovela do hipokupremije koja se manifestovala epileptičnim napadima (Benbir i sar., 2010; Kaleagasi i sar., 2013).

Nije sasvim jasno zbog čega dolazi do smanjene ekspresije SLC31A1 u HS2 ali može biti povezano sa drugim interesantnim a nedovoljno proučenim fenomenom koji se dešava u HS, a to je propadanje krvnih sudova (Ristić i sar., 2015). Naime, uočeno je da hipokampusi mTLE-HS pacijenata pokazuju narušenu vaskularizaciju. Gustina krvnih sudova je povećana u odnosu na zdrav hipokampus (Bratz, 1899), ali su krvni sudovi atrofični. Dve studije su na HS2 uočile značajnu redukciju funkcionalnih krvnih sudova od oko 70% u CA1 regionu koji je najviše izložen sklerotičnim procesima (Kastanauskaite i sar., 2009; Alonso-Nanclares i DeFelipe, 2014; Ristić i sar., 2015). Takođe je uočena pojačana ekspresija eritropoetinskih receptora u endotelu krvnih sudova u HS (Eid i sar., 2004). Funkcija ovih receptora u krvnim sudovima je protektivna, proliferativna i angiogena (Trincavelli i sar., 2013). Bakar je izuzetno značajan za angiogenezu, koja je doslovno stimulisana i uslovljena njegovim unosom u ćelije krvnih sudova (Harris, 2004; Narayanan i sar., 2013). Prema ovome, moguće je da hipokampusni neuroni u delimično očuvanom tkivu HS2 tipa skleroze smanjuju ekspresiju SLC31A1 da bi se omogućila angiogeneza u cilju nadomeštanja narušene vaskulature. U tkivu sa izrazitom sklerozom HS1 tipa dolazi do narušavanja metaboličkih procesa gde

nefunkcionalna vaskulatura dovodi i do smanjenja dostupnosti Cu ali i do promocije oksidativnog stresa i hipoksije, koji svi uzrokuju povećanu ekspresiju SLC31A1.

Uzevši ovo u obzir, moguće je da pad nivoa bakra u sklerotičnom hipokampusu predstavlja posledicu vaskularne komponente patogeneze. S druge strane, glukozni transporter, GLUT1, takođe pokazuje pojačanu ekspresiju u mikrovaskulaturi u HS (Cornford i sar., 1994), što ukazuje na povećanu potrebu za energijom, u skladu sa hiperekscitabilnošću hipokampusa u mTLE-HS. Moguće je i da vaskulatura najpre ojačava zbog hiperekscitabilnosti, a potom krvni sudovi „stradaju“ zajedno sa piramidalnim neuronima zbog intenzivne metaboličke aktivnosti. U tom slučaju bi se deficit bakra javio u prvoj fazi kao protektivni a kasnije kao propagirajući događaj u patogenezi. U takvoj patološkoj sekvenci, hiperekscitabilnost dovodi do oštećenja na vaskulaturi i neuronima, što neuroni delimično mogu da uspore smanjenim unosom bakra (Maureira i sar., 2015). Pokazano je da smanjena ekspresija SLC31A1 usporava neurodegenerativne procese u nekim drugim oboljenjima (Gou i sar., 2021). Narušena homeostaza bakra utiče na neuromodulatorne uloge koje ovaj metal ima u nervnom tkivu, odnosno hipokampusu, a koje obuhvataju snižavanje praga za genuz akcionog potencijala, pojačanje spontane ekscitabilnosti neurona i smanjenje inhibicije posredovane GABA<sub>A</sub> receptorima, kao i modulaciju signalizacije između neurona i glijskih ćelija (Maureira i sar., 2015; Kardos i sar., 2018). Ovo predstavlja osnovu progresije epileptogenih procesa u kojima je deficit bakra „dobar“ za umanjene oksidativnih oštećenja i neurodegenerativnih procesa, ali „loš“ za regulaciju ekscitabilnosti.

Dalje je ispitan unutarćelijski odgovor Cu šaperona i posledice deficita bakra u HS1. Nivo ekspresije ATOX1 nije bio izmenjen ni u HS1 ni u HS2 u odnosu na kontrolno tkivo. Ovo može da ukaže da zahtevi za sintezom različitih proteina zavisnih od bakra u Goldžijevom aparatu mogu da budu „pokriveni“ čak i malim količinama dostupnog bakra. S druge strane, ATOX1 posredno učestvuje i u izbacivanju Cu iz ćelije preko sličnih transportera kao i na Goldžijevom aparatu. Ekspresija ATOX1 je posebno visoka u piramidalnim neuronima hipokampusa u odnosu na druge ćelijske tipove i regione u mozgu (Naeve i sar., 1999). S tim u vezi, skleroza, odnosno gubitak piramidalnih neurona, bi trebalo da dovede do pada ATOX1 ekspresije u hipokampusu. Odsustvo takve promene se može objasniti time što njegova funkcija nije ograničena samo na transport Cu, odnosno činjenicom da nivo ATOX1 nije jednostavno regulisan dostupnošću bakra već i drugim faktorima. Zbog svoje konformacione strukture slične ferodoksinu i tri cisteinska ostatka, ovaj mali protein ima ulogu i u antioksidativnoj zaštiti, analogno funkciji glutationa (Hatori i Lutsenko, 2013). ATOX1 obavlja i funkciju transkripcionog faktora, odnosno regulatora transkripcije regulisane od strane bakra (Itoh i sar., 2008). Dakle, očekivani pad u nivou ATOX1 u HS može biti kompenzovan pojačanom ekspresijom indukovanom oksidativnim stresom i drugim faktorima.

Za razliku od ATOX1, druga važna grana u unutarćelijskom putu Cu koja vodi do mitohondrija je pretrpela značajne promene u HS1. U ovoj disertaciji, COX11 i COX17, šaperoni koji u mitohondrijama donose Cu do COX i omogućavaju sintezu ovog kompleksa, su pokazali smanjeni nivo transkripcije u HS1 u odnosu na kontrole. Nivo iRNK za COX11 je bio smanjen u regionima senzitivnim na sklerozu u epilepsiji, dok je nivo iRNK za COX17 pored ovih bio smanjen i u regionima koji su u epileptičnim hipokampusima otporniji na sklerozu, u odnosu na iste regione u kontrolnim hipokampusima. Posebno važan je nalaz da su i COX aktivnost i koncentracija bakra izrazito smanjeni u regionima senzitivnim na sklerozu. Ovo je u skladu sa nedavnom proteomskom studijom koja je pokazala značajno smanjenje nivoa COX subjedinice 6 u CA1-CA3 regionima hipokampusa mTLE-HS pacijenata. Količina ovog proteina je bila tri puta manja u odnosu na kontrole (Pires i sar., 2021). Dodatno, istraživanjima u ovoj disertaciji po prvi put je utvrđena snažna pozitivna korelacija COX aktivnosti u *stratum pyramidale* od SUB do CA4 regiona, sa lokalnim brojem neurona i sa koncentracijama bakra.



Ove veze nisu uočene u kontrolnim uzorcima. COX aktivnost je posebno intenzivna u neuronskim telima, što može objasniti vezu između smanjene COX aktivnosti i skleroze. Kako je COX enzimski kompleks ispitivan na HS1 tipu, navedene promene prati i pojačana ekspresija SLC31A1, što sugeriše da su povećanje nivoa Cu šaperona i smanjenje COX aktivnosti posledica deficita Cu na vanćelijskom nivou. Smanjenje nivoa iRNK za Cu šaperon COX17 u SP2, SP3 i SUB (regionima inače otpornim na sklerozu u epilepsiji) implicira na potpuni gubitak Cu homeostaze u hipokampusnom tkivu, što svakako doprinosi progresiji sklerotičnih procesa. Treba istaći da je COX17 prisutan i u međumembranskom prostoru mitohondrija i u citoplazmi, i da može igrati ulogu jednog od transportera za prenos Cu od ćelijske membrane do mitohondrija, kao i to da mitohondrije predstavljaju organele koje skladište Cu (Kim i sar., 2008). Ranija istraživanja pokazuju da manjak Cu dovodi do smanjene COX aktivnosti. Istraživanja na slučaju pacijenta obolelog od Menkesove bolesti pokazala su smanjenje koncentracije bakra u mozgu i skoro duplo smanjenu aktivnost COX u odnosu na kontrolno tkivo (Maehara i sar., 1983). Naknadne imunohistohemijske studije na post mortem uzorcima više različitih delova CNS-a drugog pacijenta, takođe obolelog od Menkesove bolesti, otkrile su smanjenu ekspresiju COX subjedinica MT-CO2 i COX4I1 u naizgled očuvanim neuronima (Sparaco i sar., 1993). Važno je napomenuti da su dve detaljne studije proteoma u HS ukazale na značajno generalno smanjenje proteina uključenih u oksidativnu fosforilaciju (Xiao i sar., 2021). *In vitro* je pokazano da nedostatak Cu izazvan helirajućim agensima dovodi do paralelnog smanjenja oksidativne fosforilacije i porasta glikolize, kao i posledičnog pada nivoa ATP-a kod tumorskih ćelija (Ishida i sar., 2013). Zajedno, rezultati pomenutih studija jasno ukazuju da deficit bakra narušava energetske metaboliizam, što najverovatnije leži u osnovi metaboličke disfunkcije hipokampusa u HS1.

Na ovom mestu se nameće dilema da li je smanjenje aktivnosti COX uzrok skleroze i hiperekscitabilnosti ili njihova posledica. Rezultati prikazani u ovoj disertaciji kao i rezultati ranijih studija ukazuju da su oba objašnjenja donekle tačna, odnosno da smanjena COX aktivnost nastaje kao posledica drugih promena, da bi, zatim, doprinela progresiji patogeneze. Holman i sar. su otkrili mutaciju u COX8A koja je dovela do smanjenja transkripta ovog gena pa posledično i manjka i nestabilnosti COX kompleksa kod pacijenta sa sindromom sličnim Lijevom, leukodistrofijom i teškom epilepsijom (Hallmann i sar., 2015). Manjak COX je povezan i sa epileptogenim zonama kod pacijenata sa fokalnom kortikalnom displazijom i pokazano je da doprinosi neuropatologiji ove bolesti (Miles i sar., 2015). Približno 50% osoba sa primarnim mitohondrijalnim oboljenjima, kao što je mioklonična epilepsija s "iskidanim mišićnim vlaknima", imaju epileptične napade (DiMauro i sar., 2002; Rahman, 2012). Epileptični napadi predstavljaju energetske zahtevne procese te je u tom kontekstu opisana sekundarna mitohondrijska disfunkcija kod više epileptičnih sindroma. Ova povezanost epileptičnih napada i sekundarne mitohondrijske disfunkcije može biti od pomoći za pronalaženje adekvatnog tretmana kod epileptičnih sindroma primarno uzrokovanih mitohondrijskom disfunkcijom i poremećajima COX (Zsurka i Kunz, 2015). Odatle se COX i mitohondrijska disfunkcija mogu pripisati hiperaktivnosti neurona i oksidativnim oštećenjima nastalim u epilepsiji. Kunc i sar. su utvrdili postojanje deficita mitohondrijskog kompleksa I kod mTLE-HS pacijenata što je sugerisalo da taj nalaz može biti deo patofiziološkog mehanizma koji dovodi do izmenjene ekscitabilnosti i selektivnog propadanja neurona (Kunz i sar., 2000). Šta više, poznato je da se u mTLE-HS mogu primetiti raznovrsni metabolički poremećaji kao što su interiktalni glukozni hipometabolizam (O'Brien i sar., 1997), tranzijentne promene u nivou NADPH tokom stimulacije neurona *ex vivo* (Kann i sar., 2005) i smanjenje koncentracije mitohondrijskog N-acetilaspargata (Pan i sar., 2008), koji mogu biti dovedeni u vezu sa disfunkcijom mitohondrija hipokampusa. Smanjenje aktivnosti COX kao i ispitivanih šaperona može biti povezano sa oksidativnim oštećenjima mitohondrija i mitofagijom. Disfunkcija i oksidativna oštećenja mitohondrija u epileptogenim fokusima u HS

su od ranije poznati i ogledaju se kroz nefunkcionalnost kompleksa I koji predstavlja osnovni izvor superoksid radikal-anjona u mitohondrijama, smanjen nivo akonitaze koja je posebno osetljiva na oksidativna oštećenja (Kunz i sar., 2000; Vielhaber i sar., 2008), kao i kroz povećanu aktivnost SOD2, ključnog mitohondrijskog antioksidativnog enzima (Ristić i sar., 2015). Mitofagija, koja predstavlja selektivnu formu autofagije zadužene za održavanje normalne funkcije mitohondrija putem uklanjanja oštećenih mitohondrija, je narušena u HS (Wu i sar., 2017). U skladu sa uočenim oštećenjima mitohondrija u HS je i nedavno objavljena proteomska studija u kojoj su ispitivane molekularne promene na nivou proteina u regionu DG hipokampusa mTLE-HS pacijenata i kontrolnih uzoraka, a koja je otkrila da je kod ove patologije prisutno značajno smanjenje nivoa nekoliko proteina koji čine subjedinice kompleksa I i kompleksa III respiratornog lanca (Xiao i sar., 2021).

Osim kroz spregu sa mitohondrijskim funkcijama, deficit Cu može imati i druge veze sa hiperekscitabilnošću i pojavom konvulzija, kao važnog simptoma HS. Uočeno je da neuroni pri depolarizaciji otpuštaju Cu u sinapse. Stimulacija hipokampusnih piramidalnih neurona sa NMDA indukuje premeštanje Cu eksportera ATP7A sa Goldžijevog aparata na ćelijsku membranu što dovodi do izbacivanja Cu iz ćelije (Schlief i sar., 2005). Postoje istraživanja koja ukazuju na moguće vezivanje Cu za receptore, uključujući i one za glutamat i GABA-u (Ackerman i Chang, 2018). Studije koje su sprovele Šaronova i sar. su pokazale da je  $\text{Cu}^{2+}$  potentan inhibitor koji se vezuje za  $\text{GABA}_A$  receptora u izolovanim Purkinje neuronima pacova sa  $\text{IC}_{50}$  koncentracijom od oko 35 nM (Šaronova i sar., 1998, 2000) dok je to kasnije funkcionalno pokazano elektrofiziološki na pacovskim hipokampusima (Maureira i sar., 2015). Pored toga, moguće je da  $\text{Cu}^+$  koji se otpušta u sinapsu kroz svoju oksidaciju pokreće redoks reakcije koje služe u procesima razgradnje neurotransmitera, ili  $\text{Cu}^{2+}$  formira komplekse sa neurotransmiterima (Bottari i sar., 1989; Hakimi i Aliabadi, 2012), i time ih inaktivira. Slično je nedavno pokazano za  $\text{Fe}^{3+}$  i adrenalin, gde formiranje kompleksa sprečava aktivaciju adrenalinskih receptora (Korać Jačić i sar., 2020).

Doprinos ove disertacije, osim rasvetljavanja metabolizma bakra u HS, se sastoji i u veoma važnim informacijama o strukturi humanog hipokampusa u kontekstu raspodele ovog kao i drugih metala u HS. Značaj precizne prostorne lokalizacije metala i njihove funkcionalne dostupnosti u humanom hipokampusu je veliki. Hipokampus ima izuzetno složenu strukturu koja je povezana sa njegovom funkcijom. Samo su se dve preliminarne LA-ICP-MS studije bavile prostornom distribucijom metala u humanom hipokampusu i HS (Becker i sar., 2011; Lam i sar., 2014), sa mnogo manje detalja nego što je ovde izneto. Humani hipokampus ispoljava visok nivo prostorne organizacije metala. Rezultati prikazani u ovoj disertaciji proizvod su temeljne histološke analize u oslikavanju prostorne raspodele Fe, Zn, Mn i Cu na koronalnim presecima humanih sklerotičnih hipokampusa, hirurški odstranjenih u okviru terapijske resektivne hirurgije u mTLE (Baščarević i sar., 2011). Anatomski obrasci distribucije odgovaraju prethodno sprovedenim istraživanjima na sličnim uzorcima (Becker i sar., 2011). Unapređenje je učinjeno na polju kalibracije i izrade standarda (Šala i sar., 2017). Mape cinka su u skladu sa prethodnim studijama i odgovaraju distribuciji cinka na Timovom bojenju hipokampusa (Cassell i Brown, 1984; Babb i sar., 1991; Bahh i sar., 1999; Proper i sar., 2000; Mitsuya i sar., 2009). Akumulacija cinka uočena je u zonama mahovinastih vlakana, a zabeležen je i padajući gradijent koncentracije od CA4 do CA1. Prostorna raspodela gvožđa izgleda tako da prati rute hipokampusnih arterijskih i venskih krvnih sudova. Drugim rečima, poreklo visokih koncentracija gvožđa u mapama se može vrlo verovatno pripisati tragovima krvi. Sulkusne vene unutar hipokampusa prolaze putem vestigijalnog hipokampusnog sulkusa koji naleže na *stratum moleculare*. Subependimalne unutrašnje hipokampusne vene odvođe krv iz CA2, CA1 i susednog SUB (Tatu i Vuillier, 2014). One prolaze *alveus* što može objasniti jak signal gvožđa u delovima tog regiona. Velike ventralne unutrašnje arterije se granaju u subikulumu sa glavnim putem u SL i sa terminalnim ramifikacijama u CA2. Najgušća

vaskularizacija u CA regionima i GD je u SM (Duvernoy i sar., 2013). Nažalost, previsoke količine gvožđa u krvnim sudovima otežavaju donošenje zaključaka o povećanju ili smanjenju ovog elementa u nervnom tkivu *per se*. Velika varijansa gvožđa razlog je statistički neznajčajnog pada u zoni potpunog gubitka neurona u hipokampusima. Podaci dobijeni za Zn i Fe odgovaraju rezultatima koji su dobijeni u prethodno izvedenoj studiji na ukupnim koncentracijama metala u hipokampusnom tkivu (Ristić i sar., 2014). S druge strane ranije uočen pad u koncentraciji Mn (Ristić i sar., 2014), ovde se oslikava u korelaciji između regionalne koncentracije Mn i broja neurona, odnosno stepena skleroze. Niske koncentracije Mn mogu biti u vezi sa smanjenjem ukupnog nivoa i padom aktivnosti manganovog metaloenzima, glutamin sintaze, koji je uočen u sklerotičnim hipokampusima. Smanjenje nivoa Mn u regionima sa potpunom, odnosno izraženom sklerozom, može biti povezano sa izrazito smanjenom ekspresijom glutamin sintaze koja je opisana u mTLE (Eid i sar., 2012) i ekskluzivno se eksprimira u astrocitima (Papageorgiou i sar., 2018). Eid i sar. su pokazali da je deficit ovog enzima posebno izražen u zonama sa potpunim gubitkom neurona i pretpostavili da je zbog smanjene ekspresije glutamin sintaze u astrocitima narušeno preuzimanje glutamata iz vanćelijskog prostora te dolazi do njegovog nagomilavanja, neurotoksičnosti i stvaranja epileptičnih napada u mTLE (Eid i sar., 2012). U animalnom modelu epilepsije je uočeno da je nivo Mn u mozgu smanjen nakon indukcije konvulzija (Gonzalez-Reyes i sar., 2007). S druge strane, nivo SOD2 (manganoenzima) u sklerotičnim hipokampusima je povećan što ukazuje na stanje visokog oksidativnog stresa i disfunkcije mitohondrija (Ristić i sar., 2015). Važno je reći da Cu i Mn (kao i Fe i Zn) koriste isti SLC11A2 transporter, tako da su im metabolizmi spregnuti u izvesnoj meri (Arredondo i sar., 2003). Uloga Mn u HS i epileptogenezi svakako predstavlja atraktivnu temu koja zahteva dalja istraživanja.

Sveobuhvatno posmatrano, ovde prikazani rezultati ukazuju na jaku vezu između narušene homeostaze bakra i skleroze u mTLE-HS i daju kontekst za razvoj inovativne farmakološke terapije, pre svega u smislu povećanja koncentracije Cu koja bi bila dostupna neuronima u hipokampusu. Poznato je da tretman Menkesove bolesti hidrofiličnim suplementima bakra, kao što je bakar histidinat (oznaka leka CUTX-101), nije dao zadovoljavajuće rezultate (Kaler i sar., 2008). Međutim, problem je u tome što kompleksi bakra teško mogu da stignu do svih tkiva, a pristup krvotoka moždanom tkivu je posebno regulisan višestrukim barijerama. S druge strane, aplikacija bakra u velikim količinama bi bila toksična za ćelije, posebno na mestu aplikacije zbog njegove prooksidativne aktivnosti (Spasojević i sar., 2010). Kao nova strategija za tretiranje oboljenja koja su povezana sa deficitom bakra predložena je upotreba lipofilnih molekula koji mogu da vežu Cu u vanćelijskom prostoru i prebace ga u ćelije (Gohil, 2021). Osim toga, novi sintetisani nosači bakra su u razvoju, a neki se trenutno ispituju u kliničkim studijama u drugim neurološkim oboljenjima povezanim sa bakrom (Nikseresht i sar., 2020). Dobijene informacije bi u perspektivi bile veoma značajne za identifikaciju novih neinvanzivnih metoda lečenja farmakorezistentne mTLE kao i u razvoju profilakse za sprečavanje nastanka farmakorezistentnosti, u cilju odlaganja ili potpunog izbegavanja invazivnog operativnog tretmana bolesti.

VI. Poglavlje

ZAKLJUČCI

S obzirom na definisane ciljeve i u skladu sa obradom i tumačenjem dobijenih rezultata ove doktorske disertacije, u pogledu raspodele i koncentracije metala u hipokampusu izvedeni su sledeći zaključci:

1. Histološka distribucija bakra u sklerotičnim hipokampusima pacijenata sa mTLE-HS u oba tipa HS pokazuje visok nivo prostorne organizacije ovog metala koja je u tesnoj vezi sa rasporedom regiona, subregiona i slojeva hipokampusa. Bakar se nalazi u višim koncentracijama u regionima koji dominantno sadrže tela neurona, a nižim u regionima neuropila. Bakar se u najvećoj meri nalazi u SUB, očuvanom regionu (sa telima piramidnih neurona) u oba tipa HS, u odnosu na ostale regione hipokampusa koji pokazuju niže koncentracije ovog metala.
2. Koncentracije bakra se nalaze u značajnoj, pozitivnoj korelaciji sa gustinom tela piramidnih neurona u CA1 polju kao regionu sklerotičnog hipokampusa koji je najosetljiviji na sklerozu kod mTLE pacijenata. Dodatno, u podoblasti potpunog gubitka neurona u SP1, uočene su značajno manje koncentracije bakra u odnosu na SUB, region koji je rezistentan na gubitak neurona, u oba tipa HS, što nije bio slučaj sa gvožđem, cinkom i manganom.
3. Razlike u koncentracijama gvožđa i cinka na anatomskom nivou regiona i slojeva odgovaraju normalnim fiziološkim osobenostima odgovarajućih delova hipokampusa. Veće koncentracije gvožđa su zabeležene u oblastima kroz koje prolaze glavni putevi krvnih sudova, dok su povećane koncentracije cinka uočene u zonama prolaska mahovinastih vlakana granularnih Zn-glutamatskih neurona. Koncentracije Mn pokazuju pozitivnu korelaciju sa gustinom piramidnih neurona tj. stepenom skleroze hipokampusa.

U pogledu komponenti koje učestvuju u ćelijskom i mitohondrijskom prometu bakra izvedeni su sledeći zaključci:

4. Ukupni relativni nivo ključnog transportera za unos bakra u ćelije, SLC31A1 zavisen je od tipa HS i pokazuje dvojake promene: povećan je u intenzivnoj sklerozi (HS1) a smanjen u lokalizovanoj sklerozi (HS2). SLC31A1 je u sklerotičnim hipokampusima lokalizovan dominantno u neuronima, kako u aktivnoj formi na ćelijskoj membrani tako i u internalizovanoj formi u citoplazmi.
5. Ukupni relativni nivo ATOX1 šaperona je nepromenjen u oba tipa HS u odnosu na kontrolne uzorke.
6. Ekspresija šaperonskih proteina za umetanje bakra u COX enzimski kompleks (COX11 i COX17) bila je značajno smanjena u hipokampusnim regionima koji su u epilepsiji osetljivi na sklerozu u odnosu na fiziološke uslove.

Na osnovu uporedne analize aktivnosti COX i koncentracije bakra u različitim slojevima HS i kontrolnih hipokampusa izvedeni su sledeći zaključci:

7. Enzimski kompleks COX na ćelijskom nivou pokazuje lokalnu raspodelu aktivnosti koja je najizraženija u telima i dendritima piramidnih neurona. Smanjena aktivnost ovog

enzima se detektuje u SP1 i CA4, hipokampusnim regionima koji su najviše pogođeni sklerozom.

8. U SP2 i SP3, regionima koji su u HS manje osetljivi na sklerozu pa samim tim imaju očuvanu populaciju neurona, nije zabeležen pad aktivnosti COX, dok je koncentracija bakra bila značajno manja u odnosu na kontrolne uzorke.
9. Postoji značajna pozitivna korelacija između koncentracije bakra i aktivnosti COX u HS.
10. Korelacione analize brojnosti neurona, raspodele bakra i raspodele aktivnosti COX u regionima piramidalnih neurona mTLE-HS1 hipokampusa i odgovarajućim kontrolnim uzorcima jasno sugerišu povezanost ova tri parametra.

Na osnovu navedenih pojedinačnih zaključaka, može se izvesti sledeći opšti zaključak:

Humani sklerotični hipokampus kod pacijenata koji boluju od mTLE pokazuje karakteristične obrasce raspodele koncentracija bakra, kao i gvožđa, cinka i mangana u odnosu na svoje anatomske regione, polja i slojeve. Pored toga, u humanoju mTLE-HS dolazi do promena u lokalnim koncentracijama bakra u slojevima i regionima sklerotičnog hipokampusa, za šta se odgovornost ne može pripisati isključivo patološkoj reorganizaciji glavnih ćelijskih populacija (piramidalnih neurona u CA i granularnih neurona u GD), već su te promene u koncentracijama bakra verovatno aktivni učesnik u razvoju hiperekscitabilnosti i konvulzija kao i histopatološka komponenta u razvoju skleroze. Uočene promene na nivou bakra kod humanog sklerotičnog hipokampusa su u skladu sa uočenim promenama na nivou ćelijskih transportnih puteva ovog metala, pre svega SLC31A1 kao membranskog transportera za unos bakra u citosol. Dodatno, izmenjena homeostaza Cu, u sprezi sa promenama u mitohondrijskom metabolizmu ovog metala na nivou biogeneze i aktivnosti enzimskog kompleksa COX, takođe može imati ulogu u razvoju i progresiji mTLE-HS. Imajući sve pomenuto u vidu, istraživanja u sklopu ove disertacije daju veoma važne podatke o ulozi bakra kod HS. Načinjen je i korak napred u tumačenju rezultata dobijenih sa metalnih mapa bakra iz sklerotičnog hipokampusa. U perspektivi, dobijeni rezultati mogu biti od koristi za razvoj novih terapijskih pristupa u lečenju epilepsije temporalnog režnja kao i razvoja profilakse za sprečavanje nastanka otpornosti na postojeće lekove, kako bi se odgodio ili u potpunosti izbegao operativni pristup.

## VII. Poglavlje

---

# LITERATURA

- Abduriyim, A., i Kitawaki, H. (2006). Applications of laser ablation—inductively coupled plasma—mass spectrometry (LA-ICP-MS) to gemology. *Gems and Gemology*, 42(2), 98–118.
- Ackerman, C. M., i Chang, C. J. (2018). Copper signaling in the brain and beyond. *The Journal of Biological Chemistry*, 293(13), 4628–4635.
- Ackerman, C. M., Lee, S., i Chang, C. J. (2016). Analytical methods for imaging metals in biology: From transition metal metabolism to transition metal signaling. *Analytical Chemistry*, 89(1), 22–41.
- Allouche-Arnon, H., Tirukoti, N. D., i Bar-Shir, A. (2017). MRI-based sensors for in vivo imaging of metal ions in biology. *Israel Journal of Chemistry*, 57(9), 843–853.
- Alonso-Nanclares, L., i DeFelipe, J. (2014). Alterations of the microvascular network in the sclerotic hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsy and Behavior*, 38, 48–52.
- Altarelli, M., Ben-Hamouda, N., Schneider, A., i Berger, M. M. (2019). Copper deficiency: Causes, manifestations, and treatment. *Nutrition in Clinical Practice*, 34(4), 504–513.
- Arredondo, M., Muñoz, P., Mura, C. V., i Núñez, M. T. (2003). DMT1, a physiologically relevant apical Cu<sup>1+</sup> transporter of intestinal cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 284(6), C1525–C1530.
- Ashraf, A., Michaelides, C., Walker, T. A., Ekonomou, A., Suessmilch, M., Sriskanthanathan, A., Abraha, S., Parkes, A., Parkes, H. G., Geraki, K., i So, P.-W. (2019). Regional distributions of iron, copper and zinc and their relationships with glia in a normal aging mouse model. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 11, 351.
- Avila, D. S., Puntel, R. L., i Aschner, M. (2013). Manganese in health and disease. In A. Sigel, H. Sigel, i R. Sigel (Eds.), *Interrelations between Essential Metal Ions and Human Diseases. Metal Ions in Life Sciences*, vol 13. (pp. 199–227). Springer, Dordrecht.
- Babb, T. L., Kupfer, W. R., Pretorius, J. K., Crandall, P. H., i Levesque, M. F. (1991). Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentata. *Neuroscience*, 42(2), 351–363.
- Bahh, B. E., Lespinet, V., Lurton, D., Coussemaq, M., Salle, G. L. G. L., i Rougier, A. (1999). Correlations between granule cell dispersion, mossy fiber sprouting, and hippocampal cell loss in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 40(10), 1393–1401.
- Baker, Z. N., Cobine, P. A., i Leary, S. C. (2017). The mitochondrion: a central architect of copper homeostasis. *Metallomics*, 9(11), 1501–1512.
- Balestrini, S., Arzimanoglou, A., Blümcke, I., Scheffer, I. E., Wiebe, S., Zelano, J., i Walker, M. C. (2021). The aetiologies of epilepsy. *Epileptic Disorders*, 23(1), 1–16.
- Bandmann, O., Weiss, K. H., i Kaler, S. G. (2015). Wilson's disease and other neurological copper disorders. *The Lancet Neurology*, 14(1), 103–113.
- Barnham, K. J., i Bush, A. I. (2014). Biological metals and metal-targeting compounds in major neurodegenerative diseases. *Chem. Soc. Rev.*, 43(19), 6727–6749.
- Baščarević, V. Lj. (2014). Značaj prognostičkih faktora ranog postoperativnog ishoda hirurški lečenih temporalnih farmakorezistentnih epilepsija [Doktorska disertacija].
- Baščarević, V., Samardžić, M., Đurović, B., Mićović, M., Rasulić, L., Cvrkota, I., Jovanović, I., i Nagulić, M. (2011). Preoperative evaluation of pharmacoresistant epilepsy. *Zdravstvena Zastita*, 40(6), 58–70.
- Baulac, M. (2015). MTLE with hippocampal sclerosis in adult as a syndrome. *Revue Neurologique*, 171(3), 259–266.
- Becker, J. S. (2013). Imaging of metals in biological tissue by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS): state of the art and future developments. *Journal of Mass Spectrometry*, 48(2), 255–268.



- Becker, J. S., Matusch, A., Becker, J. S., Wu, B., Palm, C., Becker, A. J., i Salber, D. (2011). Mass spectrometric imaging (MSI) of metals using advanced BrainMet techniques for biomedical research. *International Journal of Mass Spectrometry*, 307(1-3), 3–15.
- Becker, J. S., Matusch, A., Palm, C., Salber, D., Morton, K. A., i Becker, J. S. (2010). Bioimaging of metals in brain tissue by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) and metallomics. *Metallomics*, 2(2), 104–111.
- Becker, J. S., Zoriy, M., Przybylski, M., i Becker, J. S. (2007). High resolution mass spectrometric brain proteomics by MALDI-FTICR-MS combined with determination of P, S, Cu, Zn and Fe by LA-ICP-MS. *International Journal of Mass Spectrometry*, 261(1), 68–73.
- Becker, J. S., Zoriy, M. V., Pickhardt, C., Palomero-Gallagher, N., i Zilles, K. (2005). Imaging of copper, zinc, and other elements in thin section of human brain samples (hippocampus) by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 77(10), 3208–3216.
- Benbir, G., Gunduz, A., Ertan, S., i Ozkara, C. (2010). Partial status epilepticus induced by hypocupremia in a patient with Wilson's disease. *Seizure*, 19(9), 602–604.
- Berg, A. T., i Shinnar, S. (1991). The risk of seizure recurrence following a first unprovoked seizure: A quantitative review. *Neurology*, 41(7), 965–965.
- Bhattacharjee, A., Ghosh, S., Chatterji, A., i Chakraborty, K. (2020). Neuron-glia: Understanding cellular copper homeostasis, its cross-talk and their contribution towards neurodegenerative diseases. *Metallomics*, 12(12), 1897–1911.
- Blaabjerg, M., i Zimmer, J. (2007). The dentate mossy fibers: structural organization, development and plasticity. *Progress in Brain Research*, 163, 85–107.
- Bleackley, M. R., i MacGillivray, R. T. A. (2011). Transition metal homeostasis: From yeast to human disease. *BioMetals*, 24(5), 785–809.
- Blümcke, I., Coras, R., Miyata, H., i Özkara, C. (2012). Defining clinico-neuropathological subtypes of mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Brain Pathology*, 22(3), 402–411.
- Blümcke, I., Thom, M., Aronica, E., Armstrong, D. D., Bartolomei, F., Bernasconi, A., Bernasconi, N., Bien, C. G., Cendes, F., Coras, R., Cross, J. H., Jacques, T. S., Kahane, P., Mathern, G. W., Miyata, H., Moshé, S. L., Oz, B., Özkara, Ç., Perucca, E., i Sisodiya, S. (2013). International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: A Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia*, 54(7), 1315–1329.
- Blümcke, I., Thom, M., i Wiestler, O. D. (2002). Ammon's horn sclerosis: A maldevelopmental disorder associated with temporal lobe epilepsy. *Brain Pathology*, 12(2), 199–211.
- Boal, A. K., i Rosenzweig, A. C. (2009). Structural biology of copper trafficking. *Chemical Reviews*, 109(10), 4760–4779.
- Bolognin, S., Drago, D., Messori, L., i Zatta, P. (2009). Chelation therapy for neurodegenerative diseases. *Medicinal Research Reviews*, 29(4), 547–570.
- Bost, M., Houdart, S., Oberli, M., Kalonji, E., Huneau, J.-F., i Margaritis, I. (2016). Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 35, 107–115.
- Bottari, E., Festa, M. R., i Jasionowska, R. (1989). Copper(II) complexes with aspartate and glutamate. *Polyhedron*, 8(8), 1019–1027.
- Boulet, A., Vest, K. E., Maynard, M. K., Gammon, M. G., Russell, A. C., Mathews, A. T., Cole, S. E., Zhu, X., Phillips, C. B., Kwong, J. Q., Dodani, S. C., Leary, S. C., i Cobine, P. A. (2018). The mammalian phosphate carrier SLC25A3 is a mitochondrial copper transporter required for cytochrome c oxidase biogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 293(6), 1887–1896.

- Bourens, M., Boulet, A., Leary, S. C., i Barrientos, A. (2014). Human COX20 cooperates with SCO1 and SCO2 to mature COX2 and promote the assembly of cytochrome c oxidase. *Human Molecular Genetics*, 23(11), 2901–2913.
- Brancaccio, D., Gallo, A., Piccioli, M., Novellino, E., Ciofi-Baffoni, S., i Banci, L. (2017). [4Fe-4S] cluster assembly in mitochondria and its impairment by copper. *Journal of the American Chemical Society*, 139(2), 719–730.
- Bratz, E. (1899). Ammonshornbefunde bei epileptischen. *Archiv Für Psychiatrie Und Nervenkrankheiten*, 31(3), 820–836.
- Brodie, M. J., Barry, S. J. E., Bamagous, G. A., Norrie, J. D., i Kwan, P. (2012). Patterns of treatment response in newly diagnosed epilepsy. *Neurology*, 78(20), 1548–1554.
- Bromfield, E. B., Cavazos, J. E., i Sirven, J. I. (Eds.). (2006). Chapter 1, Basic Mechanisms Underlying Seizures and Epilepsy. In *An Introduction to Epilepsy* [Internet]. American Epilepsy Society.
- Brown, D. R. (2004). Role of the prion protein in copper turnover in astrocytes. *Neurobiology of Disease*, 15(3), 534–543.
- Bund, T., Boggs, J. M., Harauz, G., Hellmann, N., i Hinderberger, D. (2010). Copper uptake induces self-assembly of 18.5 kDa myelin basic protein (MBP). *Biophysical Journal*, 99(9), 3020–3028.
- Burdette, S. C., i Lippard, S. J. (2003). Meeting of the minds: Metalloneurochemistry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(7), 3605–3610.
- Camakaris, J., Voskoboinik, I., i Mercer, J. F. (1999). Molecular mechanisms of copper homeostasis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 261(2), 225–232.
- Carter, K. P., Young, A. M., i Palmer, A. E. (2014). Fluorescent sensors for measuring metal ions in living systems. *Chemical Reviews*, 114(8), 4564–4601.
- Cascino, G. D., Sirven, J. I., i Tatum, W. O. (Eds.). (2021). *Epilepsy* (2nd ed.). Wiley-Blackwell.
- Cassell, M. D., i Brown, M. W. (1984). The distribution of Timm's stain in the nonsulphide-perfused human hippocampal formation. *The Journal of Comparative Neurology*, 222(3), 461–471.
- Cendes, F., Sakamoto, A. C., Spreafico, R., Bingaman, W., i Becker, A. J. (2014). Epilepsies associated with hippocampal sclerosis. *Acta Neuropathologica*, 128(1), 21–37.
- Chen, A., Jiang, P., Zeb, F., Wu, X., Xu, C., Chen, L., i Feng, Q. (2020a). EGCG regulates CTR1 expression through its pro-oxidative property in non-small-cell lung cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*, 235(11), 7970–7981.
- Chen, S., Chen, Y., Zhang, Y., Kuang, X., Liu, Y., Guo, M., Ma, L., Zhang, D., i Li, Q. (2020b). Iron metabolism and ferroptosis in epilepsy. *Frontiers in Neuroscience*, 14.
- Choo, X. Y., Alukaidey, L., White, A. R., i Grubman, A. (2013). Neuroinflammation and copper in Alzheimer's disease. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2013, 1–12.
- Clifford, R. J., Maryon, E. B., i Kaplan, J. H. (2016). Dynamic internalization and recycling of a metal ion transporter: Cu homeostasis and hCTR1, the human Cu<sup>+</sup> uptake system. *Journal of Cell Science*, 129(8), 1711–1721.
- Cobine, P. A., Moore, S. A., i Leary, S. C. (2021). Getting out what you put in: Copper in mitochondria and its impacts on human disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1868(1), 118867.
- Collins, J. F., Prohaska, J. R., i Knutson, M. D. (2010). Metabolic crossroads of iron and copper. *Nutrition Reviews*, 68(3), 133–147.
- Cornford, E. M., Hyman, S., i Swartz, B. E. (1994). The human brain GLUT1 glucose transporter: Ultrastructural localization to the blood–brain barrier endothelia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 14(1), 106–112.
- Crichton, R. R., i Ward, R. J. (2013). *Metal-based neurodegeneration: from molecular mechanisms to therapeutic strategies*. John Wiley and Sons.

- Crisponi, G., Nurchi, V. M., Gerosa, C., Fanni, D., Nemolato, S., i Faa, G. (2012). Copper uptake and trafficking in the brain. In W. Linert i H. Kozłowski (Eds.), *Metal Ions in Neurological Systems* (pp. 47–63). Springer-Verlag.
- Crowley, J. D., Traynor, D. A., i Weatherbum, D. C. (2000). Enzymes and proteins containing manganese: An overview. In A. Sigel i H. Sigel (Eds.), *Metal Ions in Biological Systems*, vol 37. (pp. 209–278). Marcel Dekker, Inc.
- Davies, K. M., Bohic, S., Carmona, A., Ortega, R., Cottam, V., Hare, D. J., Finberg, J. P. M., Reyes, S., Halliday, G. M., Mercer, J. F. B., i Double, K. L. (2014). Copper pathology in vulnerable brain regions in Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, 35(4), 858–866.
- Davies, K. M., Hare, D. J., Cottam, V., Chen, N., Hilgers, L., Halliday, G., Mercer, J. F. B., i Double, K. L. (2013). Localization of copper and copper transporters in the human brain. *Metallomics*, 5(1), 43–51.
- DeBenedictis, C. A., Raab, A., Ducie, E., Howley, S., Feldmann, J., i Grabrucker, A. M. (2020). Concentrations of essential trace metals in the brain of animal species—a comparative study. *Brain Sciences*, 10(7), 460.
- Deibel, M. A., Ehmann, W. D., i Markesbery, W. R. (1996). Copper, iron, and zinc imbalances in severely degenerated brain regions in Alzheimer's disease: possible relation to oxidative stress. *Journal of the Neurological Sciences*, 143(1-2), 137–142.
- Desai, V., i Kaler, S. G. (2008). Role of copper in human neurological disorders. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88(3), 855S858S.
- Devinsky, O., Vezzani, A., Najjar, S., De Lanerolle, N. C., i Rogawski, M. A. (2013). Glia and epilepsy: excitability and inflammation. *Trends in Neurosciences*, 36(3), 174–184.
- DiMauro, S., Hirano, M., Kaufmann, P., Tanji, K., i Sano, M. (2002). Clinical features and genetics of myoclonic epilepsy with ragged red fibers. *Advances in Neurology*, 89, 217–229.
- Doboszewska, U., Młyniec, K., Właż, A., Poleszak, E., Nowak, G., i Właż, P. (2019). Zinc signaling and epilepsy. *Pharmacology and Therapeutics*, 193, 156–177.
- Dodani, S. C., Firl, A., Chan, J., Nam, C. I., Aron, A. T., Onak, C. S., Ramos-Torres, K. M., Paek, J., Webster, C. M., Feller, M. B., i Chang, C. J. (2014). Copper is an endogenous modulator of neural circuit spontaneous activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(46), 16280–16285.
- Dressler, V. L., Müller, E. I., i Pozebon, D. (2018). Bioimaging Metallomics. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 139–181.
- Dringen, R., Scheiber, I. F., i Mercer, J. F. B. (2013). Copper metabolism of astrocytes. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 5, 9.
- Duvernoy, H. M., Cattin, F., i Risold, P.-Y. (2013). *The human hippocampus : Functional anatomy, vascularization and serial sections with MRI* (4th ed.). Springer.
- Eid, T., Behar, K., Dhaher, R., Bumanglag, A. V., i Lee, T.-S. W. (2012). Roles of glutamine synthetase inhibition in epilepsy. *Neurochemical Research*, 37(11), 2339–2350.
- Eid, T., Brines, M. L., Cerami, A., Spencer, D. D., Kim, J. H., Schweitzer, J. S., Ottersen, O. P., i De Lanerolle, N. C. (2004). Increased expression of erythropoietin receptor on blood vessels in the human epileptogenic hippocampus with sclerosis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 63(1), 73–83.
- Eid, T., Williamson, A., Lee, T.-S. W., Petroff, O. A., i De Lanerolle, N. C. (2008). Glutamate and astrocytes—Key players in human mesial temporal lobe epilepsy? *Epilepsia*, 49, 42–52.
- Eisses, J. F., i Kaplan, J. H. (2002). Molecular characterization of hCTR1, the human copper uptake protein. *Journal of Biological Chemistry*, 277(32), 29162–29171.
- Engel, J. (2001). Mesial temporal lobe epilepsy: What have we learned? *The Neuroscientist*, 7(4), 340–352.
- Engel, J. (2006). ILAE classification of epilepsy syndromes. *Epilepsy Research*, 70(Supplement), 5–10.

- Epilepsy syndromes. (2020, March 30). EpilepsyDiagnosis.org; International League Against Epilepsy (ILAE). <https://www.epilepsydiagnosis.org/syndrome/epilepsy-syndrome-groupoverview.html>
- Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E., Engel, J., Forsgren, L., French, J. A., Glynn, M., Hesdorffer, D. C., Lee, B. I., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Perucca, E., Scheffer, I. E., Tomson, T., Watanabe, M., i Wiebe, S. (2014). ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 55(4), 475–482.
- Fisher, R. S., Boas, W. van E., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., i Engel, J. (2005). Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, 46(4), 470–472.
- Fisher, R. S., Cross, J. H., D'Souza, C., French, J. A., Haut, S. R., Higurashi, N., Hirsch, E., Jansen, F. E., Lagae, L., Moshé, S. L., Peltola, J., Roulet Perez, E., Scheffer, I. E., Schulze-Bonhage, A., Somerville, E., Sperling, M., Yacubian, E. M., i Zuberi, S. M. (2017a). Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types. *Epilepsia*, 58(4), 531–542.
- Fisher, R. S., Cross, J. H., French, J. A., Higurashi, N., Hirsch, E., Jansen, F. E., Lagae, L., Moshé, S. L., Peltola, J., Roulet Perez, E., Scheffer, I. E., i Zuberi, S. M. (2017b). Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 58(4), 522–530.
- Gaetke, L. M., Chow-Johnson, H. S., i Chow, C. K. (2014). Copper: toxicological relevance and mechanisms. *Archives of Toxicology*, 88(11), 1929–1938.
- Gohil, V. M. (2021). Repurposing elesclomol, an investigational drug for the treatment of copper metabolism disorders. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 30(1), 1–4.
- Gonzalez-Reyes, R. E., Gutierrez-Alvarez, A. M., i Moreno, C. B. (2007). Manganese and epilepsy: A systematic review of the literature. *Brain Research Reviews*, 53(2), 332–336.
- Gou, D.-H., Huang, T.-T., Li, W., Gao, X.-D., Haikal, C., Wang, X.-H., Song, D.-Y., Liang, X., Zhu, L., Tang, Y., Ding, C., i Li, J.-Y. (2021). Inhibition of copper transporter 1 prevents  $\alpha$ -synuclein pathology and alleviates nigrostriatal degeneration in AAV-based mouse model of Parkinson's disease. *Redox Biology*, 38, 101795.
- Grochowski, C., Blicharska, E., Krukow, P., Jonak, K., Maciejewski, M., Szczepanek, D., Jonak, K., Flieger, J., i Maciejewski, R. (2019). Analysis of trace elements in human brain: Its aim, methods, and concentration levels. *Frontiers in Chemistry*, 7.
- Gromadzka, G., Tarnacka, B., Flaga, A., i Adamczyk, A. (2020). Copper dyshomeostasis in neurodegenerative diseases—therapeutic implications. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 9259.
- Gu, J., Wu, M., Guo, R., Yan, K., Lei, J., Gao, N., i Yang, M. (2016). The architecture of the mammalian respirasome. *Nature*, 537(7622), 639–643.
- Hakimi, M., i Aliabadi, T. S. (2012). Coordination chemistry of copper  $\alpha$ -Amino acid complexes. *World Applied Programming*, 2(10), 431–443.
- Hallmann, K., Kudin, A. P., Zsurka, G., Kornblum, C., Reimann, J., Stüve, B., Waltz, S., Hattingen, E., Thiele, H., Nürnberg, P., Rüb, C., Voos, W., Kopatz, J., Neumann, H., i Kunz, W. S. (2015). Loss of the smallest subunit of cytochrome c oxidase, COX8A, causes Leigh-like syndrome and epilepsy. *Brain*, 139(2), 338–345.
- Harris, E. D. (2004). A requirement for copper in angiogenesis. *Nutrition Reviews*, 62(2), 60–64.
- Hartwig, C., Zlatic, S. A., Wallin, M., Vrailas-Mortimer, A., Fahrni, C. J., i Faundez, V. (2019). Trafficking mechanisms of P-type ATPase copper transporters. *Current Opinion in Cell Biology*, 59, 24–33.

- Hatori, Y., i Lutsenko, S. (2013). An expanding range of functions for the copper chaperone/antioxidant protein atox1. *Antioxidants and Redox Signaling*, 19(9), 945–957.
- Hauser, W. A., Annegers, J. F., i Rocca, W. A. (1996). Descriptive Epidemiology of Epilepsy: Contributions of Population-Based Studies From Rochester, Minnesota. *Mayo Clinic Proceedings*, 71(6), 576–586.
- Hauser, W. A., Rich, S. S., Lee, J. R.-J. ., Annegers, J. F., i Anderson, V. E. (1998). Risk of recurrent seizures after two unprovoked seizures. *New England Journal of Medicine*, 338(7), 429–434.
- Hider, R. C., i Kong, X. (2013). Iron: Effect of overload and deficiency. In A. Sigel, H. Sigel, i R. Sigel (Eds.), *Interrelations between Essential Metal Ions and Human Diseases. Metal Ions in Life Sciences*, vol 13. (pp. 229–294). Springer, Dordrecht.
- Hordyjewska, A., Popiołek, Ł., i Kocot, J. (2014). The many “faces” of copper in medicine and treatment. *Biometals*, 27(4), 611–621.
- Ilić, A., Blagotić, M., i Malobabić, S. (2010). Anatomija centralnog nervnog sistema (deseto izdanje). Savremena administracija.
- Inestrosa, N., Cerpa, W., i Varela-Nallar, L. (2005). Copper brain homeostasis: Role of amyloid precursor protein and prion protein. *IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)*, 57(9), 645–650.
- Ishida, S., Andreux, P., Poitry-Yamate, C., Auwerx, J., i Hanahan, D. (2013). Bioavailable copper modulates oxidative phosphorylation and growth of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(48), 19507–19512.
- Itoh, S., Kim, H. W., Nakagawa, O., Ozumi, K., Lessner, S. M., Aoki, H., Akram, K., McKinney, R. D., Ushio-Fukai, M., i Fukai, T. (2008). Novel role of antioxidant-1 (atox1) as a copper-dependent transcription factor involved in cell proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, 283(14), 9157–9167.
- Jaiser, S. R., i Winston, G. P. (2010). Copper deficiency myelopathy. *Journal of Neurology*, 257(6), 869–881.
- Jett, K. A., i Leary, S. C. (2018). Building the CuA site of cytochrome c oxidase: A complicated, redox-dependent process driven by a surprisingly large complement of accessory proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 293(13), 4644–4652.
- Kahn-Kirby, A. H., Amagata, A., Maeder, C. I., Mei, J. J., Sideris, S., Kosaka, Y., Hinman, A., Malone, S. A., Bruegger, J. J., Wang, L., Kim, V., Shrader, W. D., Hoff, K. G., Latham, J. C., Ashley, E. A., Wheeler, M. T., Bertini, E., Carrozzo, R., Martinelli, D., i Dionisi-Vici, C. (2019). Targeting ferroptosis: A novel therapeutic strategy for the treatment of mitochondrial disease-related epilepsy. *PLoS ONE*, 14(3).
- Kaleagasi, H., Oksuz, N., Ozal, S., Yilmaz, A., i Dogu, O. (2013). Increased seizure frequency due to the copper deficiency in Wilson’s disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 333, e59.
- Kaler, S. G., Holmes, C. S., Goldstein, D. S., Tang, J., Godwin, S. C., Donsante, A., Liew, C. J., Sato, S., i Patronas, N. (2008). Neonatal diagnosis and treatment of Menkes disease. *The New England Journal of Medicine*, 358(6), 605–614.
- Kambe, T., Yamaguchi-Iwai, Y., Sasaki, R., i Nagao, M. (2004). Overview of mammalian zinc transporters. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 61(1), 49–68.
- Kandel, E. R., Koester, J. D., Mack, S. H., i Siegelbaum, S. A. (2021). *Principles Of Neural Science* (6th ed., p. 1760). McGraw-Hill Education.
- Kanehisa, M. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27–30.
- Kann, O., Kovács, R., Njunting, M., Behrens, C. J., Otáhal, J., Lehmann, T.-N., Gabriel, S., i Heinemann, U. (2005). Metabolic dysfunction during neuronal activation in the ex vivo hippocampus from chronic epileptic rats and humans. *Brain*, 128(10), 2396–2407.

- Kardos, J., Héja, L., Simon, Á., Jablonkai, I., Kovács, R., i Jemnitz, K. (2018). Copper signalling: Causes and consequences. *Cell Communication and Signaling : CCS*, 16.
- Kastanauskaite, A., Alonso-Nanclares, L., Blazquez-Llorca, L., Pastor, J., Sola, R. G., i DeFelipe, J. (2009). Alterations of the microvascular network in sclerotic hippocampi from patients with epilepsy. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 68(8), 939–950.
- Kim, B.-E., Nevitt, T., i Thiele, D. J. (2008). Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nature Chemical Biology*, 4(3), 176–185.
- Korać Jačić, J., Nikolić, L., Stanković, D. M., Opačić, M., Dimitrijević, M., Savić, D., Grgurić Šipka, S., Spasojević, I., i Bogdanović Pristov, J. (2020). Ferrous iron binding to epinephrine promotes the oxidation of iron and impedes activation of adrenergic receptors. *Free Radical Biology and Medicine*, 148, 123–127.
- Kunz, W. S., Kudin, A. P., Vielhaber, S., Blümcke, I., Zuschratter, W., Schramm, J., Beck, H., i Elger, C. E. (2000). Mitochondrial complex I deficiency in the epileptic focus of patients with temporal lobe epilepsy. *Annals of Neurology*, 48(5), 766–773.
- Kuo, Y.-M., Gybina, A. A., Pyatskowitz, J. W., Gitschier, J., i Prohaska, J. R. (2006). Copper transport protein (Ctr1) levels in mice are tissue specific and dependent on copper status. *The Journal of Nutrition*, 136(1), 21–26.
- Lam, A., Florez, C. M., Mylvaganam, S., Valiante, T., Carlen, P. L., i Ohayon, E. L. (2014). Brain metals in epilepsy: First insights from atomic neuroscience in post-surgical tissue. *Epilepsia*, 55(S2), 224.
- Landazuri, P. (2014). Mesial Temporal Lobe Epilepsy: A Distinct Electroclinical Subtype of Temporal Lobe Epilepsy. *The Neurodiagnostic Journal*, 54(3), 274–288.
- Lee, J., Peña, M. M. O., Nose, Y., i Thiele, D. J. (2002). Biochemical Characterization of the Human Copper Transporter Ctr1. *Journal of Biological Chemistry*, 277(6), 4380–4387.
- Leong, S. L., Barnham, K. J., Multhaup, G., i Cappai, R. (2007). Amyloid precursor protein. In A. Messerschmidt, W. Bode, i M. Cygler (Eds.), *Handbook of Metalloproteins*. John Wiley and Sons.
- Li, D.-D., Zhang, W., Wang, Z.-Y., i Zhao, P. (2017). Serum copper, zinc, and iron levels in patients with Alzheimer's disease: A meta-analysis of case-control studies. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 9, 300.
- Little, A. G., Lau, G., Mathers, K. E., Leary, S. C., i Moyes, C. D. (2018). Comparative biochemistry of cytochrome c oxidase in animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 224, 170–184.
- Lorente de Nò, R. (1934). Studies on the Structure of the Cerebral Cortex II. Continuation of the Study of the Ammonic System. *Journal Für Psychologie Und Neurologie*, 46, 113–177.
- Lüders, H., Fernandez-Baca Vaca, G., Akamatsu, N., Amina, S., Arzimanoglou, A., Baumgartner, C., Benbadis, S. R., Bleasel, A., Bermeo-Ovalle, A., Bozorgi, A., Carreño, M., Devereaux, M., Francione, S., García Losarcos, N., Hamer, H., Holthausen, H., Jamal-Omidi, S., Kalamangalam, G., Kanner, A. M., i Knake, S. (2019). Classification of paroxysmal events and the four-dimensional epilepsy classification system. *Epileptic Disorders*, 21(1), 1–29.
- Madsen, E., i Gitlin, J. D. (2007). Copper and iron disorders of the brain. *Annual Review of Neuroscience*, 30(1), 317–337.
- Maehara, M., Ogasawara, N., Mizutani, N., Watanabe, K., i Suzuki, S. (1983). Cytochrome c oxidase deficiency in menkes kinky hair disease. *Brain and Development*, 5(6), 533–540.
- Malmgren, K., i Thom, M. (2012). Hippocampal sclerosis--origins and imaging. *Epilepsia*, 53(Suppl. 4), 19–33.
- Maret, W. (2013). Zinc and human disease. In A. Sigel, H. Sigel, i R. Sigel (Eds.), *Interrelations between Essential Metal Ions and Human Diseases. Metal Ions in Life Sciences*, vol 13. (pp. 389–414). Springer, Dordrecht.

- Martinez-Finley, E. J., Gavin, C. E., Aschner, M., i Gunter, T. E. (2013). Manganese neurotoxicity and the role of reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*, 62, 65–75.
- Martinez, M., i Baudalet, M. (2019). Calibration strategies for elemental analysis of biological samples by LA-ICP-MS and LIBS – A review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412(1), 27–36.
- Maryon, E. B., Molloy, S. A., Ivy, K., Yu, H., i Kaplan, J. H. (2013). Rate and regulation of copper transport by human copper transporter 1 (hCTR1). *Journal of Biological Chemistry*, 288(25), 18035–18046.
- Maureira, C., Letelier, J. C., Alvarez, O., Delgado, R., i Vergara, C. (2015). Copper enhances cellular and network excitabilities, and improves temporal processing in the rat hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, 42(12), 3066–3080.
- Meisler, M. H., O'Brien, J. E., i Sharkey, L. M. (2010). Sodium channel gene family: epilepsy mutations, gene interactions and modifier effects. *The Journal of Physiology*, 588(11), 1841–1848.
- Miles, L., Greiner, H. M., Mangano, F. T., Horn, P. S., Leach, J. L., i Miles, M. V. (2015). Cytochrome c oxidase deficit is associated with the seizure onset zone in young patients with focal cortical dysplasia type II. *Metabolic Brain Disease*, 30(5), 1151–1160.
- Miller, L. M., Wang, Q., Telivala, T. P., Smith, R. J., Lanzirotti, A., i Miklossy, J. (2006). Synchrotron-based infrared and X-ray imaging shows focalized accumulation of Cu and Zn co-localized with  $\beta$ -amyloid deposits in Alzheimer's disease. *Journal of Structural Biology*, 155(1), 30–37.
- Mitsuya, K., Nitta, N., i Suzuki, F. (2009). Persistent zinc depletion in the mossy fiber terminals in the intrahippocampal kainate mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 50(8), 1979–1990.
- Mulligan, C., i Bronstein, J. M. (2020). Wilson disease: an overview and approach to management. *Neurologic Clinics*, 38(2), 417–432.
- Murphy, Michael P. (2008). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417(1), 1–13.
- Naeve, G. S., Vana, A. M., Eggold, J. R., Kelner, G. S., Maki, R., DeSouza, E. B., i Foster, A. C. (1999). Expression profile of the copper homeostasis gene, rAtox1, in the rat brain. *Neuroscience*, 93(3), 1179–1187.
- Narayanan, G., R. B. S., Vuyyuru, H., Muthuvel, B., i Konerirajapuram Natrajan, S. (2013). CTR1 silencing inhibits angiogenesis by limiting copper entry into endothelial cells. *PLoS ONE*, 8(9), e71982.
- Nayak, C. S., i Bandyopadhyay, S. (2021). *Mesial Temporal Lobe Epilepsy*. In StatPearls. StatPearls Publishing.
- Nikseresht, S., Hilton, J. B. W., Kysenius, K., Liddell, J. R., i Crouch, P. J. (2020). Copper-ATSM as a treatment for ALS: Support from mutant SOD1 models and beyond. *Life*, 10(11), 271.
- Nissl, F. (1894). Ueber eine neue untersuchungsmethode des centralorgans zur feststellung der localisation der nervenzellen. *Neurologisches Centralblatt*, 13, 507–508.
- Noda, Y., Asada, M., Kubota, M., Maesako, M., Watanabe, K., Uemura, M., Kihara, T., Shimohama, S., Takahashi, R., Kinoshita, A., i Uemura, K. (2013). Copper enhances APP dimerization and promotes A $\beta$  production. *Neuroscience Letters*, 547, 10–15.
- Noodleman, L., Han Du, W.-G., Fee, J. A., Götz, A. W., i Walker, R. C. (2014). Linking chemical electron–proton transfer to proton pumping in cytochrome c oxidase: Broken-symmetry DFT exploration of intermediates along the catalytic reaction pathway of the iron–copper dinuclear complex. *Inorganic Chemistry*, 53(13), 6458–6472.
- Nose, Y., Rees, E. M., i Thiele, D. J. (2006). Structure of the Ctr1 copper trans'PORE'ter reveals novel architecture. *Trends in Biochemical Sciences*, 31(11), 604–607.
- Noulhiane, M., Samson, S., Clémenceau, S., Dormont, D., Baulac, M., i Hasboun, D. (2006). A volumetric MRI study of the hippocampus and the parahippocampal region after

- unilateral medial temporal lobe resection. *Journal of Neuroscience Methods*, 156(1-2), 293–304.
- Ohgami, R. S., Campagna, D. R., McDonald, A., i Fleming, M. D. (2006). The Steap proteins are metalloreductases. *Blood*, 108(4), 1388–1394.
- O'Brien, T. J., Newton, M. R., Cook, M. J., Berlangieri, S. U., Kilpatrick, C., Morris, K., i Berkovic, S. F. (1997). Hippocampal atrophy is not a major determinant of regional hypometabolism in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 38(1), 74–80.
- O'Mara, S. M., Sanchez-Vives, M. V., Brotons-Mas, J. R., i O'Hare, E. (2009). Roles for the subiculum in spatial information processing, memory, motivation and the temporal control of behaviour. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 33(5), 782–790.
- Pan, J. W., Williamson, A., Cavus, I., Hetherington, H. P., Zaveri, H., Petroff, O. A. C., i Spencer, D. D. (2008). Neurometabolism in human epilepsy. *Epilepsia*, 49(s3), 31–41.
- Papageorgiou, I. E., Valous, N. A., Lahrmann, B., Janova, H., Kluft, Z.-J., Koch, A., Schneider, U. C., Vajkoczy, P., Heppner, F. L., Grabe, N., Halama, N., Heinemann, U., i Kann, O. (2018). Astrocytic glutamine synthetase is expressed in the neuronal somatic layers and down-regulated proportionally to neuronal loss in the human epileptic hippocampus. *Glia*, 66(5), 920–933.
- Perucca, P., Scheffer, I. E., i Kiley, M. (2018). The management of epilepsy in children and adults. *Medical Journal of Australia*, 208(5), 226–233.
- Pham, A. N., Xing, G., Miller, C. J., i Waite, T. D. (2013). Fenton-like copper redox chemistry revisited: Hydrogen peroxide and superoxide mediation of copper-catalyzed oxidant production. *Journal of Catalysis*, 301, 54–64.
- Pires, G., Leitner, D., Drummond, E., Kanshin, E., Nayak, S., Askenazi, M., Faustin, A., Friedman, D., Debure, L., Ueberheide, B., Wisniewski, T., i Devinsky, O. (2021). Proteomic differences in the hippocampus and cortex of epilepsy brain tissue. *Brain Communications*, 3(2).
- Popescu, B. F., i Nichol, H. (2011). Mapping Brain Metals to Evaluate Therapies for Neurodegenerative Disease. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 17(4), 256–268.
- Pourvali, K., Matak, P., Latunde-Dada, G. O., Solomou, S., Mastrogiannaki, M., Peyssonnaud, C., i Sharp, P. A. (2012). Basal expression of copper transporter 1 in intestinal epithelial cells is regulated by hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$ . *FEBS Letters*, 586(16), 2423–2427.
- Proper, E. A., Oestreicher, A. B., Jansen, G. H., Veelen, C. W. M. v., van Rijen, P. C., Gispen, W. H., i de Graan, P. N. E. (2000). Immunohistochemical characterization of mossy fibre sprouting in the hippocampus of patients with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy. *Brain*, 123(1), 19–30.
- Que, E. L., Domaille, D. W., i Chang, C. J. (2008). Metals in neurobiology: Probing their chemistry and biology with molecular imaging. *Chemical Reviews*, 108(5), 1517–1549.
- Querol Pascual, M. R. (2007). Temporal Lobe Epilepsy: Clinical Semiology and Neurophysiological Studies. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*, 28(6), 416–423.
- Rahman, S. (2012). Mitochondrial disease and epilepsy. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 54(5), 397–406.
- Reddi, Amit R., i Culotta, Valeria C. (2013). SOD1 integrates signals from oxygen and glucose to repress respiration. *Cell*, 152(1-2), 224–235.
- Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., i Jackson, R. B. (2011). Cellular Respiration and Fermentation. In *Campbell Biology* (9th ed.). Pearson.
- Ren, F., Logeman, B. L., Zhang, X., Liu, Y., Thiele, D. J., i Yuan, P. (2019). X-ray structures of the high-affinity copper transporter Ctr1. *Nature Communications*, 10(1).
- Ristić, A. J., Savić, D., Sokić, D., Bogdanović Pristov, J., Nestorov, J., Baščarević, V., Raičević, S., Savić, S., i Spasojević, I. (2015). Hippocampal antioxidative system in mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 56(5), 789–799.



- Ristić, A. J., Sokić, D., Bašcarević, V., Spasić, S., Vojvodić, N., Savić, S., Raičević, S., Kovačević, M., Savić, D., i Spasojević, I. (2014). Metals and electrolytes in sclerotic hippocampi in patients with drug-resistant mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 55(5), e34–e37.
- Rivera-Mancía, S., Pérez-Neri, I., Ríos, C., Tristán-López, L., Rivera-Espinosa, L., i Montes, S. (2010). The transition metals copper and iron in neurodegenerative diseases. *Chemico-Biological Interactions*, 186(2), 184–199.
- Robinson, N. J., i Winge, D. R. (2010). Copper metallochaperones. *Annual Review of Biochemistry*, 79(1), 537–562.
- Rubino, J. T., i Franz, K. J. (2012). Coordination chemistry of copper proteins: How nature handles a toxic cargo for essential function. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 107(1), 129–143.
- Saghazadeh, A., Mahmoudi, M., Meysamie, A., Gharedaghi, M., Zamponi, G. W., i Rezaei, N. (2015). Possible role of trace elements in epilepsy and febrile seizures: a meta-analysis. *Nutrition Reviews*, 73(11), 760–779.
- Santoro, A., Calvo, J. S., Peris-Díaz, M. D., Krężel, A., Meloni, G., i Faller, P. (2020). The glutathione/metallothionein system challenges the design of efficient O<sub>2</sub>-activating Cu-complexes. *Angewandte Chemie International Edition*, 59(20), 7830–7835.
- Schank, J. R., Liles, L. C., i Weinshenker, D. (2005). Reduced anticonvulsant efficacy of valproic acid in dopamine  $\beta$ -hydroxylase knockout mice. *Epilepsy Research*, 65(1-2), 23–31.
- Scharfman, H. E. (2007). The neurobiology of epilepsy. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 7(4), 348–354.
- Scheffer, I. E., Berkovic, S., Capovilla, G., Connolly, M. B., French, J., Guilhoto, L., Hirsch, E., Jain, S., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Nordli, D. R., Perucca, E., Tomson, T., Wiebe, S., Zhang, Y.-H., i Zuberi, S. M. (2017). ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 58(4), 512–521.
- Scheiber, I., Dringen, R., i Mercer, J. F. B. (2013). Copper: Effects of deficiency and overload. In A. Sigel, H. Sigel, i R. Sigel (Eds.), *Interrelations between Essential Metal Ions and Human Diseases. Metal Ions in Life Sciences*, vol 13. (pp. 359–387). Springer, Dordrecht.
- Scheiber, I. F., Mercer, J. F. B., i Dringen, R. (2014). Metabolism and functions of copper in brain. *Progress in Neurobiology*, 116, 33–57.
- Schlieb, M. L., Craig, A. M., i Gitlin, J. D. (2005). NMDA receptor activation mediates copper homeostasis in hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience*, 25(1), 239–246.
- Semah, F., Picot, M.-C., Adam, C., Broglin, D., Arzimanoglou, A., Bazin, B., Cavalcanti, D., i Baulac, M. (1998). Is the underlying cause of epilepsy a major prognostic factor for recurrence? *Neurology*, 51(5), 1256–1262.
- Serpa, R. F. B., de Jesus, E. F. O., Anjos, M. J., de Oliveira, L. F., Marins, L. A., do Carmo, M. G. T., Corrêa Junior, J. D., Rocha, M. S., Lopes, R. T., i Martines, A. M. B. (2008). Topographic trace-elemental analysis in the brain of Wistar rats by X-ray microfluorescence with synchrotron radiation. *Analytical Sciences*, 24(7), 839–842.
- Sharonova, I. N., Vorobjev, V. S., i Haas, H. L. (1998). High-affinity copper block of GABA<sub>A</sub> receptor-mediated currents in acutely isolated cerebellar Purkinje cells of the rat. *European Journal of Neuroscience*, 10(2), 522–528.
- Sharonova, I. N., Vorobjev, V. S., i Haas, H. L. (2000). Interaction between copper and zinc at GABA<sub>A</sub> receptors in acutely isolated cerebellar Purkinje cells of the rat. *British Journal of Pharmacology*, 130(4), 851–856.
- Sheng, J. G., Boop, F. A., Mrak, R. E., i Griffin, W. S. T. (2002). Increased neuronal  $\beta$ -Amyloid precursor protein expression in human temporal lobe epilepsy: Association with interleukin-1 $\alpha$  immunoreactivity. *Journal of Neurochemistry*, 63(5), 1872–1879.
- Sinkler, C. A., Kalpage, H., Shay, J., Lee, I., Malek, M. H., Grossman, L. I., i Hüttemann, M. (2017). Tissue- and condition-specific isoforms of mammalian cytochrome c oxidase subunits:

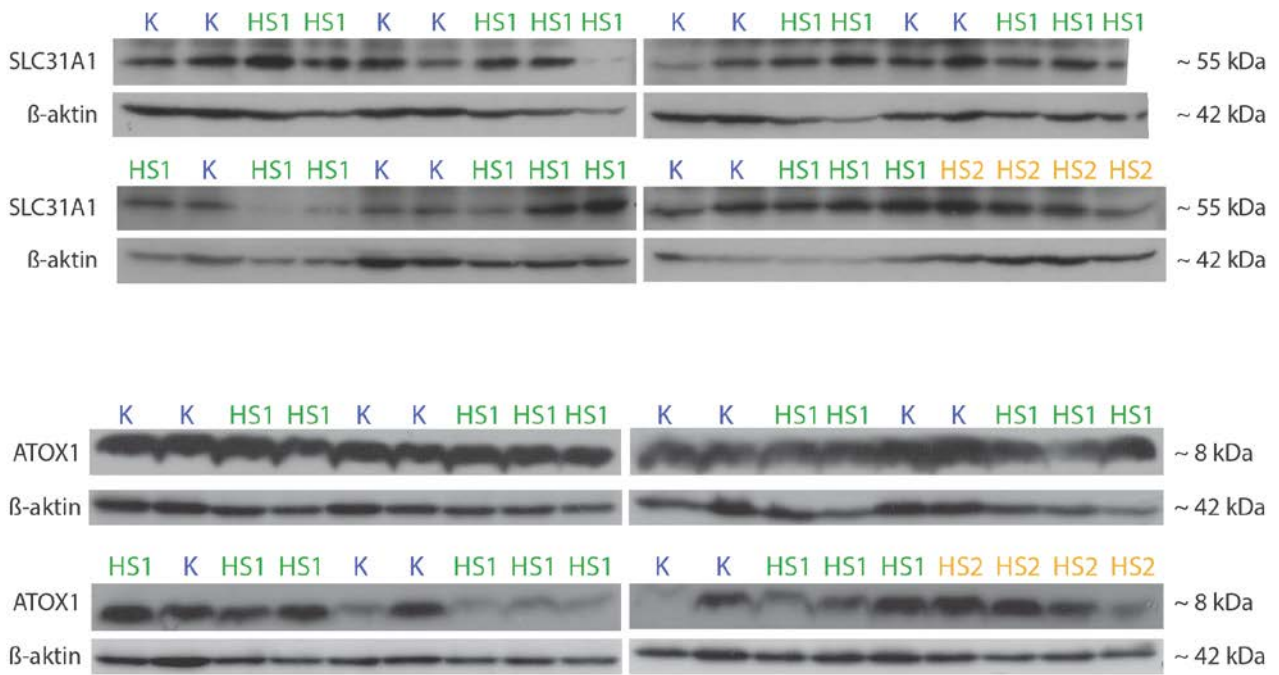
- From function to human disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1534056.
- Sparaco, M., Hirano, A., Hirano, M., DiMauro, S., i Bonilla, E. (1993). Cytochrome c oxidase deficiency and neuronal involvement in Menkes' kinky hair disease: Immunohistochemical study. *Brain Pathology*, 3(4), 349–354.
- Spasojević, I., Mojović, M., Stević, Z., Spasić, S. D., Jones, D. R., Morina, A., i Spasić, M. B. (2010). Bioavailability and catalytic properties of copper and iron for Fenton chemistry in human cerebrospinal fluid. *Redox Report*, 15(1), 29–35.
- Stegen, M., Kirchheim, F., Hanuschkin, A., Staszewski, O., Veh, R. W., i Wolfart, J. (2011). Adaptive Intrinsic Plasticity in Human Dentate Gyrus Granule Cells during Temporal Lobe Epilepsy. *Cerebral Cortex*, 22(9), 2087–2101.
- Stewart, T. J. (2019). Across the spectrum: integrating multidimensional metal analytics for in situ metallomic imaging. *Metallomics: Integrated Biometal Science*, 11(1), 29–49.
- Stiburek, L., i Zeman, J. (2010). Assembly factors and ATP-dependent proteases in cytochrome c oxidase biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1797(6-7), 1149–1158.
- Takeda, A. (2003). Manganese action in brain function. *Brain Research Reviews*, 41(1), 79–87.
- Tatu, L., i Vuillier, F. (2014). Structure and vascularization of the human hippocampus. *Frontiers of Neurology and Neuroscience*, 34, 18–25.
- Tatum, W. O. (2012). Mesial Temporal Lobe Epilepsy. *Journal of Clinical Neurophysiology*, 29(5), 356–365.
- Telianidis, J., Hung, Y. H., Materia, S., i Fontaine, S. L. (2013). Role of the P-type ATPases, ATP7A and ATP7B in brain copper homeostasis. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 5:44.
- Theodore, W. H., Bhatia, S., Hatta, J., Fazilat, S., DeCarli, C., Bookheimer, S. Y., i Gaillard, W. D. (1999). Hippocampal atrophy, epilepsy duration, and febrile seizures in patients with partial seizures. *Neurology*, 52(1), 132–132.
- Thom, M. (2009). Hippocampal Sclerosis: Progress Since Sommer. *Brain Pathology*, 19(4), 565–572.
- Thom, M. (2014). Review: Hippocampal sclerosis in epilepsy: a neuropathology review. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 40(5), 520–543.
- Trincavelli, M., Da Pozzo, E., Ciampi, O., Cuboni, S., Daniele, S., Abbracchio, M., i Martini, C. (2013). Regulation of erythropoietin receptor activity in endothelial cells by different erythropoietin (EPO) derivatives: An in vitro study. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(2), 2258–2281.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., i Yoshikawa, S. (1996). The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science*, 272(5265), 1136–1144.
- Šala, M., Šelih, V. S., i van Elteren, J. T. (2017). Gelatin gels as multi-element calibration standards in LA-ICP-MS bioimaging: fabrication of homogeneous standards and microhomogeneity testing. *The Analyst*, 142(18), 3356–3359.
- van Elteren, J. T., Šelih, V. S., i Šala, M. (2019). Insights into the selection of 2D LA-ICP-MS (multi)elemental mapping conditions. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 34(9), 1919–1931.
- Vielhaber, S., Niessen, H. G., Debska-Vielhaber, G., Kudin, A. P., Wellmer, J., Kaufmann, J., Schönfeld, M. A., Fendrich, R., Willker, W., Leibfritz, D., Schramm, J., Elger, C. E., Heinze, H.-J., i Kunz, W. S. (2008). Subfield-specific loss of hippocampal N-acetyl aspartate in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 49(1), 40–50.
- Walker, M. C. (2015). Hippocampal Sclerosis: Causes and Prevention. *Seminars in Neurology*, 35(3), 193–200.

- Wandt, V. K., Winkelbeiner, N., Bornhorst, J., Witt, B., Raschke, S., Simon, L., Ebert, F., Kipp, A. P., i Schwerdtle, T. (2021). A matter of concern – Trace element dyshomeostasis and genomic stability in neurons. *Redox Biology*, 41, 101877.
- Wang, H., Wang, M., Wang, B., Li, M., Chen, H., Yu, X., Zhao, Y., Feng, W., i Chai, Z. (2012). The distribution profile and oxidation states of biometals in APP transgenic mouse brain: Dyshomeostasis with age and as a function of the development of Alzheimer’s disease. *Metallomics*, 4(3), 289.
- Waxman, S. G. (2020). *Clinical neuroanatomy* (29th ed.). McGraw-Hill Education.
- Weiskirchen, S., Kim, P., i Weiskirchen, R. (2019). Laser ablation inductively coupled plasma spectrometry: Metal imaging in experimental and clinical wilson disease. *Inorganics*, 7(4), 54.
- White, C., Kambe, T., Fulcher, Y. G., Sachdev, S. W., Bush, A. I., Fritsche, K., Lee, J., Quinn, T. P., i Petris, M. J. (2009). Copper transport into the secretory pathway is regulated by oxygen in macrophages. *Journal of Cell Science*, 122(9), 1315–1321.
- WHO Expert committee on trace elements in human nutrition, i World health organization. (1973). Trace elements in human nutrition : Report of a WHO expert committee [meeting held in Geneva from 9 to 17 April 1973]. World health organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/41057>
- Wiebe, S. (2000). Epidemiology of temporal lobe epilepsy. *The Canadian Journal of Neurological Sciences*, 27(S1), S6–S10.
- Witt, B., Schaumlöffel, D., i Schwerdtle, T. (2020). Subcellular Localization of Copper—Cellular Bioimaging with Focus on Neurological Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2341.
- Witt, B., Stiboller, M., Raschke, S., Friese, S., Ebert, F., i Schwerdtle, T. (2021). Characterizing effects of excess copper levels in a human astrocytic cell line with focus on oxidative stress markers. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 65, 126711.
- Wong-Riley, M. T. T. (1989). Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends in Neurosciences*, 12(3), 94–101.
- World Health Organization. (2019). Epilepsy: a public health imperative. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/325293> License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
- Wu, M., Liu, X., Chi, X., Zhang, L., Xiong, W., Chiang, S. M. V., Zhou, D., i Li, J. (2017). Mitophagy in refractory temporal lobe epilepsy patients with hippocampal sclerosis. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 38(2), 479–486.
- Xiao, W., Yang, Z., Yan, X., Feng, L., Long, L., Tu, T., Deng, N., Chen, W., Xiao, B., Long, H., i Zeng, Y. (2021). ITRAQ-based proteomic analysis of dentate gyrus in temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Frontiers in Neurology*, 11, 626013.
- Zhang, P., Land, W., Lee, S., Juliani, J., Lefman, J., Smith, S. R., Germain, D., Kessel, M., Leapman, R., Rouault, T. A., i Subramaniam, S. (2005). Electron tomography of degenerating neurons in mice with abnormal regulation of iron metabolism. *Journal of Structural Biology*, 150(2), 144–153.
- Zong, S., Wu, M., Gu, J., Liu, T., Guo, R., i Yang, M. (2018). Structure of the intact 14-subunit human cytochrome c oxidase. *Cell Research*, 28(10), 1026–1034.
- Zoroddu, M. A., Aaseth, J., Crisponi, G., Medici, S., Peana, M., i Nurchi, V. M. (2019). The essential metals for humans: a brief overview. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 195, 120–129.
- Zsurka, G., Hampel, K. G., Nelson, I., Jardel, C., Mirandola, S. R., Sassen, R., Kornblum, C., Marcorelles, P., Lavoue, S., Lombes, A., i Kunz, W. S. (2010). Severe epilepsy as the major symptom of new mutations in the mitochondrial tRNAPhe gene. *Neurology*, 74(6), 507–512.
- Zsurka, G., i Kunz, W. S. (2015). Mitochondrial dysfunction and seizures: the neuronal energy crisis. *The Lancet Neurology*, 14(9), 956–966

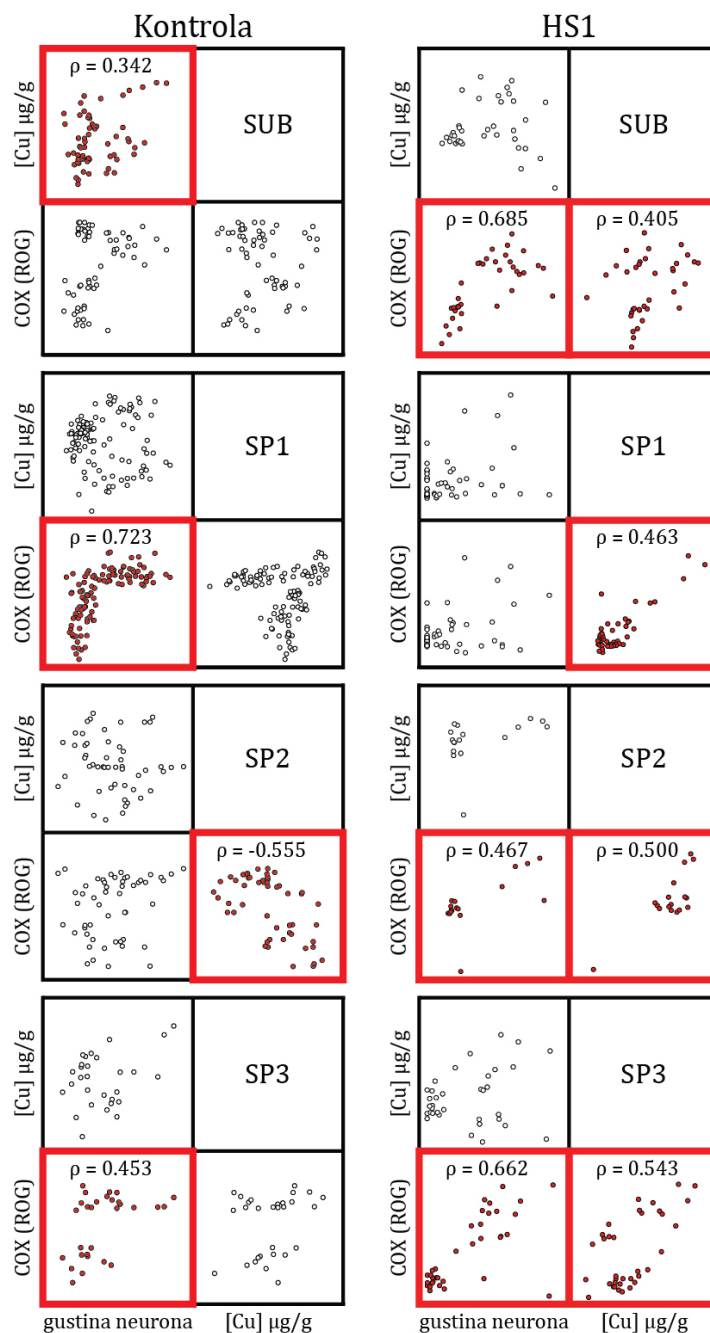
## VIII. Poglavlje

---

## PRILOZI



**Prilog 1. Reprezentativni imunoblotovi prilikom detekcije SLC31A1 i ATOX1 proteina.** K, kontrola; HS1 i 2, hipokampusna skleroza tip 1 i 2; SLC31A1, transporter za unos bakra (engl. *solute carrier family 31 member 1*); ATOX1, antioksidativni šaperon bakra 1.



**Prilog 2. Dijagrami raspršenja sa statistički značajnim koeficijentima korelacija ( $p < 0,05$ ) između gustine piramidalnih neurona, koncentracije bakra i aktivnosti COX kod kontrolnih i sklerotičnih hipokampusa za regione SUB i SP1-3. Crvenom bojom su istaknute statistički značajne korelacije (Spirmanov koeficijent korelacije  $\rho$ ). Gustina neurona je izražena kao broj ćelija po  $\text{mm}^2$ . HS1, sklerotični hipokampusi tipa 1; COX, citohrom c oksidaza. ROG, relativna optička gustina; SUB, subiculum; SP1–3, *stratum pyramidale* u poljima *cornu Ammonis* 1–3.**

## Биографија аутора

Милош (Алекса) Опачић је рођен 8. IX 1985. у Земуну. Основну школу „Бранко Радичевић” је завршио у Батајници, а Земунску гимназију у Земуну. Академски пут је започео на јесен 2007. године, уписом на основне академске студије молекуларне биологије и физиологије на Универзитету у Београду – Биолошком факултету, а потом наставио мастер академским студијама на истом факултету. Ангажован је као студент-волонтер под руководством др Јелене Богдановић-Пристов, вишег научног сарадника и др Ивана Спасојевића, научног саветника на Универзитету у Београду – Институту за мултидисциплинарна истраживања од 2010. године, где је израдио завршни (мастер) рад под називом „Оксидо - редукциони потенцијал цереброспиналне течности пацијената оболелих од амиотрофичне латералне склерозе”, који је одбранио у лето 2015. године, под менторством др Мирослава Живића, ванредног професора Универзитета у Београду – Биолошког факултета. Докторске академске студије експерименталне неуробиологије је уписао исте године на Универзитету у Београду – Биолошком факултету а запослен је као истраживач-приправник на Универзитету у Београду – Институту за мултидисциплинарна истраживања од 2016. године, где и данас ради. Члан је Биохемијског друштва Србије, Српског биолошког друштва, Друштва за неуронауке Србије и Удружења грађана - Хора „Viva Vox”. Добитник је више стипендија, за учешће у међународним школама, научним скуповима и европском програму размене студената са Републиком Словенијом. Радио је на националном и билатералном пројекту Министарства просвете науке и технолошког развоја Републике Србије, као и при европској Кост акцији. До данас је објавио шест публикација у научним часописима међународног значаја и дао седам саопштења на међународним научним скуповима у Србији, Уједињеном Краљевству и Мађарској.

## Изјава о ауторству

Потписани **Милош А. Опачић**

број индекса **Б3032/2015**

### Изјављујем

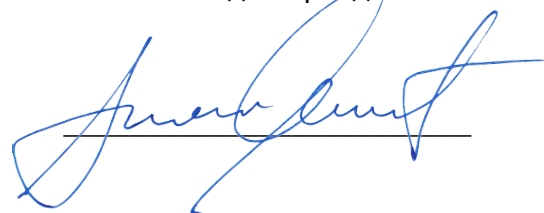
да је докторска дисертација под насловом

**„Улога и метаболизам бакра у хипокампусној склерози асоцираној са епилепсијом  
темпоралног режња код човека”**

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

Потпис докторанда

У Београду, 22.02.2022.





# Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Милош А. Опачић**

Број индекса **Б3032/2015**

Студијски програм **Биологија** (модул **експериментална неуробиологија**)

Наслов рада „**Улога и метаболизам бакра у хипокампусној склерози асоцираној са епилепсијом темпоралног режња код човека**”

Ментори **др Данијела Лакета** и **др Данијела Савић**

Потписани **Милош А. Опачић**

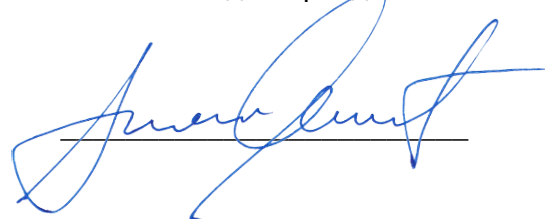
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

У Београду, 22.02.2022.

Потпис докторанда



## Изјава о коришћењу

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

**„Улога и метаболизам бакра у хипокампусној склерози асоцираној са епилепсијом темпоралног режња код човека”**

која је моје ауторско дело.

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

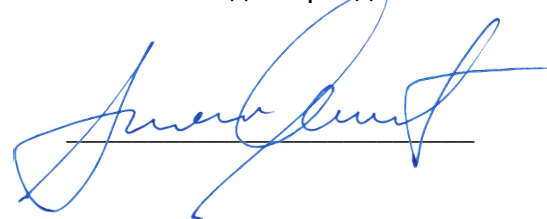
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 22.02.2022.



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.