UNIVERZITET U BEOGRADU
B I O L O Ġ K I F A K U L T E T

Stefan P. S t a m e n k o v i Í

ISPITIVANJE RANIH MARKERA PROCESA NEUROINFLAMACIJE I OKSIDATIVNOG STRESA U MOZGU TRANSGENOG hSOD1 G93A PACOVA KAO EKSPERIMENTALNOG MODELA A M I O T R O F I Ļ N E L A T E R A L N SKLEROZE

Doktorska disertacija

Beograd, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Stefan P. S t a m e n k o v i Í

INVESTIGATION OF EARLY MARKERS OF NEUROINFLAMMATION AND OXIDATIVE STRESS IN THE BRAIN OF THE TRANSGENIC hSOD1 G93A RAT AS AN EXPERIMENTAL MODEL FOR AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

Ph.D. Thesis

Belgrade, 2017

Mentor:

Dr Pavle R. Anđus, vanredni profesor Fizičkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

Dr Milorad Mojović, redovni profesor Fakulteta za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu

Dr Tanja Gilić, naučni savetnik, *ALBA Synchrotron light source*, Barselona, Španija

Eksperimentalna istraģivanja ove doktors
laserskU mikroskopiju BiologķkEPRLabofratorkiju
Fakulteta za fizilķku hemiju Univerziteta
radiologiju Srbije, Fraunhofer institutu z
Nemkaď, ALBA sinhrotronu u Barseloni, Ġpanij
Ġvajcarska.

Zahvaljujem se:

Mentoru, dr PavluR. AnĽusu hiakaunkazamosmtpoļ
usavrģavapjpomoÍi u osmiģljavijamajezultate,kasperimena
na pomoÍi prilikom pisanja radova i izrade

Kolegama iz EPR Laboratorije Fakulteta za fizilķku hemiju,
MilogķuMojoviÍ-Bui,jadlriÍA,nidrPoMaorvkiÚDaknaviÍu i
izuzetnoj pomoÍi u osmiģljavanju, izvoĽen
spektroskopije i oslikavanja magnetnom rezonancijom.

Dr Tanji DuļiÍ naanaliziranjurezultataeksperimentaĽeonnaÚu
mikroskopije Rentgennisikhienergijaifluorescentnimm Rentgenskim
zraļenjem.

Dr Alexander Kranz-u na pomoÍi u analizi konfkalnih
korisnim sugestijama tokom eksperimentalnog rada.

Kolegama iz Centra za lasersku mikroskopiju ljenju, lepimoremaciÍai, strp
svim ostalim malim stvarima koje su mnogo znaļile

Svim prijateljima i porodici na razumevanju

ISPITIVANJE RANIH MARKERA PROCESA NEUROINFLAMACIJE I OKSIDATIVNOG STRESA U MOZGU TRANSGENOG hSOD1 G93A PACOVA KAO EKSPERIMENTALNOG MODELA AMIOTROFIČNE LATERALNE SKLEROZE

REZIME

Amiotrofična lateralna skleroza je progresivno neurodegenerativno oboljenje čija je smrt neurona i kognitivne domene centralnog nervnog sistema (CNS). Mutacije u genu za Cu, Zn-superoksid dismutazu (SOD1) uzrokuju 20% familijalnih ALS i izazivaju stvaranje SOD1 agregata i smanjeno vezivanje Cu i Zn jona, što dovodi do patoloških unutarćelijskih promena. U *post mortem* tkivu ALS pacijenata i mišjim modelima bolesti uočena je aktivacija mikroglije i astrocita, povećana permeabilizacija krvno-moždane barijere (KMB) i povećana proizvodnja reaktivnih kiseoničnih i azotnih faktora u bolesti. Cilj ove studije je bio da se ispitaju navedene patološke promene u motornim (motorni korteks, hipokampus) i nemotornim centrima u mozgu transgenog hSOD1 G93A pacovskog modela ALS, u presimptomatskom i simptomatskom stadijumu bolesti, kako bismo identifikovali rane promene u bolesti.

Prisustvo i vremenski sled aktivacije astrocita, kao i akumulacija i distribucija naprednim 3D modelovanjem i analizom kolokalizacije na slikama dobijenim konfokalnom laserskom skenirajućom mikroskopijom, proliferaciju i progresivno nakupljanje SOD1 u hSOD1 G93A pacova, koji počinju već u presimptomatskom stadijumu. U ovih životinja aktivacija astrocita je bila praćena aktivacijom mikroglije. Takođe, uočili smo progresivnu akumulaciju SOD1 proteina u ćelijskom telu i nastavcima, dok je SOD1 u mikrogliji bili smanjeni a njena distribucija nepromenjena u svim nastavke. U hipokampusu hSOD1 G93A pacova astrociti su pokazali isti reaktivni profil kao onaj u motornom korteksu, dok je morfologija astrocita u ovom stablu, dok je morfologija nepromenjena. U ovom regionu mozga oba tipa SOD1 proteina u ćelijskom telu. Topografska

sastava tkiva p o m o ć u Rentgenske fluorescentne mikroskopije je pokazala smanjenje u k o l i č i n i koncentracije Ca, Cl, K, Ni, Cu i Zn u m o ž d a n o m s t a b l u, p o v e ć a n e n i Cu u odnosu na smanjenje Zn u hipokampusu simptomatskih hSOD1 G93A pacova.

R e d o k s s t a t u s m o ž d a n o g t k i v a kod hSOD1 G93A pacova je integr ispitani *in vivo* E P R s p e k t r o s k o p i j o m k o r i š ć e n j e m 3 a s p o s o b n o s t i m a p r o l a s k a k r o z ć e l i j s k u m e m b proksila (3CP), i 3-karboksi-proksila (3CxP). Rezultati su ukazali da je 3CP n a j p r i k l a d n i j i z a i s p i t i v a n j e u n u t a r ć e l i j s redukovan *in vivo* u r o k u o d n e k o l i k o m i n u t a š t o j e o modelovanje, dok se 3CxP pokazao neadekvatnim usled slabe sposobnosti prolaska k r o z ć e l i j s k e m e m b r a n e . F a r m a k *in vivo* u p o r e đ i v a n j u presimptomatskih i simptomatskih hSOD1 G93A pacova je ukazalo na izmenjen redoks s t a t u s m o ž d a n o g t k i v a i m o g u ć e o š t e ć e n j e K status u mozgu hSOD1 G93A p a c o v a j e p o t v r đ e n b i o h e m i j s p o k a z a l i p o v e ć a n j e , ć proizvodnju superoksidnog radikala, lipidnu peroksidaciju i aktivnost SOD2, kao i smanjenu aktivnost SOD1 u homogenatima tkiva m o ž d a n o g s t a b l a i h i p o k a m p u s a o v i h ž i v o t eksperimentima oslikavanja magnetnom rezonancijom koji su pokazali curenje KMB v e ć k o d s i m p t o m a t s k i h ž i v o t i n j a , u z d a l j e ž pacova.

Ovi rezultati donose novi uvid u glijalni odgovor i promene u homeostazi r a z l i č i t i h e l e m e n a t a t o k o m r a z v o j a m o t o r n i m i p r o g strukturama CNS, i ukazuju na p o r e m e ć e n r e d o k s s t a t u s m rane markere bolesti.

K l j u č n e r e č i : a m i o t r o f i č n a l a t e r a l n a s k l e prelazni metali, oksidativni stres, krvno-m o ž d a n a b a r i j e r a .

N a u č n a o b l a s t : N e u r o n a u k e
U ž a u č n a o b l a s t : N e u r o f i z i o l o g i j a s a b i o f i z
UDK broj: [575.22:575.224.2]:616.8-00/-003.99(043.3)

INVESTIGATION OF EARLY MARKERS OF NEUROINFLAMMATION AND OXIDATIVE STRESS IN THE BRAIN OF THE TRANSG

Zn in the brainstem, and higher levels of Cl, Ni and Cu, but lower levels of Zn in the hippocampus of symptomatic hSOD1 G93A rats.

The brain tissue redox status and BBB permeability in hSOD1 G93A rats were investigated by *in vivo* EPR spectroscopy using three aminoxyl radicals with different cell membrane and BBB permeabilities, Tempol, 3-carbamoyl proxyl (3CP), and 3-carboxy proxyl (3CxP). The EPR results indicated that 3CP is the most suitable for reporting the intracellular redox status changes, as Tempol was reduced *in vivo* within minutes thus preventing reliable kinetic modeling, whereas 3CxP was shown to be innapropriate for these experiments due to its membrane impermeability. Pharmacokinetic modeling of 3CP reduction *in vivo* in the head of presymptomatic and symptomatic hSOD1 G93A rats indicated an altered brain tissue redox status and possible BBB disruption in these animals. Altered brain redox status in hSOD1 G93A rats was confirmed by biochemical assays showing increased nitrilation, superoxide radical production, lipid peroxidation and SOD2 activity, and a decreased SOD1 activity in brainstem and hippocampus tissue homogenates of these animals. BBB disruption was confirmed by MRI experiments showing presence of BBB breakdown already in presymptomatic animals, with further spreading of BBB damage in symptomatic rats.

These results bring new insights into the glial response and alterations in tissue elemental homeostasis during disease development and progression in motor as well as in non-motor CNS structures, and indicate disturbed brain tissue redox status and BBB disruption as early markers of the disease.

Key words: amyotrophic lateral sclerosis, brainstem, hippocampus, glia, transition metals, oxidative stress, blood-brain barrier.

Scientific filed: Neuroscience
Narrower scientific field: Neurophysiology and Biophysics
UDC number: [575.22:575.224.2]:616.8-00/-003.99(043.3)

S a d r ģ a j :

Uvod **1**

A m i o t r o f i ļ n a l a t e r a l n a s k l e r o z a **1**

G l a v n i f a k t o r i e t i o l o š k i **1**

Mikroglija i njena uloga u patologiji ALS **5**

Astrociti i njihova uloga u patologiji ALS **7**

M e h a n i z m i g l i j a l n e t o k s i č n o s t i u A L S **11**

Uloga prelaznih metala u patologiji ALS **13**

K r v n o m o ģ d a n a b a r i j e r a i n j e n a f u n k c i j a u **15**

Oksidativni stres u ALS **18**

C i l j i s t r a ž i v a n j a **21**

Materijali i metode **22**

E k s p e r i m e n t a l n e ž i v o t i n j e **22**

G e n o t i p i z a c i j a ž i v o t i n j a m e t o d o m l a n č a n e p o l i m e r a z **23**

I z o l a c i j a i o d r ž a v a n j e p r i m a r n e Ć e l i j s k e k **24**

Imunohistohemija **27**

Priprema tkiva 27

I m u n o f l u o r e s c e n t n o o b e l e ž a v a n j e m o ž d a n i h 28

Konfokalna mikroskopija 29

Analiza konfokalnih snimaka 30

O d r e Đ i v a n j e č i s t o Ć e p r i m a r n e k u l t u r e a s t r o astrocitima in vitro primenom imunocitohemijske metode **32**

I s p i t i v a n j e p r o i z v o d n j e s u p e r o k s i d n o g r a d i MitoSox Red indikatora **34**

I s p i t i v a n j e u n u t a r Ć e l i j s k e s t r u k t u r e a s t r o m i k r o s k o p i j e R e n t g e n s k o m z r a č e n j e m **35**

Rentgenska fluorescentna mikroskopija (eng. X-ray fluorescence imaging – XRF) **36**

Priprema tkiva 36

Pravljenje XRF snimaka 36

Analiza XRF mapa 37
Biohemijsko ispitivanje parametara oksidativnog stresa **37**
Priprema homogenata tkiva 37
Određivanje koncentracije nitrita 38
Određivanje proizvodnje superoksidnog radikala 38
Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze 38
Određivanje nivoa lipidne peroksidacije 39
Elektronska paramagnetna rezonancija **39**
In vitro i ex vivo EPR spektroskopija 41
In vivo EPR spektroskopija 41
Kinetičko modelovanje spektara redukcije gvožđa 43
Oslikavanje magnetnom rezonancijom **44**
Statistička analiza **45**
Rezultati **46**
Ispitivanje histoloških promena u moždanom presimptomatskih i simptomatskih hSOD1 G93A pacova **46**
Imunohistohemijska analiza glijalnih markera u moždanom stablu i kičmenom mozgu 46
Analiza konfokalnih 3D slika pojedinačnih
Analiza konfokalnih 3D slika pojedinačnih
Ispitivanje unutarćelijske organizacije i astrocita izolovanih iz ALS pacova **57**
Potvrda čistoće kulture astrocita 57
Ispitivanje ekspresije SOD1 proteina u astrocitima u kulturi 58
Ispitivanje unutarćelijske strukture astro
Ispitivanje proizvodnje superoksidnog radikala u kulturi astrocita izolovanih iz ALS pacova 61
Ispitivanje koncentracije hemijskih elementata u tkivu facijalnog jedra i dentatnog girusa simptomatskih hSOD1 G93A pacova **62**
Ispitivanje parametara oksidativnog stresa i hipokampusa presimptomatskih i simptomatskih hSOD1 G93A pacova **65**

***Ispitivanje redoks statusa i propustljivosti krvno-mo ́g d a n e b a r i j e r e u mozgu presimptomatskih i simptomatskih hSOD1 G93A pacova in vivo* 67**

In vitro i ex vivo redukcija nitroksida.....67

In vivo farmakokinetika nitroksida u regionu glave pacova 69

MRI ispitivanje propustljivosti krvno-mo ́g d a n e b a r i j e r e u m o z g u presimptomatskih i simptomatskih hSOD1 G93A pacova.....75

Diskusija.....**77**

***Ĺ e l i j s k e ijske promene u mozgu hSOD1 G93A pacova*.....77**

P r o l i f e r a c i j a g l i j a l n i h Ĺ e l i j a i a k u m u l a c u m o ́g d a n h SOD1 G93A pacova 77

P r o m e n e u m o r f o l o g i j i g l i j a l n i h Ĺ e l i j a i SOD1 proteina u hSOD1 G93A pacovima 78

P r o m e n e u k o n c e n t r a c i j i n e u r o t r a n s m i t e r s k i h a m i n o k i s e l i n a u m o ́g d a i hipokampusa simptomatskih hSOD1 G93A pacova.....83

***P r o m e n a r e d o k s s t a t u s a i p o v e Ĺ a n j e p r o p u s t krvno-mo ́g d a n e b a r i j e r e u mozgu hSOD1 G93A pacova*.....86**

In vitro i ex vivo redukcija nitroksida.....87

In vivo redukcija nitroksida.....88

Promena redoks statusa u mozgu hSOD1 G93A pacova 93

Z a k l j u č c i.....**97**

Literatura.....**99**

Biografija.....**129**

Uvod

Amiotrofična lateralna skleroza

Amiotrofična lateralna skleroza (ALS), poznata i kao Lu Gehrigova bolest, je smrtonosno neurodegenerativno oboljenje donjih motornih neurona kičmene moždine, moždanog stabla i velikog mozga koji kontrolišu voljne funkcije tela. Prvi put je opisana 1869. godine francuski neurobiolog Jean Martin Charcot. Godišnja incidencija obolele osobe na 100000 ljudi, prosečna starost u momentu postavljanja dijagnoze je 55 godina, a obolevanje u oba pola je podjednako (van Es et al., 2017). Najčešći početni simptomi bolesti su slabost mišića ruke ili noge, kod kojih se vremenom razvijaju atrofija i spastičnost. Kod oko 25% pacijenata početni simptomi bolesti su vezani za govor ili gutanje. Najčešći uzrok smrti predstavlja respiratorna insuficijencija koja se javlja kao posledica slabosti respiratornih mišića. Prosečno preživljavanje je između 2 i 4 godine od početka bolesti, a samo 10% pacijenata preživi duže od 10 godina. Najčešće umiru u periodu od 3 do 5 godina posle pojave prvih simptoma bolesti (Cleveland i Rothstein, 2001; Rowland i Shneider, 2001). Iako je prvobitno opisana kao bolest motornih neurona, ALS je danas prepoznata kao multisistemska bolest koja zahvata i druge domene. Iako samo mali broj pacijenata ima frontotemporalnu demenciju (FTD), oko 50% ALS pacijenata ima neke kognitivne poremećaje (Phukan et al., 2012). Takođe, 15 do 20% pacijenata ima probleme u pamćenju, i više studija je otkrilo disfunkciju hipokampalne formacije, prevashodno dentatnog girusa, kod ALS pacijenata (Takeda et al., 2007; Takeda et al., 2009; Brettschneider et al., 2012; Brettschneider et al., 2013).

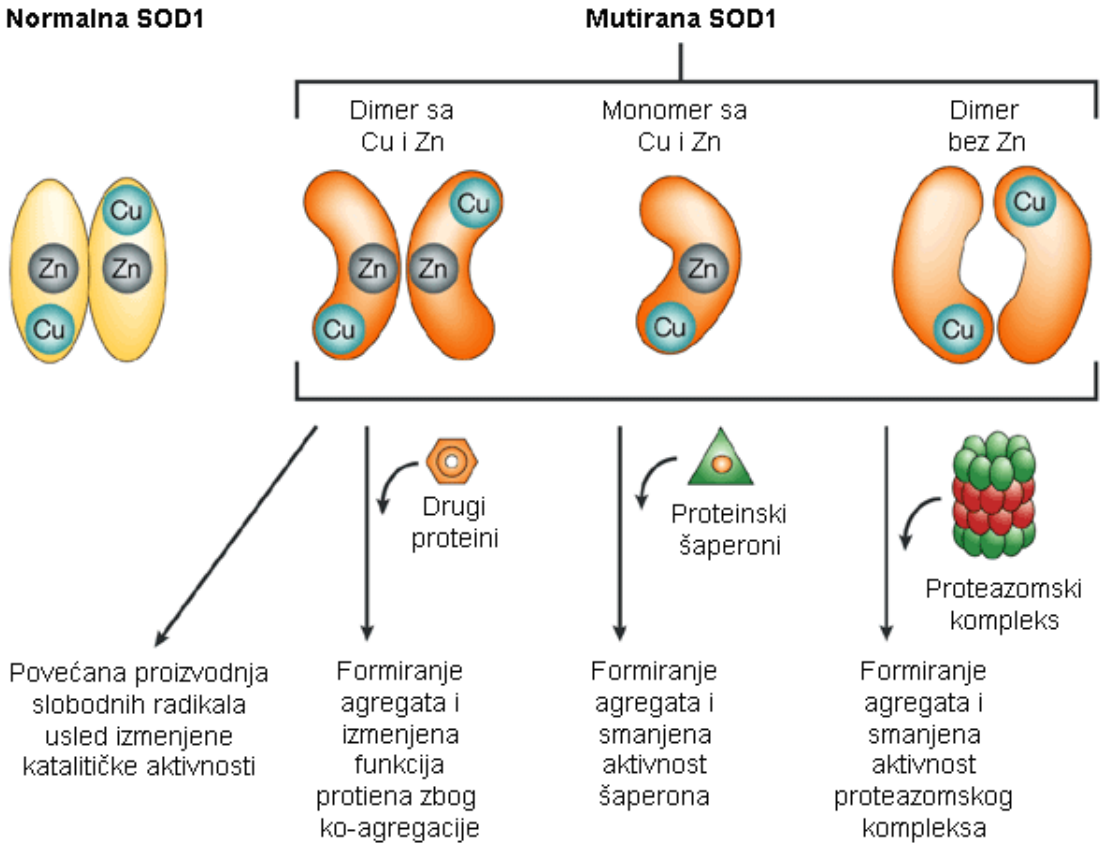
Glavni genetički faktori u ALS

Oko 90% slučajeva ALS je sporadično (sporadični slučajevi ALS), dok se 10% slučajeva javlja u porodičnoj formi bolesti (fALS). Porodični slučajevi ALS ispoljavaju slične fenotipske osobine što sporadični slučajevi (Robberecht i Philips, 2013). Iako je pokazano da su mutacije u mnogim genima povezane sa razvojem bolesti, prva otkrivena mutacija u fALS je bila u genu koji kodira za Cu, Zn superoksid dismutazu - SOD1 (Rosen et al., 1993; Chen et al., 2013), tako da

najpoznatije i najistraženije životinjske pacovski modeli koji nose veliki broj kopija ljudskog mutiranog SOD1 gena (hSOD1) i koji ispoljavaju patološke promene koje su obolelih ljudi (Gurney et al., 1994; Howland et al., 2002). Opisano je više mutacija u *sod1* genu koje su povezane sa razvojem bolesti, od ko dominatno nasleĎivanje, i koje su odgovorn (Valentine et al., 2005). SOD1 je evolutivno visoko konzerviran antioksidativni homodimerni enzim eksprimiran u citoplazmi i mitohondrijama svih ćelija u ļija je funkcija da prevodi superoksidni peroksid (McCord i Fridovich, 1969). Mutacije u SOD1 koje su povezane sa razvojem ALS dovode ili do direktnih promena u strukturi proteina ili do izmenjenog vezivanja jona bakra i cinka koji su neophodni za no aktivnost enzima. Oba tipa mutacija izazivaju destabilizaciju strukture proteina i povećavaju njegovu sklonost tvorbi proteinskih agregata u neuronima koji predstavljaju s (Shaw i Valentine, 2007).

Jedan od predloženih patoloških mehan podrazumeva da mutirani enzim superoksidni radikal. Superoksid potom mož proizvede vrlo reaktivni peroksinitrit koj njihovog (Beckman et al., 1993). Drugi mehanizam podrazumeva Fentonovu reakciju i peroksida u redukovanom obliku koji ulazi u sastav SOD1 pri ļemu dolazi do stvaranja (Rosen et al., 1993). Mutirani kako ļak i katalitiļki neaktivna dovede do pojave bolesti, predloženo je da mutira svojstvo koje se ogleda u formiranju nera proteina. Agregacija SOD1 poredtoksiļnosti enzima takoĎe izaziva inhibiciju aksonaln retikuluma, poremećaj proteazomskog (Sok et al., 2015; Tafuri et al., 2015; Kaur et al., 2016; Parakh i Atkin, 2016), što dovodi smrti neurona (Slika 1). TakoĎe, toksiļnost

neurona, izaziva aktivaciju glijalnih ćelija, povećanog otpuštanja ekscitatornih neurotransmitera, oksidativnog stresa, poremećaja u funkcionisanju mitohondrija i endoplazmatičnog retikuluma, što sve zajedno doprinosi razvoju neuroinflamacije koja predstavlja jedan od ključnih mehanizama bolesti (Barber i Shaw, 2010; Philips i Rothstein, 2014).



Slika 1. Predloženi mehanizmi toksičnosti mutirane SOD1. Sa jedne strane mutirana SOD1 dovodi do pojave oksidativnog stresa usled povećane proizvodnje slobodnih radikala kroz izmenjenu katalitičku aktivnost. Sa druge strane poremećaja u funkcionisanju mitohondrija i endoplazmatičnog retikuluma dolazi do agregacije mutirane SOD1 i njene ko-agregacije sa drugim proteinima i proteinskim šaperonima, i smanjene aktivnosti proteazomskog kompleksa, modifikovano iz Cleveland i Rothstein, 2001.

Mutacije u genima koji kodiraju proteine TDP-43 (TAR DNA-binding protein 43 – TARDBP, *eng.*) i FUS (Fused in Sarcoma, *eng.*) takođe su povezane sa ALS, s obzirom na to da se kod oko 4% fALS i oko 2% sALS pacijenata kod 4 (Andersen i Al-Chalabi, 2011). TDP-43/TARDBP i FUS proteini se eksprimiraju u svim ćelijama u organizmu i uključeni su u procese translacije i iskrajanja RNK, biogeneze mikroRNK i formiranje granula stresa (Ling et al., 2013). Do sada je otkriveno oko 50 mutacija u svakom od ova dva gena, pri

ļemu veĺina mutacija isp(Sreedharan et al., 2008; natno
Kwiatkowski et al., 2009). Iako patofiziološki mehanizmi ko
FUS genima dovode do neurodegeneracije tek treba u potpunosti da se
ustanovljeno da se mutirani TDP-43 i FUS proteini redistribuiraju iz jedra u citoplazmu.
Ovo dovodi do pojave toksiļnih efekata koj
proteina, stvaranje citoplazmatskih proteinskih agregata i formiranje granula stresa
(Ling et al., 2013). Ovo rezultuje u disfunk(Wils et al., Ćelijsk
2010), kao i u izmenjenoj veliļini i dinamici
agregaciju RNKna ivsu pzesiju translacije RNPKr(Vance et al., 2009;
Dewey et al., 2011), ģto sve vodi neuronaka degeneraciji

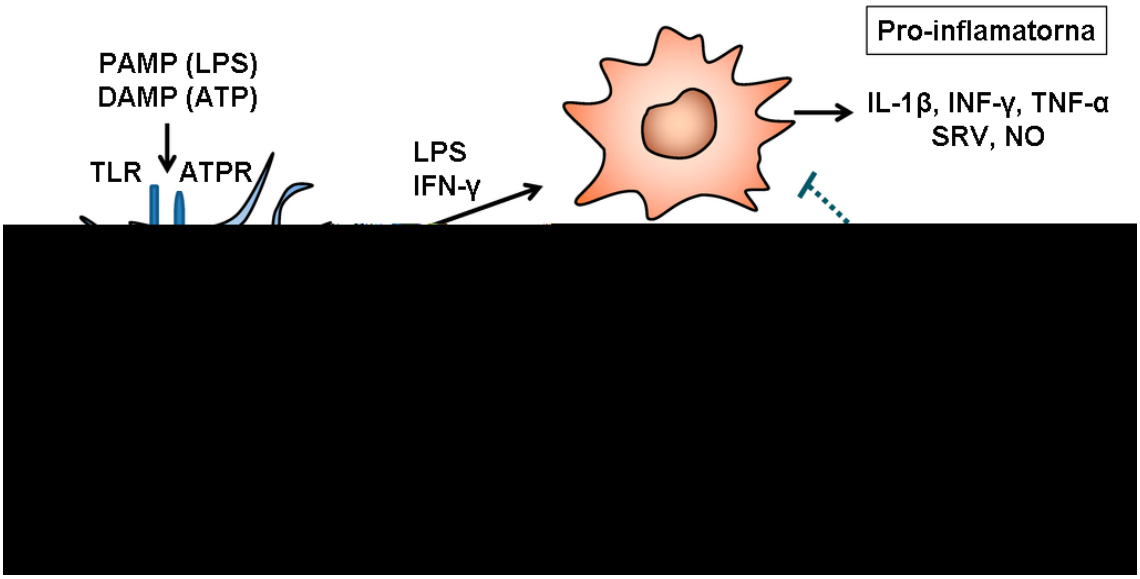
Veliki napredak u razumevanju patogeneze ALS je nastao otkrivanjem mutacija
u c90rf72 genu sa dominatnim naslećivanjem
heksanukleotidnih GGGGCC ponovaka, i koje
20% sALS (DeJesus-Hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011). Međutim,
kako su mutacije u ovom genu identifikovan
potpuno izmenilo razumevanje patogeneze ALS i ukazalo da je ALS zapravo
multisistemsko neurodegenerativno oboljenje, a ne samo nervno-miģiĆna bolest
Akumulacija TDP-43 proteina, kao i pojava p62 pozitivnih a TDP-43 negativnih
unutarĆelijskih inkluzija, u neuronima hipo
neuropatološko obeleģje ALS aimaFTuD cs9l0urļfa7j2e,va
ukazuje na postojanje zajedniļkih (Al-patofizi
Sarraj et al., 2011). Iako taļni mehanizmi kojim ekspan
dovodi do neurodegeneracije u ALS tek treba da budu u potpunosti razjaģnjeni,
predloģena su tri moguća patološka me
haploinsuficijenciju, toksiļnost posredova
translacije ponovaka c90rf72 gena koja dovodi do stvaranja nerastvorljivih dipeptida i
formiranja unutarĆelijski (Ash et al., 2013; Ling et al., 2013). Dodatni
potencijalni mehanizam moģe da bude i toksi
da je uoļeno da unutarjedarna mesta nakup
ponovke c90rf72 gena (DeJesus-Hernandez et al., 2011), kao i da se speci

vezujuĺi proteini vezuju za ove heksanukle
unutarjedarnih i citoplazmatskih inkluzija (Mori et al., 2013).

Mikroglija i njena uloga u patologiji ALS

Mikroglijalne Ćelije imaju mezodermalno porekl
imunokompetentne Ćelije centralnog nervnog
ļitav niz proinflamatornih i antiinflamato
oģteĆenja tkiva i nervnog sistema, kao i različitih egzogenih i endogenih faktor
mirujuĆe mikroglije imaju stimulusi koji se
sa patogenima (PAMP) koji deluju preko „Toll-like“ receptora (TLR), i molekulske
vrste asocijacija (DAMP) koji deluju preko receptora za ATP (ATPR)
(Mosser i Edwards, 2008). Dalja polarizacija aktivirane
zavisi od prisustva proinflamatornih (LPS) i
interferona, od kojih su najvažniji tumor nekrotizirajućih citokina-a kao ģ
4) i 13 (IL-13) (Gordon i Martinez, 2010).

Primarni odgovor tzv. „klasiļno aktivirane“ odnosi
podrazumeva otpuģtanje proinflamatornih
(TNF-α), interleukina-1β, IFN-γ, i slobodnih radikala kiseonika (obodno radikalske vr
monoksid (NO), koji uļestvuju u uklanjanju
praĆeno otpuģtanjem antiinflamatornih
odnosno M2 mikroglija koja
uļestvuju u popravci ģit esika 2). Mikroglija nikada
eksprimira isključivo M1 i M2 citokine, v
citokina i hemokina u zavisnosti od okruģe
drugim Ćelijama. Iz tog razloga
fenotipove u različitim vremenskim trenuci
progresije inflamatorne reakcije mikroglija
astrocitima i inflamatornim
odreĎeni tip aktivacije mikroglije otpuģtanj
molekula (Philips i Rothstein, 2014).



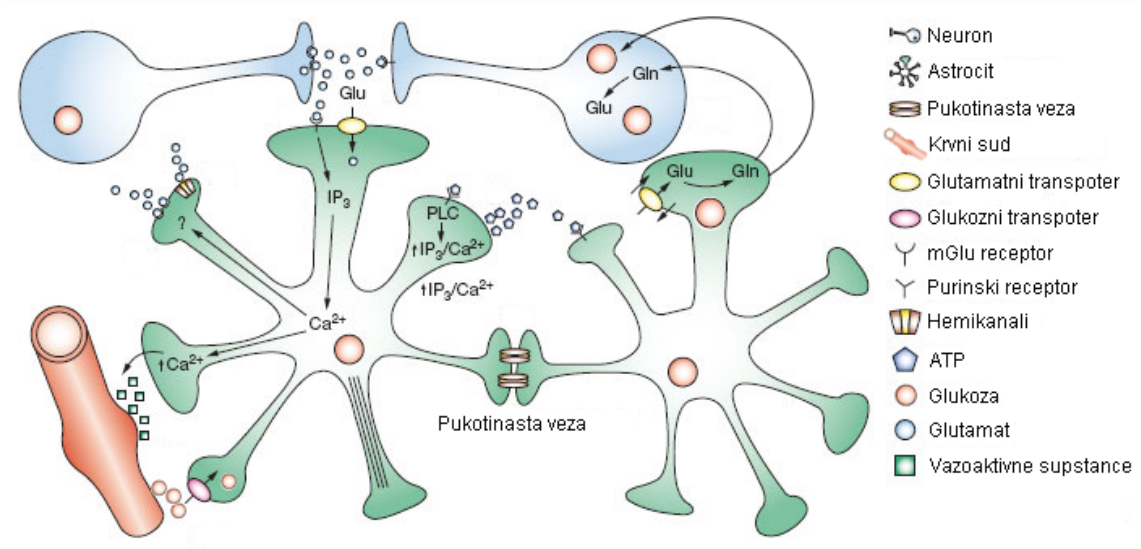
Slika 2. Polarizacija aktivirane mikroglije na M1 i M2 fenotipove i njihove imunoregulatorne uloge. Mirujuće mikroglijalne ćelije mogu biti aktivirane sa patogenima (PAMP) ili molekularnim obrascima (DAMP). U prisustvu LPS i IFN-γ mikroglija zadobija pro-inflamatorne fenotipske odlike uključujući i produkciju NO, TNF-α, IL-1β i slobodno radikalske vrste. U prisustvo IL-4 i IL-13 izaziva alternativnu aktivaciju mikroglije u M2 fenotip koji dovodi do inhibicije funkcija M1 mikroglije proizvodnjom anti-inflamatornih molekula IL-10, IL-4 i IGF-1. Preuzeto i modifikovao Nakagawa i Chiba, 2014.

Kod ALS pacijenata i glodarskih modela bolesti prisutna je jasna mikroglijalna reakcija koja se karakteriše ekspresijom određenih markera koji omogućuju identifikaciju ovih ćelija kao što su CD11b, CD68 markera povezanih sa prezentovanjem antigena, molekul adhezioni molekul 1 i CD86, što ukazuje na prisustvo aktivnih ćelija u infiltratima inflamatornih ćelija (Alexianu et al., 2001; Hall et al., 2001; Henkel et al., 2004; Turner et al., 2004; Henkel et al., 2006; Corcia et al., 2012). Pored toga, pokazano je i da mikroglija povećava proizvodnju (Poloni et al., 2000; Nguyen et al., 2001; Hensley et al., 2003; Meissner et al., 2010). Analiza *post mortem* tkiva ALS pacijenata je pokazala prisustvo mikroglioze u motornom delu kore velikog mozga, motornim jedrima kortikospinalnom traktu i ventralnim rogovima (Kawamata et al., 1992). U transgenim hSOD1 glodarskim modelima bolesti pokazano je da se mikroglijalna reaktivnost javlja u ranim stadijumima

moždine neposredno pomoždinom kao i na mestu povrede kičmene moždine
znaka degeneracije motornih neurona (Alexianu et al., 2001; Saxena et al., 2009). Pri tome, smatra se da je ova mikroglijalna reakcija posredovana uglavnom lokalnom proliferacijom ćelija iz samog tkiva centralnog nervnog sistema (Ajami et al., 2007; mikroglijalnom diferencijacijom perivaskularnih monocitnih prekursora (Gowing et al., 2008).

Astrociti i njihova uloga u patologiji ALS

Astrociti su ćelije ektodermalnog porekla (slika 3). Jedna od najvažnijih i najboljeg homeostaze jona, recikliranju neurotransmitera u sinapsi i njihovom metabolizmu. Jedna od najvažnijih i najbolje proučenih funkcija astrocita je njihova uloga u ciklusu glutamat-glutamin (Danbolt, 2001). Glutamat je jedan od najvažnijih neurotransmitera u centralnom nervnom sistemu koji posreduje u velikom broju ekscitatornih sinaptičkih komunikacija između neurona. Nakon oslobađanja u sinaptičke pukotine, koja se nalazi između presinaptičke i postsinaptičke membrane, preko glutamatnih transportera EAAT1 i EAAT2 (ili GLAST i GLT-1 kod glodara) koje eksprimiraju astrociti služi za sprečavanje prekomerne aktivacije postsinaptičkih glutamatnih receptora koja može da dovede do ćelijske smrti koja se naziva glutamatna ekscitotoksičnost (Van Den Bosch et al., 2006). Iz tog razloga, prvi dokazi o disfunkciji glijalnih ćelija u ALS bili su upravo smanjenu ekspresiju glutamatnih transportera na astrocitima kod ALS pacijenata i glodarskih modela ove bolesti. Ove studije pokazale su smanjenu ekspresiju EAAT2 odnosno GLT1 glutamatnog transportera u motornom delu kore velikog mozga i kičmenoj moždini kako kod humanih tako i kod glodarskih modela zasnovanih na povećanoj ekspresiji mutiranog SOD1 (Rothstein et al., 1992; Bruijn et al., 1997; Howland et al., 2002). Takođe, *in vitro* i *in vivo* studije su pokazale da specifično uklanjanje transportera u astrocitima može da izazove selektivnu kao i kod humanih pacijenata (Rothstein et al., 1996).



Slika 3. Uloga astrocita u ciklusu glutamat-glutamin i metaboliţkoj po
Glutamat koji se oslobodi tokom sinaptiţke tra
glutamatnih transportera. U astrocitima glicir
Glicin se potom doprema neuronigliain prevodi ku jima se
glutamat ţime se postiţe recikliranje ovog izu
astrociti su u kontaktu sa krvnim sudovima ţi
vazokativnih supstanci kaksid igdenozin. Oni preuzimaju aglandir
nutritijente, kao ţto je glukoza, iz krvotoka
astrocita preko pukotinastih veza, dopremaju nutritijente do neurona koji ih koriste za svoje
metaboliţke potrkovane iz Magistretti i Pellerin, 2006. modifi

Druga bitna funkcija astrocita je njiho
neuronima. Sa jedne strane, s obzirom na to da ulaze u sastav krvno-moţdane barijer
astrociti su u bliskom kontaktu sa krvotokom, dok su sa druge strane meĽus
povezani preko pukotinastih veza, ţto im
metaboliţkih substrata i njihov prenos na
aktivnosti neurona i zahtevi za pomeĺavanjem
glikolitiţku aktivnost (Pellerin i Magistretti, 1994). Ie gluko
glukoza i laktat se preko astrocita i oligodendrocita koji su sa njima spojeni
pukotinastim vezama distribuiraju kroz parenhim nervnog tkiva do neurona koji ih
koriste kao energentski supstrat (Funfschilling et al., 2012; Lee et al., 2012).

Astrociti se uobiţajeno identifikuju preko
specifiţnih za ove kiseline fibrilarnie proteink(GFAP), aldehidnu i glija

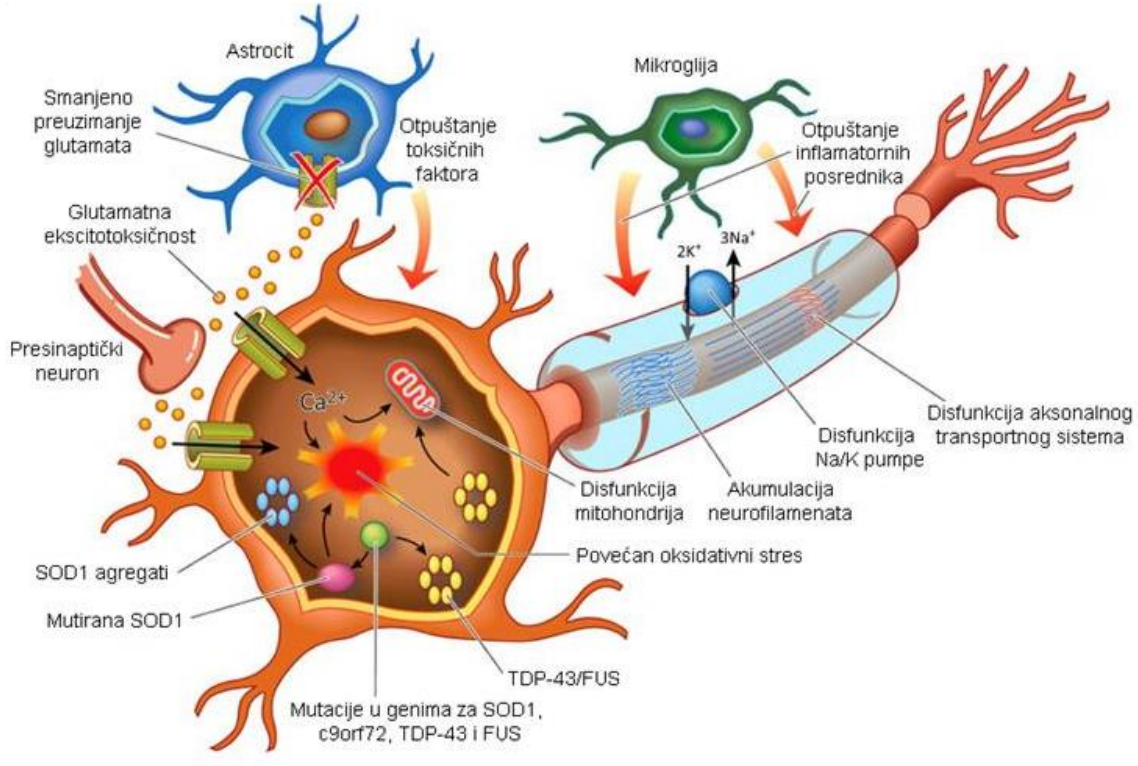
dehidrogenazu 1L1 (ALDH1L1), EAAT1/GLAST, EAAT2/GLT1 i akvaporin 4 (AQP4). U slučaju oštećenja neurona, u njihovoj neposrednoj blizini, astrociti odražavaju promene u ekspresiji njihovih specifičnih proteina kao što su naziva astroglioza. Sa druge strane, u slučaju oštećenja neurona ekspresiju glutamatnog transportera GLT1 (Rothstein et al., 1992; Bruijn et al., 1997; Tawfik et al., 2008). U mozgu ALS pacijenata astroglioza je prisutna i u sivoj i u beloj masi moždanog gornjeg dela kore velikog mozga (Kushner et al., 1991; Nagy et al., 1994). U kičmenoj moždini astroglioza se javlja pua cijena ventralnim i dorzalnim korenovima, kao i u regionima gde vlakna kortikospinalnog trakta ulaze u sivu masu (Schiffer et al., 1996). U glodarskim modelima bolesti astroglioza je pokazana u kičmenoj moždini naletima, postajući sve (Keller et al., 2009). Za razliku od napredovanja od mikroglioze, astroglioza je u manjoj meri posredovana proliferacijom astrocita, a u većoj meri funkcionalnom aktivacijom ekspresiji njihovih proteina i morfologije ćelija (Bruijn et al., 1997; Gowing et al., 2008; Lepore et al., 2008).

Mehanizmi glijalne toksičnosti u ALS

Značajan doprinos - potvrda da ne-ćelijske ćelije imaju ulogu u razvoju ALS je proistekao iz istraživanja ekspresijom mutirane SOD1. Progresija bolesti su bili pod mišjeva značajnim uticajem nivoa himerizma za mutirani veći broj ćelija koje eksprimiraju mutirani brže tok (Clement et al., 2003). Takođe, gubitak motornih eksprimiraju mutiranu SOD1 bilo je ograničeno izražavanje neuronalnim ćelijama koje isto eksprimiraju neuronalnim ćelijama. Suprotno tome, pojavljivanje znakova bolesti, i oštećenja, kao što je unutarćelijska inkluzija ubikvitinom ćelijama koje eksprimiraju mutiranu SOD1.

Druge studije su pokazale povećanu ekspresiju kako proantiinflamatornih molekula kod ALS pacijenata (Poland et al., 2000; Nguyen et al., 2001; Hensley et al., 2003; Henkel et al., 2004; Henkel et al., 2006; Meissner et al., 2010). I istovremeno, u mikrogliji dolazi do povećane ekspresije reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta usled uhodne aktivacije NADPH oksidaze 2, kao i do povećane ekspresije enzima ciklooksigenaze 2 koji učestvuju u sintezi inflamatornih prostanoida (Almer et al., 2001; Beers et al., 2006; Wu et al., 2006). Takođe, *in vitro* studije su pokazale direktnu toksičnost mutiranih kiseonika iz modela bolesti prema motornim neuronima posredstvom proinflamatornih molekula (Slika 4) (Weydt et al., 2004; Xiao et al., 2007; Harraz et al., 2008; Meissner et al., 2010). Pretpostavlja se da mikroglija ispoljava svoja neurotoksična dejstva putem signalnog puta zavisnog od nuklearnog faktora kapa B, s obzirom na to da smanjenje aktivnosti ovog signalnog puta specifično u mikrogliji dovodi do kašnjenja bolesti i produženja preživljavanja (Frakes et al., 2014).

Astrociti su takođe uključeni u degenerativni proces ALS (Slika 4), ponovo s obzirom na to da je pokazano da su, kao i mikroglija, primarni astrociti izolovani iz mišjih modela bolesti sa mutiranom SOD1 toksični za motorne neurone poreklom od embrionalnih matičnih ćelija (Di Giorgio et al., 2007; Nagai et al., 2007). Interesantno je i to da su astrociti poreklom od fALS i sALS pacijenata takođe toksični za motorne neurone u ko-kulturi (Haidet-Phillips et al., 2011). Iako astrociti nisu po definiciji ćelije imunog sistema, pokazalo se da doprinose inflamatornom odgovoru. I zapravo, astrociti poreklom od fALS i sALS pacijenata pokazuju ushodnu regulaciju 22 citokina u poređenju sa astrocitima poreklom od zdravih kontrola (Haidet-Phillips et al., 2011).



Slika 4. Patofiziologija lateralne skleroze. Na slici su sumirani patofiziološki mehanizmi koji leže u osnovi neurodegeneracije. Ovi mehanizmi su multifaktorijalni i karakterišu se složenom interakcijom genetičkih puteva. Disfunkcija astrocita dovodi do smanjenog preuzimanja glutamata iz sinaptičke pukotine. Ekscitotoksičnost rezultuje u povećanom ulasku kalcijuma u neurone što dovodi do neurodegeneracije kroz aktivaciju različitih signalnih puteva. Ekscitotoksičnost takođe izaziva povećanu produkciju reaktivnih vrsta kiseonika što doprinosi neurodegeneraciji. Mutacije u c9orf72, SOD1, TDP-43 i FUS rezultuju u poremećenom metabolizmu RNK i proteina što dovodi do stvaranja toksičnih agregata u neurone zbog indukcije oksidativnog stresa, disfunkcije mithondrija i aksonalnog transporta, kao i akumulacije neurofilamenata. Sa druge strane, proizvodnji proinflamatornih i drugih toksičnih faktora neurona. Preuzeto i modifikovano iz Vucic et al., 2014.

Iako se može dovesti u pitanje kultura znanja astrocita i motornih neurona za *in vivo* patofiziologiju bolesti pronađena izražena sličnost između *in vitro* ko-kultura astrocita i motornih neurona i prigeva sa mutiranom SOD1 (Rothstein et al., 2005). Međutim, ove studije nisu uspele da identifikuju puteve odgovorne za uočenu toksičnost, kao

mehanizmi prisutni kod ALS pacijenata. Za sada samo gubitak astrocitnog EAAT2 glutamatnog transportera ostaje jedini potvrđeni ljudi i glodarskih modela bolesti.

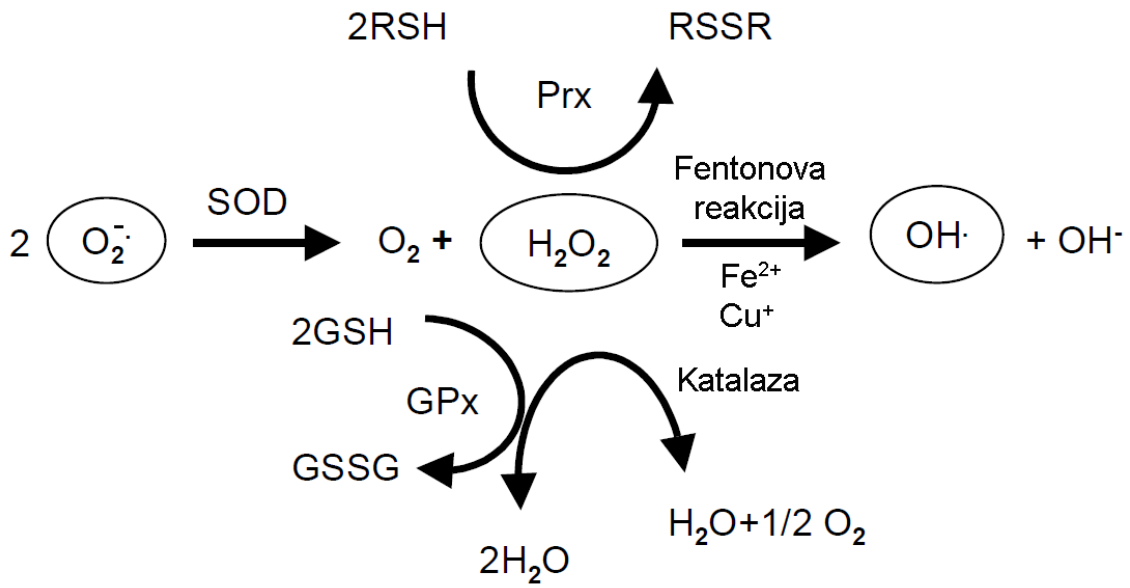
Više studija je pokušalo da istraži da faktora može da bude korisna kod ALS pacije SOD1 (sumirano u Philips i Robberecht, 2011). Generalni zaključak ovi su manje ili više specifično ispitivale uti hemokina, jeste da su se terapije sa antiinflamatornim agensima pokazale ili kao krajnje neuspešne ili sa vrlo skromnim uticajem na bio jako zavisan od specifične mutacije SOD1 prisustva potencijalnih kompenzatornih mehanizama drugih inflamatornih faktora, kao i od nespecifičnog dejstva ovih leka, te pretpostavlja na d antiinflamatorne koji bi mogli da doprinesu pov

Međutim, pored proinflamatornih i toks mikroglije i astrocita, nedavne studije su pokazale i bitnu ulogu oligodendrocita u patofiziologiji ALS-a. Oligodendrociti su izgrađeni mí mijelinskog omotača koji okružuje aksone kondukciju akcionih potencijala. Pored tog neuronima pošto eksprimiraju monokarboksilatni transporter 1 (MCT1) preko kojeg se vrši izbacivanje metaboličkih supstrata, k preko MCT2 preuzimaju neuroni (Rafiki et al., 2003; Lee et al., 2012). U *post mortem* tkivu mozga i kičmene moždine ALS pacijenat oštećenja oligodendrocita (Kang et al., 20 ukazuje na smanjenu metaboličku (Lee et al., 2012). Oštećenje i degeneracija oligodendroci motornih neurona, kao i smanjena ekspresija komponenti mijelinskog od strane ovih ćelija su pokazani i u mišje (Lee et al., 2012; Kang et al., 2013; Philips et al., 2013). Takođe, pokazano specifično ukidanje ekspresije mutirane SOD značajnog odlaganja u razvoju bolesti i po G93A mutacijom, pri čemu se smatra da je ovaj

posredovan spreļavanje (Kang et al., 2013). Svakako, kasnija istraģivanja su neophodna kako bi se u potp progresiji bolesti.

Uloga prelaznih metala u patologiji ALS

Kao ģto je veĺ napomenuto, mutacije u SO mogu da utiļu na mesta za vezivanje jona b ukidajuĺi vezivanje ovih jona i na taj naļin njihove unutarĺe (Seetharaman et al., 2009). Poremeĺaji u metabolizmu razliļitih prelaznih metala, ka velikom broju neurodegenerativnih oboljenja (Vonk i Kloomp, 2008; Lovejoy i Guillemin, 2014). Povišeni nivoi cinka u centralno da dovodu do poveĺane glutamatne ekscitoto neurona (Smith i Lee, 2007). S tim u vezi, vaģno je istaĺi ekscitotoksiļnost jedan od glavnih patoloģ jedini do sada odobreni lek za terapiju glutamata i na taj naļin smanjuje aktivnie bakar i gvoždje mogu ući u Fentonove reakcije u kojoj se vodonik-peroksid redukuje u vrlo ģtetni hidroksilni radikal, kiseoniļnih vrsta (Slika 5) (Jellinger, 2013). oksidativnog stresa



Slika 5. Ġematski prikaz stvaranja i uklanjanja slob Superoskidni radikal koji se stvara tokom pro aktivnoġÍu superoksid di-perokid. Vodonik-perok se potom prevodi redukuje pod uticajem niza anti-oksidativnih enzima in, kglutationgto su peroksidaza im, ukpristustvu slobodnih redoks-aLkuttiivnih oblika gvoġI vodonik-peroksid se kroz Fentonovu reakciju prevodi u hidroksilni anjon i vrlo reaktivni hidroksilni radikal. GSH ï redukovani glutation, GSSG ï oksidovani glutation, GPx ï glutation peroksidaza, Prx ï peroksiredoksin, SOD ï superoksid dismutaza. Preuzeto i modifikovano iz Carri et al., 2003.

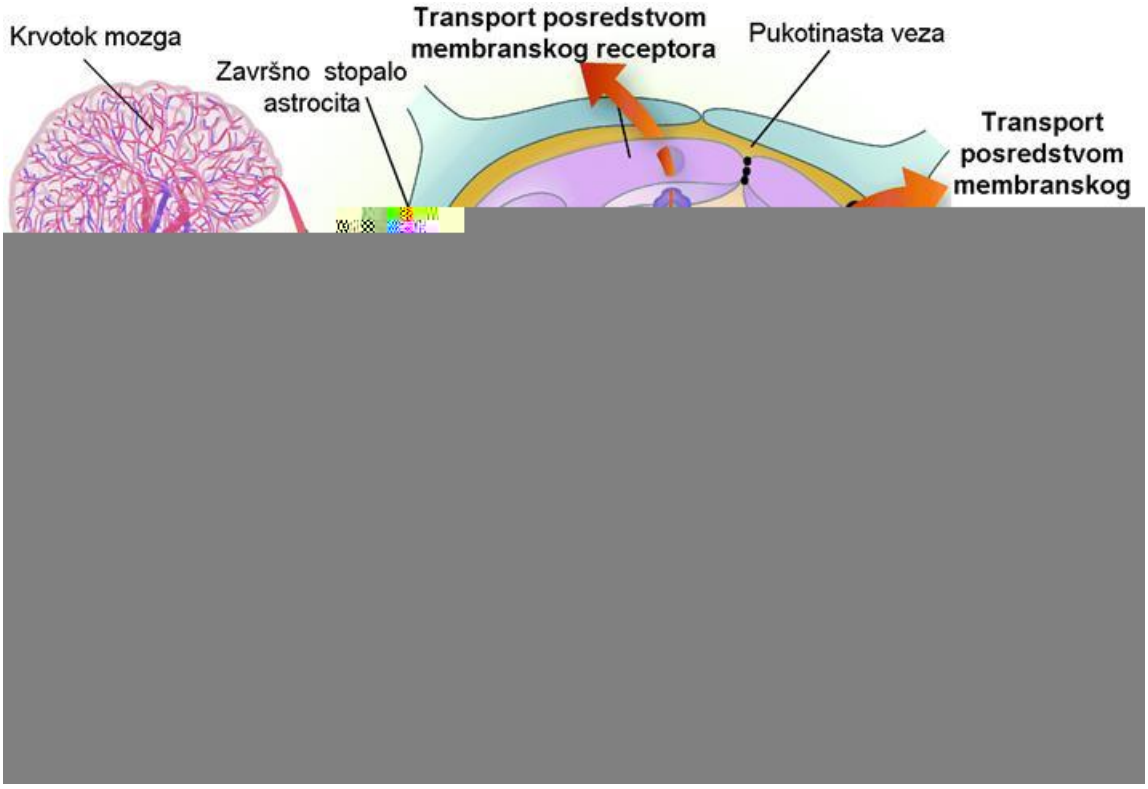
Uloga cinka, bakra i gvoġLa u ALS je p povigene nivoe ovpiihmaetoja telu nocsetrie birosserum (Hozumi et al., 2011; Roos et al., 2013), kao i poveÍane koncentraci i akumulaciju gvoġLa u mo (Ikeda et al., 2012; Kwan et al., 2012; Kwan et al., 2012; Ignjatovic et al., 2013). Povigeni nivoi bakra i cinka kiļmene moġdine transgenih mi (Lelie et al., 2011), dok su povigeni nivoi -sumpor, kojem mogu da bud izvor slabo vezanog redoks-aktivnog, gvoġLa Leni u kiļmen moġdanom stablu, hipokampusu SOD1 G93A pacova (Popovic- Bijelic et al., 2016). TakoĽe, tretman sa razliļitim hela (Petri et al., 2007; Tokuda et al., 2008; Wang et al., 2011), kao i povigena eks unutarÍelijskog proteina (Tokuda et al., 2014), sue metal

dovel i do produ ć enog h SOD1 G93A mi š eva , nego to ukazuje na v a ž nost ovih metala u patofiziologiji bolest

Krvno-moždana barijera i njena funkcija u ALS

Krvno-moždana barijera (KMB) moždanih kapilara je selektivna barijera koja se nalazi između cirkulišućeg krvotoka i centralnog nervnog sistema i štiti ga od potencijalno štetnih supstanci (Abbott et al., 2004; Abbott et al., 2006). Strukturu KMB i KKMB čine endotelne ćelije kapilara mozga, bazalna lamina, pericити i astrociti. Endotelne ćelije su završna membrana koja okružuje mozak. Međusobno povezane jakim pukotinastim vezama (engl. tight junctions) koje čine proteini klaudin, okludin i adhezivni molekuli spojnih ćelija (engl. junctional adhesion molecules), citoplazmatski proteini, kao što je protein 1 koji sadrži zonulu okludens (engl. zonula occludens protein 1, ZO-1) i drugi. Prisustvo pukotinastih veza sprečava nekontrolisan protok supstanci kroz paracelularni prostor između endotelnih ćelija, čak i onih koje su veoma male, kao što su etanol, ugljen dioksid, kiseonik i ugljen dioksid, koji lako difunduju kroz ćelijske membrane. Nutrijenti i drugi molekuli neophodni za funkcionisanje nervnog sistema ulaze u mozak ili aktivnim transportom preko specifičnih prenosnih sistema, kao što je slučaj sa glukozom i aminokiselinama, ili olakšanom difuzijom preko odgovarajućih membranskih receptora, kao što je slučaj sa transferinom (Slika 6) (Pardridge et al., 1985; Zhang i Pardridge, 2001).

Sa druge strane, KMB ograničava razmenu između krvi i moždanog tkiva, što omogućava preciznu regulaciju specifičnih jonskih kanala i transportera, koji održavaju optimalnu koncentraciju jonskog sastava koje bi mogle da poremete nadražljivost i transmisiju. Takođe, postojanje KMB omogućava razvoj neuroaktivnih agenasa koji deluju centralno u nervnom sistemu od onih koji deluju u perifernim tkivima i krvi, tako da slični agensi mogu da se koriste u sistema bez postojanja rizika za (Abbott et al., 2006).



Slika 6. Šematski prikaz mogućih transportnih mehanizama na nivou KMB. Ćelije endotela su međusobno spojene preko pukotinastih veza, koje okružuju perociti, završna stopala astrocita i neuralne ćelije čine gliovaskularnu jedinicu. Ovakva struktura KMB omogućava efikasnu kontrolu razmene između krvotoka i mozga, pri čemu je ulazak velikih i hidrofilnih molekula ograničen, dok je lipofilnim molekulima omogućeno slobodno da prolaze pasivnom transcelularnom difuzijom. Preuzeto od Salvia et al., 2016.

Iako su u normalnim fiziološkim uslovima strukture, njihove karakteristike su ipak podložne promenama tokom različitih patoloških stanja (Abbott, 2005). Velike količine različitih supstanci mogu naći u cirkulaciji ili biti izlučene od strane KKMB mogu da dovedu do slabljenja pukotinastih veza endotelnog sloja, kao i da poremete transportne i metaboličke funkcije ćelija. Tako na primer, različiti proinflamatorni faktori poput arahidonska kiselina, prostaglandini, leukotrieni, ali i slobodni radikali i azotni oksid, mogu tokom neuroinflamatornog odgovora da dovedu do slabljenja KMB i KKMB (Abbott, 2000). Njihove pukotine Ovo zatim doprinosi (Huber et al., 2001), omogućavajući ulazak

ulazak ćelija i drugih komponenata imunskog sistema u mozak, što dalje dolazi do pojačavanja neuroinflamatornih pro

Mnogobrojne studije su pokazale prisustv ljudi obolelih od ALS tako i kod transgenih glodarskih modela bolesti (Brylev et al., 2012; Alvarez et al., 2013; Garbuzova-Davis i Sanberg, 2014). Prve indikacije KMB i KKMB u ALS su podrazumevale povećа cerebrospinalnog (Leonardi et al., 1984; Apostolski et al., 1991), kao i nakupljanje IgG i C3 proteina komplementa imunskog sistema, koji IgG unutar motornih neurona i aktivitanih m delu kore velikog mozga ALS pacijenata (Donnenfeld et al., 1984; Engelhardt i Appel, 1990). Prisustvo slabijeg intenziteta signala hSOD1 G93A kod mog dina pacovskog modela bolesti, što (Woodruff et al., pojave 2008). Dodatne histološke studije na mogućnom hSOD1 G93A modela su pokazale degeneraciju komponeti KMB i KKMB kao i propuštanje makromolekula (Garbuzova-Davis et al., 2007; Garbuzova-Davis et al., 2007; Miyazaki et al., 2011), povećanu perivaskularnu ak hemosiderinski (Nicaise et al., 2009; Winkler et al., 2013), smanjene protoka krvi i dužine kapilara praćene mi nekoliko proteina koji ulaze u sastav pukotinastih veza (Zhong et al., 2008; Henkel et al., 2009), pri čemu je većina ovih promena uočena u odnosu na motorne neurona (Zhong et al., 2008; Nicaise et al., 2009; Miyazaki et al., 2011). Još bitnije pokazano je da stepen oštećenja neurona kod ovih ž integritetu KMB i KKMB (Winkler et al., 2014).

Sa druge strane, studije oslikavanja magnetnom rezonancijom (MRI) su pokazale prisustvo žarišta neuro (Basser et al., generacij 2002; Zang et al., 2004; Niessen et al., 2006; Bucher et al., 2007), kao i nakupljanje gvožđa u motornom (Jeong et al., 2013), kako kod ALS pacijenata tako i kod glodarskih modela bolesti. Međutim, MRI ek stanja KMB su pokazali dvosmislene rezultate. Naime, dok su eksperimenti na hSOD1 G93A pacovima pokazali povećanu KMB propustljivost u odnosu na

mogdanih (Ankjus et al., 2009; Bataveljic et al., 2009), eksperimenti na hSOD1 G93A miġevima nisu pronaġli promene u propus stadijumu bolesti (Evans et al., 2014), iako su sliļne histopatoloġ oba ġivotinjska modela.

Od posebnog znaļaja za patologiju ALS strukture i funkcije KMB. Naime, *in vitro* studije su pokazale da je prisustvo astrocita neophodno za indukciju mnogih karakteristika KMB, kao ġ endotelskih Ślija i pericita, jaļanje pu lokalizacija razliļitih membranskih transp enzimskih sistema (Dehouck et al., 1990; Rubin et al., 1991; Ramsauer et al., 2002). Sa druge strane, perivaskularna zavrġna stopal membranskih kanala za transport vode, akvaporina 4 (AQP4), i kalijumovih jona, Kir4.1, koji imaju vaġnu ulogu u regulaciji jonske i osmotske homeostaze CNS. U ovom pogledu, bitno je napomenuti da su poveĺan Kir4.1 pokazane u mogdanom stablu i mot simptomatskih hSOD1 G93A pacova, kao i u astrocitima izolovanim iz ovil (Bataveljic et al., 2012). Ovo je ukazalo na smanjenu spos homeostazu vode i jona, ġto moġe da dove homeostaze nervnog tkiva, kao i degeneracije neurona u ALS.

Oksidativni stres u ALS

Oġteĺenje KMB i KKMB dovodi do poremeĺ nervnog sistema, ġto kao rezultat ima akt neuroinflamacije koji se karakteriġe pove signalnih molekula i reaktivnih kiseoniļnih vrsta (RKV), neurodegeneracije (Zlokovic, 2008). Sa druge strane, izazivanjem oksidativnih oġteĺenja i promena u pukotinastim vezam kiseoniļnih vrsta moġe da dovede do poreme Promena redoks statusa tkiva oznaļena kao ravnoteġi izmeĽu proizvodnje RKV i sposobno

nastalu njihovim delovanjem. Uvod i proizvodnja RKV
metabolizma (Coyle i Puttfarcken, 1993; Lenaz, 1998), najviše usled curenj
iz mitohondrijalnog respiratornog lanca, ģt
kiseonika tokom oksidativne fosforilacije i nastanku superoksidnog radikala i vodonik-
peroksida. Pored toga, RKV u manjoj meri n
oksidativnih enzima kao ģto su ksantin oksi
endoplazmatiļnom retikulumu peroksid i azotni oksid su i radik
takoĽe prosiezkvuonddearkai oglasnici, pogotovu u
MeĽutim, ni sup-peroksid nisu vdsokoreaktivni, dioba imogu da
budu ukljuļeni u dalje reakcpiejreokusikojmiogće m
reaguje sa azotnim oksidom (Pryor i Squadrito, 1995; se stv
Beckman i Koppenol, 1996), dok od vodonik-peroksida može da nastane hi
anjon u Fentonovoj reakciji katalizovanoj sa Fe^{2+} i
Cu^{+} (v. gore i Sliku 5). I peroksinitrit i hidroksilni anjon su vrlo
vrste koje mogu da oģtete proteine, lipide
promene u konformaciji proteina, ausled reme Ía j
oksidacije nezasiĺenih masnih kiselina, kao

Brojna istraživanja ukazuju da slobodni radikali i oksidativni stres igraju bitnu ulogu u razvoju i progresiji ALS (Barber i Shaw, 2010). Studije koje su pratile markere oksidativnog stresa u *post mortem* tkivu ALS pacijenata su poka
karbonilacije proteina (Shaw et al., 1995) i nitrotirozina u motornom delu kore
velikog mozga (Ferrante et al., 1997) s ALS pacijenata. TakoĽe, p
nitrotirozina, markera oksidativnog oģteĺen
motornim neuronima kiļmene (Abe et al., 1995; Beal et al., 1997). Pored toga, u motornim neuronima ALS pacijenata su pokazani i
nivoi ekspresije enzima sintaze azotnog oksida (Abe et al., 1997), ģto je ukazalo
prisustvo poveĺane proizvodnje reaktivnih a
pokazano u kiļmenoj tečnosti (Shibata et al., 2001), dok su nivoi 8-cijen
hidroksi-2-deoksiguanozina (8-OHdG), markera oksidovane DNK, b
cervikalnom delu kiļmene moždine (Fitzmaurice et al., 1996; Ferrante et al., 1997). Studije koje su analizirale cerebrospina

bi se markeri oksidativnog stresa pratili u ranijem stadijumu bolesti, su pokazale povišene 8-OHdG (Bogdanov et al., 2000; Ihara et al., 2005), 4-hidroksinonenala (markera lipidne peroksidacije) (Smith et al., 1998; Simpson et al., 2004), i askorbil radikala (Ihara et al., 2005) u uzorcima ALS pacijenata.

Dokazi o oksidativnom stresu su pokazani i kod transgenih životinjskih modela. Povećano oksidativno oštećenje DNK (Warita et al., 2001; Aguirre et al., 2005) kao i karbonilacija proteina (Hensley et al., 2002) su pokazani u hSOD1 G93A miševa. Povećana proizvodnja superoksidnog anjona u istom mišjem modelu (Bogdanov et al., 1998; Liu et al., 1999), prije nego nivo njihove proizvodnje progresivno rastao sa razvojem bolesti (Hall et al., 1998). Također, povećana lipidna peroksidacija je uočena kod transgenih miševa (Mattiazzi et al., 2002).

Cilj istraživanja

Iako je veliki broj različitih patofizi
progresiji ALS, tako da se vremenski sled, kao
pojedinačnih mehanizama u bolesti nisu u p
cilj ovog istraživanja je da se detaljnije ispitaj
sled glavnih patoloških promena, procesa n
motornim (moždanom i kičmenom) centrima u mozgu transgenog
hSOD1 G93A pacovskog modela ALS, u presimptomatskoj i simptomatskoj fazi
bolesti.

Iz glavnog cilja proizišli su sledeći zadac

1. Ispitati vremenski sled (presimptomatska *vs* simptomatska faza) i regionalni profil
proliferacije i aktivacije astrocita i mikroglije u
hSOD1 G93A pacova i utvrditi mehanizme koji ovo
glijalnih ćelija.

2. Ispitati povezanost promena u unutarćel
SOD1 proteina sa aktivacijom i patološkim uticajem glijalnih

3. Ispitati promene u homeostazi redoks ak
elemenata u moždanom tkivu hSOD1 G93A pacova.

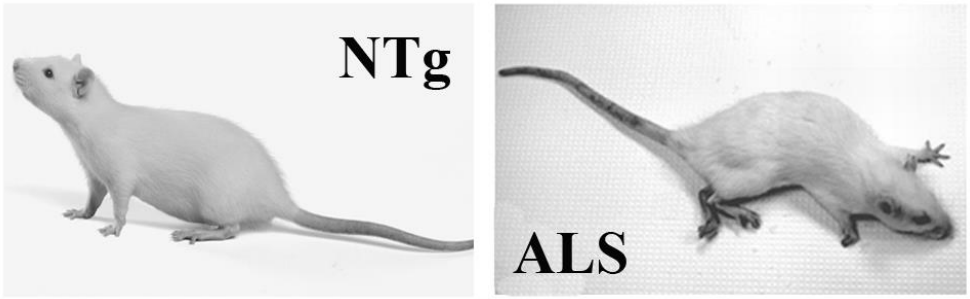
4. Ispitati prisustvo, kao i vremenski i regionalni profil promena u redoks statusu
moždanog tkiva - mitohondrija u mozgu hSOD1 G93A pacova.

Dobijeni rezultati treba da pruže nova saznanja o patolog
hSOD1 G93A pacova, kao i da pruže uvid u rane ma

Materijali i metode

Eksperimentalne ģivotinje

Eksperimenti su rađeni na pacovima (002148-Tg, Sprague-Dawley NTac: SD-Tg (SOD1G93A) L26H) kojima je u genom kopija ubaļen ljudskog *sod1* gena sa dominantnom hSOD1 G93A mutacijom (hSOD1 G93A pacovi Taconic, Hudson, NY, SAD) prvi put opisani od strane Howland et al. (2002), koji razvijaju simptome bolesti motornih neurona nalik ALS. Prvi simptomi bolesti se kod ovih ģivotinja ispoljavaju kao unilateralna (Slika 7). Progresija simptoma bolesti je vrlo brza i traje oko 3 nedelje. Odrhavanje hSOD1 G93A pacova i njihovo ukrštanje sa netransgenim pacovima Sprague-Dawley divljeg soja. Kao kontrole u eksperimentima su korišćeni Sprague-Dawley divlji ģivotinje soja (NTg).



Slika 7. Eksperimentalni pacov ģivotinje (levo) i ALS pacov u krajnjoj fazi bolesti (desno). Preuzeto i modifikovano iz Howland et al, (2002).

hSOD1 G93A i NTg pacovi su bili poreklom iz transgenih hSOD1 G93A pacova i Sprague-Dawley pacova divljeg soja postignuta maksimalna genetiļka sliļnost između i isključena somaguća genetiļka raznolikost rezultata

ġivotinje su gajene u ciklusu dan/*ad*oÍ od 1
libitum. Svi eksperimenti su izvedeni u skladu
propisanim od stjanez aSrpprsokudgavadjeneġemborat
odobreni su od strane Etiļkog komiteta Bio
(broj dozvole: EK-BF-2016/03).

Genotipizacija ġivotinja metodom polimeraz

Provera prisustva hSOD1 G93A transgena u ġivotinjama d
transgenih hSOD1 G93A pacova i Sprague-Dawley pacova divljeg soj
metodom na DNK izolovanoj iz tkiva repa pacova. Od svakog pacova starosti oko 4
nedelje je uzet odseļak repa veliļine 0,5
(TDB) koji sadrġi pH 8,0, 50 mM EDTA 0,5% natrijum dodecil
sulfat. Odseļci su inkubirani u TDB 15 min
razgraĽuju DNK. Zatim je u svaki uzorak do
odnosu 187 εl TDB i centrifugiranje 20 mg/ml. Ovako pripremljeni K kon
uzorci su ink- 18 h na +56 °C. Nakon je denaturiranog
14000 x g u trajanju od 5 min. Supernatan
destilovanoj vodi (ddH_2O) i inkubiran 15 min na +95 °C kako bi doġlo do r
lanaca dvolanļane DNK.
Svaku PCR smeġu su ļinile sledeĺe komponent
x 9,5 ε$_2$O, dd H
x 12,5 εl PCR-smeġa ternu Mil xeotida (0,4 mM po n

dejstvu ultraljubiļastih zraka unutar lami
minuta. Glava i vrat ģimvoettiamnjoalosmu, dezpiontfoimk
ģrtavnoev dekapitacijom pomoĺu disekcionih mak
Petri ģolju sa ledom gde je mozak izolovan
hladnim sonim rastvorom fosfatnog pufera (PBS) pH 7.4 (8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,15
g/l Na_2HPO_4 i 0,2 g/l KH_2PO_4 rastvoreni i ddH_2O). Potom su pod binokularnom lupom
prvo od mozga odvojene moģdane ovojnice, a
mozga zajedno sa hipokampusom odvojene od c
uklonjen koringeĺepnijnecmetdei, seakcoiļoi ģĺene hemisfe
prebaļene u epruvetu o-1d5 +15 memdijsuama 5 kmolji hlja
osnovni Leibovitz L-15 medijum (Gibco, Termo Fisher Scientific, Woltham, SAD), 2
mM L-glutamin, 100 IJ/mlstreptomicina i 0,1% BSA. Epruvete 100 εg
su prebaļene u laminarnu komoru za sterilno
moģdanog tkivastipļinpiemtonmasstaavpkoam od 1 ml do
Ćelijske suspenzije. Ćfugiranja 5 min na 500 x g, pakom zija je
ļega je supernatant odliven a Ćelije koj
resuspendovane u 5 ml L-15+ medijuma i opet centrifugirane 5 min na 500 x g. Nakon
centrifugiranja supernatanenut2 mljL-15+ medijumaven, a Ć
prebaļene u tubicu od 2 ml i provuļene po
Posle poslednjeg provlaļenja kroz iglu Ćel
15 ml sa 3 ml L-15+ medijuma i ponovo centrifugirana 5 min na 500 x g. Supernatant je
odliven, a Ćelije su resuspendovaºCkoji u 2 ml
je sadrģao osnovni DMEM medijum (Gibco, Ter
2mM L-glutamin, 100 IJ/ml penimMnatrijumapiruvat100 εg/m
i 10% fetalnog teleĺeg sFBS)u Dobijena (suspenzija fetal
Ćelija je potom dodata u sterilnisa 3pmlastiļni
DMEM+ medijuma zagrejanog na 37 ºC, koji su protokuboratorijumu. Ćel
kulture su gajene u *in vitro* uslovima u inkubatoru sa vlaģn
ugljen dioksida od 5% i na temperaturi od 37 ºC.

Prva promena medijuma u kojem su Ćelije
medijumom je izvrģena 48h nakon izolacije,

na svaka dva dana kako bi se favorizovao rast astrocita u odnosu na ostale tipove glije.

Pogto ćelije kultivisane na ovaj način predstavljaju mešovitu kulturu nervnog tkiva u kojoj su najzastupljeniji astrociti, a zatim mikroglija i u manjoj meri oligodendrocite, 5 dana nakon zasejavanja, kada su ćelije dostigle konfluentnost od 70%, odnosno pokrila 70% površine flaskova, ćelije su morali da se podvrgnu mehaničkom uklanjanju mikroglije. Naime, medijum u flaskovima je zamenjen DMEM+ medijumom u koji je bio dodat 25mM HEPES i flaskovi su vraćeni u inkubator na najmanje 30 minuta. Čepovi flaskova obmotani parafilmom kako bi se sprečila kontaminacija iz spoljašnje sredine, celi flaskovi obmotani fotootporno-aluminijumskom folijom i flaskovi vraćeni u inkubator na 20 h. Nakon inkubacije flaskovi su postavljeni na orbitalnoj mešalici (Periodic Shaker, Thermo Fisher, Waltham, SAD) na 400 rpm 2 h na sobnoj temperaturi.

Nakon tretiranja ćelije su isprane 5 puta PBS-om kako bi se uklonili tragovi FBS prisutnog u medijumu, a zatim odlepljivane iz flaskova inkubiranjem u 1 ml rastvora 0,25% tripsina i 0,02% EDTA u PBS 2 min na 37 ºC. U flaskove je potom dodavano po 4 ml zagrejanog DMEM+ medijuma kako bi se inaktivirao tripsin, a dobijena suspenzija ćelija prebacivana u epruvete od 15 ml i centrifugirana 5 min na 500 g. Nakon centrifugiranja i odlivanja supernatanta ćelije su resuspendovane u 2 ml zagrejanog DMEM+ medijuma. Po 0,5 ml suspenzije ćelija je prebačeno u flaskove za gajenje u koje je prethodno sipano po 4,5 ml zagrejanog DMEM+ medijuma. Ćelije su održavane u novim flaskovima svaki dan. Nakon dostizanja potpune konfluentnosti ćelije su podvrgnute istom postupku i rasejavane za eksperimente u odgovarajućoj gustini. Uzorak suspenzije ćelija je bojen pomoću tripan plavog, a broj živih ćelija (onih koje nisu propustile boju u citoplazmu) je određivan pomoću komorice za brojanje ćelija. Prosečno je dobijeno 1,5 miliona živih ćelija po flasku. 2 ćelija

Imunohistohemija

Priprema tkiva

Po 4 NTg, preALS i ALS životinje su injekcijom mešavine ketamina (0,1 ml / 100 ksilazina (0,06 ml / 100 g t.m.; Bioveta a.s., Ivanovice na Hané, Češka). Pre izolacije moždanog tkiva, životinjama je podrazumeva eliminaciju krvi iz tkiva radi kao i brzu fiksaciju uklanja proces autolize i razvoja bakterija i gljivica što se postiže perfuzijom anestezije, što je potvrđeno odsustvom kornealnog ekstremiteta, životinje su transkardijalno perfundovane srcu. Perfuzija je rađena sa 0,01 M sonim rastvorom 8,61 g/l NaCl u dvadeset puta razblaženom (2.72 g/l NaH_2PO_4 i 22.72 g/l Na_2HPO_4 rastvoreni u ddH_2O) i sa 4% rastvorom paraformaldehida (PFA) u dva puta razblaženom sistem za perfuziju je uvedena u levu komoru kako bi se omogućilo isticanje krvi. Kompletna krv i perfuzionog cirkulatornog sistema pacova je istisnuta sa dodatnih 200 ml 4% PFA.

Nakon perfuzije, životinja je dekapitovana zatim dodatno fiksirano u 4% PFA 48 h na 4 °C. Nakon fiksacije, dehidratacija tkiva u 30% rastvoru saharoze rastvoru 0,2 M PB pH 7,4 kako bi se spreči zamrzavanja mozga. Nakon potapanja u rastvoru saharoze, mozga na tkivo je zamrznuto na -80 °C do dalje upotrebe. Mozak je preseke debljine 30 μm upotrebom kriostata Nemačka) na -25 °C. Parafinski preseci su superfrostn Plus (Menzel, Nemačka) i čuvani na mikroskopske -20 °C.

Imunofluorescentno obeleģavanje moģdanih pr

Za detekciju i lokalizaciju antigena u
indirektne imunofluorescence ģto podrazume
specifiļno za ispitivani antigen (primarno
imunoglobulinsko antitelo obeleģeno fluorescentn
Kompleks antigen-primarno antitelo-sekundarno antitelo-fluorescentna boja fluorescira
i moģe se posmatrati pod mikroskopom nakon
odgovaranjeu Ídeu ģtianlea.s

Imunofluorescentno obeleģavanje je uraĽ
razliļita regiona mozga sa sledeÍim koordi
posteriornoj osi: -11.10 mm (moģe -4.45 mm (sipokampus) Koordinate
su preuzete iz atlasa koronalnih preseka mozga pacova (Paxinos i Watson, 2006). Pre
obeleģavanja ploļice sa moģdanim presecima
minuta na sobnoj temperaturi. Tkivo je prvo rehidratisano 3 puta po 10 minuta u 0,01 M
PBS. Zatim je uraĽeno blokiranje preseka zara
primarnih i sekundarnih antitela antitela z
5% magareÍi serum, 1% eng. bovine serum albumin ï BSA) eÍeg se
i 0,2% Triton X-100 45 minuta na sobnoj temperaturi
rastvor 0,01 M PBS koji je sadrģao jedno i
magareÍi serum-100. 0,02% Triton X
Koriģ Ína su sledeÍa primarna antitela:
- zeļje pmo antïtelo ha Cu, Zn superoksid dismutazu (SOD1, 1:100, Santa Cruz
Biotechnology, SAD)
- miģje monoklonalnokiselia fnitbirtiellaornnia pgrloitjeailnnizа
astrocita (eng. Glial fibrilary acidic protein ï GFAP, 1:200, EMD Millipore, SAD)
- kozje poliklonalno antitelo na jonizovani adaptorski molekul 1 koji vezuje kalcijum za
obeleģavanje eng. Ionized calcium binding adaptor molecule 1 - Iba1, 1:250,
Abcam, SAD)
- miģje monoklonalno antitelo protiv jedarnog antigena neuralnih ćelija
Neuronal nuclear antigen ï NeuN, 1:100, EMD Millipore, SAD)

Preseci su inkubirani u rastvoru primarn
atmosferi kako bi se spreįilo isparavanje
raĽeno ispiranje preseka 3 puta po 10 min
primarna antitela koja se nisu vezala, a potom su preseci inkubirani u rastvoru 0,01 M
PBS koji je sadrģao odgovarajuĺa fluorescen
sobnoj temperaturi u vlaģnoj atmosferi i mr
fluorescentnih markera.
Korigĺena su sledeĺa sekundarna antitela:
- magareĺe protiv zeca, Alexa Fluor 555 (1:200; Invitrogen, SAD)
- magareĺe protiv miša, Alexa Fluor 488 (1:200; Invitrogen, SAD)
- magareĺe protiv kokoke, Alexa Fluor 488 (1:200; Invitrogen, SAD)

Preseci su potom isprani 5 puta po 5 minuta u 0,01 M PBS kako bi se uklonila sekundarna antitela koja se nisu vezala, i inkubirani 10 minuta u rastvoru 4,6 ï diamidin-2-fenilindola (DAPI, 1:4000, Molecular Probes, SAD) u PBS zarad fluorescentnog obeleģavanja jedarnog ispirani 5 puta po 5 minuta u 0,01 preseci s M PBS, ostavljeni 10 minuta radi uklanjanja nanoģenje, med fiksiranje pokrovnog stakla (Mowiol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, N stavljeno pokrovno staklo. Za negativnu kontrolu bojenja primarna antitela su izostavljena. U svakoj seriji i uzorcima histohe eksperimentalnih grupa.

Konfokalna mikroskopija

Snimci fluorescentno obeleģenih preseka laserskog skeniraj u (Carl Zeiss GmbH, Hoshi upotreb M 710 objektiva Plan-Neofluar 20/0,5 i Plan-Neofluar 40/1,3 Oil DIC. Za eksicitaciju fluorescentnih boja korigĺene su ekscitacio helijum-neonskog lasera. Emisiona svetlost je r NFT 545 dihroj koji reflektuje svetlo dsatl atalasne duģine m jednu detekcionu jedinicu, a u Potpuno propu razdvajanje emisione svetlosti zelenog dela spektra je postignuto uskopojasnim filterom

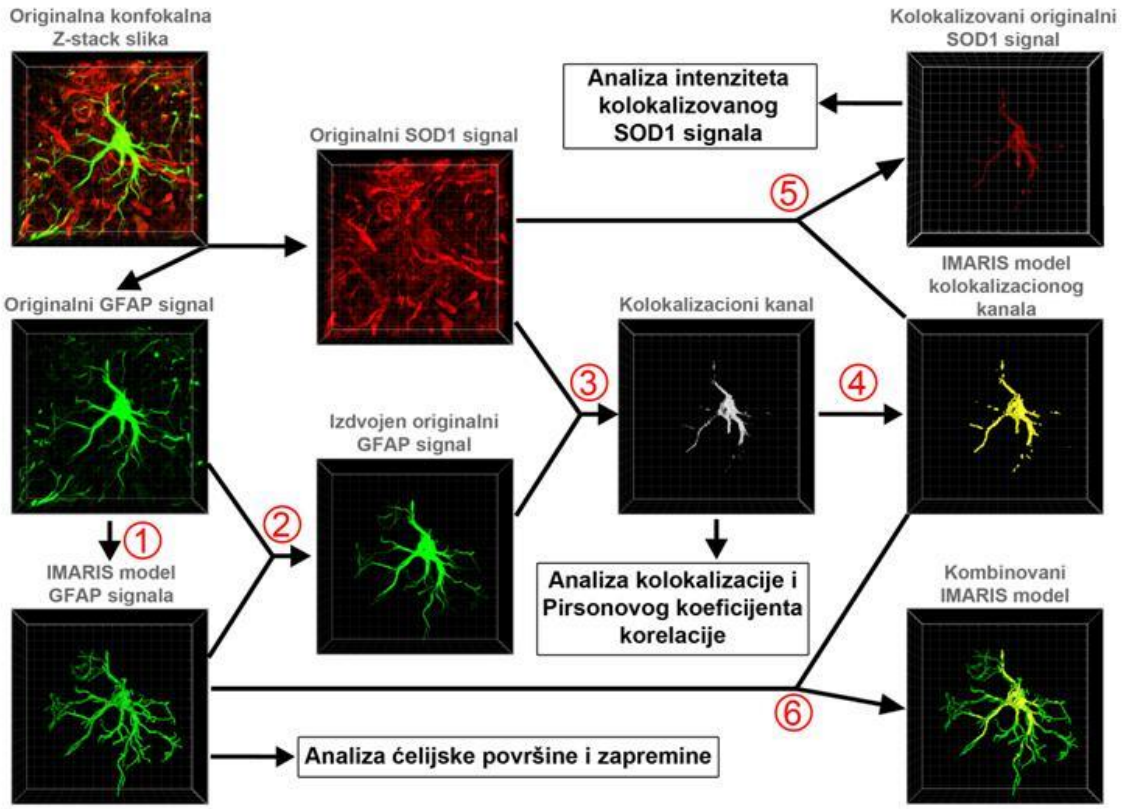
BP 505-530, a crvenog propusnog filtera LP 585. Za dobijanje 3D konfokalnih snimaka korišćen je metod kojim se uzorak skenira u Z-osi (Nikvist određivanje optimalnih karakteristika konfokalnih mikroskopskih slika). Slike su snimane sa Plan-Apochromat 20x/0,8 M27 objektivom, veličine 512×512 piksela. Podešavanja intenziteta signala laserskih zraka tako da su intenzitet optičkog preseka, brzina skeniranja i veličina piksela ostali isti tokom snimanja.

Analiza konfokalnih snimaka

Konfokalni snimci su analizirani u Zeiss LSM710 ZEN softverskom paketu. Kako bi se ispitalo prisustvo proliferacije i ispitala distribucija SOD1 proteina u mreži astrocita, urađena je analiza procenta GFAP pozitivnih vrednosti i Iba1 pozitivnih intenziteta signala SOD1 pozitivnih piksela na konfokalnim slikama koje su snimljene pomoću objektiva Neofluar 20x/0,5. Pozadinski signal je uklonjen sa svake slike na osnovu srednje vrednosti intenziteta piksela u neobojenim delovima slike. Na ovaj način je analizirano 4 do 5 snimaka iz svake grupe, 3 snimka po grupi.

3D snimci pojedinačnih astrocita ili mikroglijalnih preseka dvostruko obeleženih SOD1 proteinom i GFAP ili Iba1 analizirani su u IMARIS softverskom paketu verzija 7.4.2 (Bitplane) prethodno opisanom protokolu (Wagner et al., 2013). Prvo su na osnovu intenziteta piksela GFAP ili Iba1 signala u originalnim Z-stack konfokalnim snimcima napravljeni 3D površinski modeli pojedinačnih astrocita ili mikroglijalnih rekonstrukcijom površi (Slika 8, 1) u IMARIS softveru sa konfokalnih snimaka (Z-stack snimci pored signala koji potiče od ćelije od interesa sadrže i signale delova okolnih ćelija, urađeno je preklapanje originalnog GFAP ili Iba1 Z-stack konfokalnog snimka kako bi se izdvojio samo signal koji potiče od ćelije od interesa (Slika 8, 2). Potom je urađena analiza signala koji potiču od ćelije od interesa i

modulu IMARIS programa (Slika 8, 3). Pre analize kolokalizacije za automatsko uklanjanje nespecifičnog pozadinskog signala (Costes et al., 2004) koji je integrisan u IMARIS program.



Slika 8. Šematski prikaz toka analize 3D konfo

Kao rezultat analize kolokalizacije signala dobijen je kolokalizacion kanala koji se sastoji samo iz piksela koji su sadrža (kolikalizovani pikseli), i u modulu za re napravljen 3D model kolokalizacionog kanala (Slika 8, 4). Preklapanjem modela kolokalizacionog kanala i originalnog SOD1 signala izdvojeni su pikseli originalnog kolokalizovanog SOD1 signala (Slika 8, 5). Na kraju, 3D modeli p ili mikroglijalnih ćelija sa originalnih kanala dobijen analizom odgovarajućih ćelija kako bi se do ćelija sa slike (6). Ukupna površina 3D modela izračunata je mikroglijalnih ćelija su praćene kako bi s GFAP ili Iba1 pozitivnih piksela koji kolokalizuju sa SOD1 pozitivnih pikselima, Pirsonov koeficijent korelacije (jačina korelacija dva signala) između GFAP ili I

SOD1 signala, kao i proseļan intenzitet
analizirani kako bi se ispitala unutarĺel
glijalnim Ćelijama. Na ovaj način je
iz svake ģivotinje, ģto je ukupno iznosilo
glijalnih Ćelija.

Odreĺivanje ļistoĺe primarne kulture astr
astrocitima in vitro primenom imunocitohemijske metode

Da bi se odredio udeo astrocita u kultur
pacova na gore opisan naļin, kao i da bi
astrocitima iz ove dve grupe
preļnika 25 mm pre
povrģine. Nakon dostizanja
imunocitohemijskom bojenju. Ćelije su prvo
medijumima za gajenje, a potom fiksirane 20 minuta u 4% rastvoru PFA. Posle novog
ispiranja Ćelija u PBS tri puta po 5 minuta
nespecifiļnog vezivanja antitela u rastvoru
BSA i 0,05% Triton X-100. Potom je raĺena inkubacija
sadrģao kombinaciju odgovarajućih primarni
Triton X-100.

Korišćena su sledeća primarna antitela:
- miģje monoklonalno antitelo na glijalni fibrilarni kiseli protein (eng. Glial fibrilary acidic protein – GFAP, 1:200, EMD Millipore, SAD)
- kozje poliklonalno antitelo na jonizovani adaptorski molekul 1 koji vezuje kalcijum za obeleģavanje mikroglije (eng. Ionized calcium binding adaptor molecule 1 - Iba1, 1:250, Abcam, SAD)
- zeļje poliklonalno antitelo na Cu, Zn superoksid dismutazu (SOD1, 1:200, Santa Cruz Biotechnology, SAD)

Ćelije su inkubirane u rastvoru primarni
dana joe irsapĆiernanje Ćelija 3 puta po 10 min
primarna antitela koja se nisu vezala, a p
je sadrđao odgovarajuĆa fluorescentno obel
temperaturi u mraku kako bi se spełilo izbeljivanje

Korišćena su sledeća sekundarna antitela:
- magareće protein miša, Alexa Fluor 488 (1:200;
- magareće protein miša, Alexa Fluor SAD)555 (1:200;
- magareće protein kože, Alexa Fluor 488 (1:200; Invitrogen, SAD)
- magareće protein zeca, Alexa Fluor 555 (1:200; Invitrogen, SAD)

Ćelije su potom ispirane 5 puta po 5 mi
antitela koja se nisu vezala, i inkubirane 10 min u rastvoru 4,6 ï diamidin-2-fenilindola
(DAPI, 1:4000, Molecular Probes, SAD) u PBS u
jedarnog mate5 ispiranja po 5 min u PBS, mikroskopski preparati sa
obojenim Ćelija na standardna mikroskopska stakla preko kapljice
medijuma za fiksiranje (Mowiol, Sigma-Aldrich Chemie). U svakoj Gmbh, Nemal
seriji imunocitohemijskog bojenja korišćen
Obojene ćelije su čuvane na +4ÁC do snimanja na
mikroskopu.

Snimci imunocitohemijski obojenih Ćelija
laserskog skeniraju(Carl Zeiss GmbH, Nemačka) upotrebom LSM 510
objektiva Plan-Neofluar 20/0,5. Za eksicitaciju fl
ekscitacione linije 488 nm argonskog lasera i 543 nm helijum-neonskog lasera.
Emisiona svetlost je razdvajana u različit
ogledala koje reflektuje svetlost talasne dužine manje od 5
jedinicu, a u drugu propuštaPotpuno razdvajanje svetlost već
emisione svetlosti zelenog dela spektra je postignuto uskopojasnim filterom BP 505-
530, a crvenog dugopropusnim filterom LP 585. Signal DAPI boje je r

sniman propuġtanjem svetlosti ġivine lampe
dobijene sa istog vidnog polja su potom preklapane.

Ispitivanje proizvodnje superoksidnog radikala astrocita u kulturi pomoĺu MitoSox Red indikatora

Da bi se ispitala proizvodnja superoksidnog radikala u kulturi astrocita izolovanih iz NTg i ALS ġivotinja korigĺen (Molecular Probes, Termo Fisher Scientific, Woltham, SAD) koji reaguje specifiļno sa superoksidnim radikalom, ali ne i sa ostali Ovaj indikator lako ulazi u ġive Ćelije gd Nakon oksidacije pod uticajem superoksidnog radikala indikator emituje fluorescentnu svetlost u crvenom delu spektra, pa je zb fluorescentne mikroskopije. Maksimum absorbcije indikatora je na 510 nm, a emisije na 580 nm. Za ove eksperimente astrociti su zasejevani na mikroskopska stakla preļnika 25 mm u gustini od 10^4 ćelija/cm^2 površine ġetve. Zasejane ćelije su mediju do dostizanja 70% konfluentnosti vanćelijskim rastvorom (ECS) koji se sasto $CaCl_2$, 2 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES i 10 mM glukoze rastvorene u ddH_2O, a zatim inkubirane u 5 µM rastvoru MitoSox indikatora u ECS 10 minuta na 37°C u inkubatoru. Nakon dodatna 3 ispiranja u ECS radi otkla stakla sa astrocitima su prebacivana u mikroskopsku komoricu za snimanje napunjenu sa 1 ml ECS.

Snimanje je raĽeno na konfokalnom LSM 510 (Carl Zeiss GmbH, Nemačka) uz upotrebu objektiva Achroplan 40x/0,8 W. Za eksicitaciju fluorescentnog indikatora korigĺena je ekscitacio lasera. Emisiona svetlost je razdvajana u dihroiļnog ogledala koje je u detekcioni ka veće od 585 nm filtrirana širokopropusnim filterom L vremenska serija snimanja obeleġenih astr MitoSox indikatora vrġeno na svakih 60s. P

uspostavljanje bazne al osnovne stope proizvodnje odr superoksidnog radikala u ispitivanim Ćeli proizvodnja superoksidnog radikala je izazivana dodavanjem rastvora vodonik-peroksida u ECS, tako da njegova finalna koncentracija u komorici za snimanje bude 250 odnosno 500 µM. Nakon dodavanja vodonik-peroksida snimanje je v 36 minuta. Dobijene vremenske serije merenja programu verzija 3.2 SP2. Za svaku vremensku taÄ‡ku srednja vrednost intenziteta MitoSox signala po celom kadru nakon uklanjanja pozadinskog signala na osnovu srednje vrednosti intenziteta piksela u neobojenim delovima slike. Dobijene srednje vrednosti intenziteta su potom normalizovane u odnosu na srednju vrednost intenziteta bazne linije na $(F-F_0)/F_0$ gde je F srednja vrednost intenziteta signala u datoj vremenskoj taÄ‡ki, a F_0 srednja vrednost intenziteta bazne linije. Na ovaj naÄ‡in su rezultati predsta radikala nakon stimulacije vodonik-peroksidom u odnosu na njego u ispitivanim Ćelijama.

Ispitivanje unutarĆelijske strukture astr Rentgenskim zracima energije njem

Da bi se ispitala unutarĆelijska struktu ALS Å¾ivotinja, astrociti su zasejavani na perforiranom ugljenikovom folijom debljine 10 nm (Au-G200F1, Quantifoil, Jena, Nemaka) gustine od 10^4 Ćelija/cm^2 pao/vcrmi. Posle 2 dana ga mediju, mreÅ¾ice sa astrocitima vitrifikaciji, stju ispira trenutnom zamrzavanju uteÄ‡nom ethanom hlaÄ‘enim (Sa tnim azoto Ducic, 2014) korigÄ‡enjem GP Automatic Plunge Freez Microsystems, Wetzlar, Nemaka). Kako bi s pregledani pomoÄ‡u svetlosnog mikroskopa Ze opremljenog sa LINKAM CMS196 komoricom (Linkam Scientific, Waterfield, Engleska) za snimanje uzoraka na temperatur ubaÄ‡eni u nosaÄ‡e sa teÄ‡nim azotom i Ä‡uvani Mikroskopija pomoÄ‡u energije 120 keV (Tecnai G2 Spirit Twin, FEI, Holandija)

filterdaonsmisionog mikroskopa sa rentgenskim
ALBA sinhrotrona (ALBA synchrotron light s
Snimci dimenzija 10 x 10 εm razlji ni uz tih reg
rotaciju uzorka od + 70° do ï 70°, sa uglom pomeraja od 1° i zme Ľu snimaka
vremenom snimanja od 1s po snimku. Obrada
programu verzija 4.9 (University of Colorado, Boulder, SAD).

Rentgenska fluorescentna mikroskopija (eng. X-ray fluorescence imaging ï XRF)

Priprema tkiva

Po 3 NTg i ALS ģivotinje su anestezir
meģavine ketamina (0,1 (0,06 ml // 100 1g t.m.). Svakat.m.) i
ģivotinja je ig jr o t m , o v i a n g a l d v e k a j p i t a d t m a h stavlje
bi se spre ļ ilo propadanje tkiva. Mo ģ dano t k
zamrznuto na -80 ºC do dalje upotrebe. Mozak je zati
debljine 20 εm a t u p o t (C M b 8 5 0 , k r L e i s c a Mi c r o s y s t e
na temperaturi od -2 5 ę C, i p r e s e c i - n i t r i d n e m e m b r a n e g l i m e n z i j a n a s i l
7.5 x 7.5 x 0.2 mm (Silson Ltd., Northampton, Velika Britanije). Preseci na
membranama su pli o fi l i z a t o m u n a s l a b o j e v a k u u m u u i n i c i j a l n o n a
temperaturi t e ļ n o g -196 ºC), a potom (ļ u v a n i n a s o b z i r o s l i k a t e m p e r a
gela k o j i s l u ģ i z a a p s o r p c i j u v l a g e .

Pravljenje XRF snimaka

Pre XRF preseci su analizirani na obiļn
proverila oļuvanost tkiva i odredili regio
pomoĺu imunohistohemije. XRF je uraĽen na
Ģvajcarskom svetlosti (eng. Swiss Light Source, Paul Scherrer Institut, Villigen,
Ģvajcarska), na energiji ekscit Yaravnii sae od 9.
mikro-fokusiranim Rentgenskim zracima dimenzija 2 Ĭ 2 εm. Sn
napravljene XRF mape koje prikazuju koncentraciju elemenata (P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe,

Ni, Cu i Zn) u tkivu veliļine 200Ĭ200 ε m, zadrģavanja po pikselu od 200 ms. Na ovaj svaki element u oba analizirana region a mozga (facijalno jedro dentatni girus hipokampusa) iz svake ģivoti po regionu mozga po grupi za svaki element.

Analiza XRF mapa

Rekonstrukcija i analiza XRF mapa je ur verzija 7.12 (MathWorks, Natick, SAD). Za srednja vrednost intenziteta piksela sa XR prosek srednjih vrednosti intenziteta piks regiona mozga NTg ģivotinja. Na kraju, sre mapu je normalizovan u odnosu na prosek srednjih vrednosti intenziteta piksela NTg ģivotinja za odgovarajuĺi elemenatkao i regio promena u koliļini elemenata u odnosu na pr Normalizovane srednje vrednosti intenziteta

Biohemijsko ispitivanje parametara oksidativnog stresa

Priprema homogenata tkiva

Po 6 NTg, preALS i ALS ģivotinja je ģrtv ubaļene u posudu sa teļnim azotom u cilju potom izvaĽene iz teļnog azota i stavljen izolacija kompletnog tkiva moģdanog stabla i ob ģivotinje. Izolovana tkiva su potom homogen 0,25 M saharozu, 0,1 mM EDTA i 50 mM K-Na fosfatni pufer, pH 7.2. Homogenati su centrifugirani dva puta po 15 minuta na 1850 x g na 4^{o}C. Dobijeni supernatant je pokupljen, sonifikovan 3 puta po 30 sekund ^{o}C do dalje upotrebe.

Određivanje koncentracije nitrita

Koncentracija nitrita, stabilnog finalnog proizvoda oksidacije azotnim oksidom (NO), je određivana (Navarro-Gonzalvez et al., 1998) i Griess-ova reakcija korišćena kao indirektni indikator proizvodnje NO u tkivu. Ukratko, koncentracija nitrita je određivanja merenjem 50 µl reagensa u kojoj su se nalazili sastojali sa 50 µl 1,5% sulfanilamida u 1 M HCl i 0,15% N-(1-naftil) etilen-diamin-dihidrohlorida u destilovanoj vodi. Absorbanca dobijene smeše je merena posle 10 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi, i na osnovu standardne krive napravljene na bazi ovog reagensa i različitih koncentracija nitrita (Nemalčka).

Određivanje proizvodnje superoksidnog radikala

Proizvodnja superoksidnog anjon radikala (O_2^{*-}) je određena metodom zasnovanom na razgradnji nitro plavo tetrazolijuma (NBT) u monoformazan usled reakcije sa O_2^{*-} u baznom reakcionom medijumu (Auclair i Voisin, 1985). Reakcija je započinjana dodavanjem 0,05 ml enzima. Reakciona smeša se sastojala iz 0,1 M NBT u 50 mM natrijum fosfatnom puferu pH 8,6, sa 0,1 mM EDTA i 0,1 mg/ml želatina. Promena absorbance usled prisustva enzima praćena je 15 minuta na 550 nm.

Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze

Aktivnosti obe izoforme antioksidativnog enzima superoksid disumutaze, SOD1 (Cu,Zn SOD – citoplazmatska izoforma) i SOD2 (Mn SOD – mitohondrijalna izoforma) u izolatima tkiva su određivane adrenalinskom metodom (Sun i Zigman, 1978). Ukupna SOD aktivnost je merena na osnovu inhibicije spontane auto-oksidacije epinefrina koja je spektrofotometrijski praćena na 480 nm. Reakcija je praćena u 50 mM karbonatnom pufer pH 10,2, a tkivo je suspendovano nakon dodavanja 10 mM epinefrina. Enzimska

(količina uzorka koja izaziva inhibiciju oksidacije epinefrina za 50%) po mg proteina. Aktivnost SOD2 u uzorcima je određivana na isti način dodavanja 0,1 mM KCN u reakcionu smešu ka Aktivnost SOD1 je potom određivana oduzima aktivnosti.

Određivanje lipidne peroksidacije

Malondialdehid (MDA) je proizvod reakcij tiobarbituratnom kiselinom, i njegova koncentracija se uzima kao indeks lipidne peroksidacije (ILP). ILP je meren spektrof tiobarbituratne kiseline. Količina formiranih reakt određivanja merenjem absorbance na 533 nm reagensa tiobarbituratne kiseline koji se HCl i 0,75% tiobarbituratne kiseline, i zagrevanja na 95°C u prisustvu 50 desferoksamina kako bi se sprečila lipidn prisutnim u uzorku (Rehncrona et al., 1980).

Svi eksperimenti su urađeni u triplik normalizovan u odnosu na ukupnu količinu p određena metodom (Lowry et al., 1951) na osnovu standardne krive napravljene korišćenjem različitih koncentracij seruma (Sigma Aldrich GmbH, Nemačka).

Elektronska paramagnetna rezonancija

Elektronska paramagnetna rezonancija (EPR) je spektroskopska tehnika kojom se detektuje proces rezonantne apsorpcije mikrotalasnog zračenja u ho magentnom polju u paramagnetskim sistemima koji poseduju najmanje jedan nespareni elektron, kao što su slobodni radikali u *in vivo* sistemima alske v SRV su najčešće izrazito kratkoživeće da b EPR spektroskopije. Umesto toga, redoks status odnosno bioreduktivni kapacitet *in vivo*

sistema može da se istraži korišćenjem a
Nitroksidi su stabilni dugo živeći slobod
organizam mogu da reaguju sa unutarćelij
mitohondrijalni enzimi ili citosolni askor
njihovoj redukciji u hidroksilamine koji se ne mogu detektovati EPR spektroskopijom.
Stoga, praćenje stope redukcije nitroksid
spektroskopije može da se primeni kao meto
prisustvo oksidativnog stresa (Valgimigli et al., 2001; Elas et al., 2012). Za *in vitro* i *ex vivo* eksperimente na uzorcima male kolsiećiunoebiićanjiesnkoe kko
EPR spektroskopija u ĂX ò o b l-baansdt, kioja podrazumeva korišćenje talasne
ćija frspadkavu opseg oidj 9 a 10 GHz, ći me se postiže neophod
detekcije. Međutim, *in vivo* EPR spektroskopije na vel
uzorcima, kao što su uzorci biološkog porekla (ćelije, tkiva, cela
mikrotalasne energije usled prisustva velike količine vode u
prodiranja mikrotalasa u uzorak. Problem dubine prodiranja mikotalasa u ovakve uzorke
se može rešiti smanjenjem frekvencije mikrotalasa. *In vivo* je mikr
eksperimente koristi EPR spektroskopije u ĂL ò o b l-baansdt, kioja podrazumeva
korišćenje mikrotalasa čija je frekvencija spa

U EPR eksperimentima su korišćeni sledeći a

- Tempol (4-Hidroksi-2,2,6,6-tetrametilpiperidin 1-oksil),
- 3-karbamoil proksil (3CP (3-Karbamoil-2,2,5,5-tetrametil-1-pirolidinoksi), i
- 3-karboksi proksil (3CxP (3-Karboksi-2,2,5,5-tetrametil-1- pirolidinoksi),

(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka). Hemijske
na slici 9.

Slika 9. Hemijske strukture nitroksida korišćene

In vitro i ex vivo EPR spektroskopija

Za eksperimente redukcije nitroksida *in vitro* 30 μl rastvora nit
askorbinske kiseline u PBS-u, u različitim odnosima konc
teflonska creva (Zeus Industries, SAD) propustljiva za gasove, koja su onda postavljena
u kvarcnu kivetu i potom u ER 4123SHQE X-band rezonator EPR spektrometra (Bruker
Biospin Elexsys II E540 EPR spektrometar,
su snimani 30 minuta na sobnoj temperaturi u intervalima od po 1 minut. Za *ex vivo*
eksperimente 1 ml sveže krvi je uzeto retroorbitalno
antikoagulantom K_2EDTA (Becton Dickinson and Company, USA). U krv je potom
dodavano po 5 μl rastvora odgovarajućeg nitroks
u krvi budu 0,05 mM za Tempol i 3CP, što odnos
odgovaralo koncentraciji nitroksida u krvot
in vivo eksperimetima. Tako dobijene mešavine s
teflonska creva koja su onda postavljena u kivetu i potom u ER 4123SHQE X-band
rezonator EPR spektrometra. EPR spektri su potom snimani 30 minuta na sobnoj
temperaturi u intervalima od *in vitro* i 1 *ex vivo* minut. P
eksperimente su bila: frekvencija mikrotalasa 9,5 GHz, snaga mikrotalasa 10 mW,
modulaciona amplituda 2 G, modulaciona frekvencija 100 kHz, vreme snimanja 60s.

In vivo EPR spektroskopija

Za merenja *in vivo* EPR spektroskopijom korišćeno je
pacova za praćenje kinetike redukcije matičnih spins
ALS pacova za praćenje kinetike redukcije
simptoma i stepena oštećenja kičmene moždine korišćene kao zas imptoma
praćenje kinetike redukcije ove dve spinske
Sprague-Dawley pacova, koji su po starosti odgovarali simptomatskim ALS
životinjama, su korišćeni kao kontrole. Za
Tempol korišćena je doza od 300 mg/kg telesne mase, dok su 3CP
simptomatskim ALS životinjama. Za redukcije
3CP u životinjama kojima je izazvano zaus

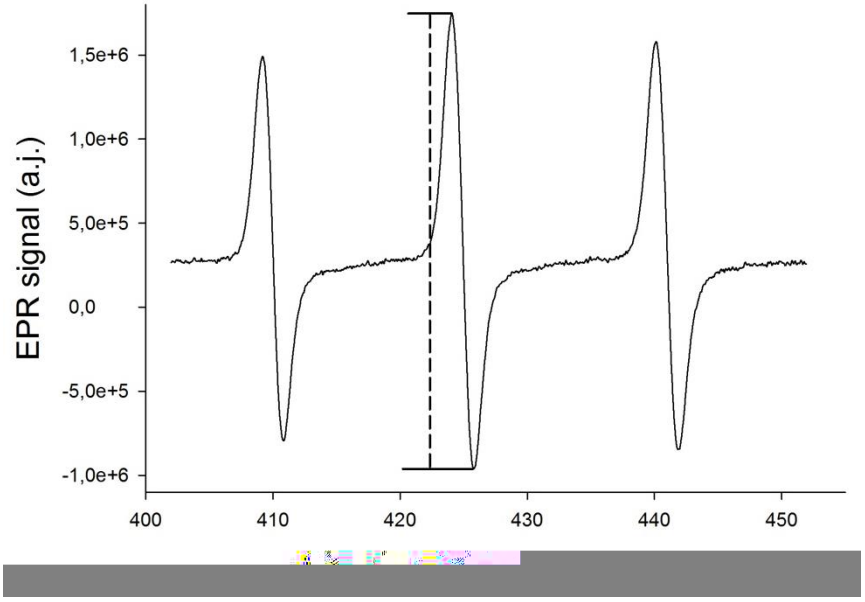
kalijum hlorida, koriġĺene kuspinska proba) koje transgene su po starosti odgovarale simptomatskim ALS ġivotinjama.

Ġivotinje su anestezirane intraperitonealno (4 ml / 100 g t.m.) i ksilazina (0,06 ml / 100 g t.m.), i u repnu venu ġivotinja je uvoĽen kateter od polietilena. Ġivotinja je postavljena na nivou nosaļa za snimanje koji poseduje sistem za termoregulaciju (održavanje telesne temperature ġivotinja održavala na nivou od 36,5 ± 0,5 °C termo-sondom). Ġivotinje su postavljene tako da se glava ġivotinje nalazila u rezonatorskoj šupljini EPR spektrometra (Slika 10). Rastvor 3-karbamoil-2,2,5,5-tetrametilpirolin-1-oksil nitroskida u fiziološkom rastvoru (koncentracije 36 mM, odnosno 1 μmol/g t.m. 3CxP, zapremine 1 ml) ubrizgavan je u repnu venu ġivotinje. Spektri su snimani 60 minuta u intervalima od po 1 minut. Da bi se dovelo do zaustavljanja srļanog rada i, posledično, prestanka cirkulacije, 2 ml rastvora kalijum hlorida (200 mg/ml) je injektovano u repnu venu ġivotinja je 2 minuta nakon injektovanja 3CxP, što je odgovaralo trenutku maksimalne koncentracije 3CxP u krvi. Parametri EPR uređaja za *in vivo* eksperimente su bila: frekvencija mikrotalasa 1,2 GHz, snaga mikrotalasa 11,38 mW, modulaciona amplituda 2 G, modulaciona frekvencija 30 kHz, vreme snimanja 8s, broj akumulacija 2.

Slika 10. Eksperimentalna postavka za EPR spektroskopiju *in vivo*. Slike predstavljaju prikaz EPR uređaja (levo) i polożaj ġivotinje

Kinetika određivanja redukcije spinskih proba

Normalizovana visina između gornjeg i donjeg tripleta EPR spektra nitroksida je definisana kao intenzitet signala koji je proporcionalan koncentraciji spinske probe (Slika 11). Kako bi se izračunala poluredukcije nitroksida *in vivo* (vreme koje je neophodno da intenzitet EPR signala nitroksida padne na 50% od njegove maksimalne redukcije nitroksida je funkcija ukupne antioksidativne moći tkiva), pretpostavili smo da proces pseudo-prvog reda.



Slika 11. Merenje intenziteta EPR signala. Prikaz tipičnog kanala EPR spektra isprekidanom linijom je normalizovana visina između gornjeg i donjeg srednjeg tripleta spektra koja prestavlja intenziteta signala nitroksida. a.j. – arbitrarne jedinice.

Pored toga, kako bi se precizno *in vivo* odredio redukcione kinetike nitroksida, razvili smo matematički model koji uključuje 3 faktora koji doprinose promenama intenziteta EPR signala spinske probe: 1. uklanjanje krvotokom; 2. distribucija probe iz krvotoka u tkivo; 3. redukcija probe u tkivu. Na osnovu ovog modela analiza farmak

$$\dot{O} = \frac{\dot{I}_{in}}{\dot{I}_{in} + \dot{I}_{out} + \dot{I}_{red}} \cdot \dot{I}_{in} \cdot e^{-(\dot{I}_{in} + \dot{I}_{out} + \dot{I}_{red}) \cdot t} + \frac{\dot{I}_{in}}{\dot{I}_{in} + \dot{I}_{out} + \dot{I}_{red}} \cdot \dot{O}_{max} \cdot e^{-\dot{I}_{red} \cdot t}$$

gde je *x* vremenska tačka detekcije EPR signala spinske probe, k_{bc} konstanta brzine uklanjanja probe krvotokom, k_{td} konstanta brzine distribucije probe iz krvotoka u tkivo i k_{tr} konstanta brzine redukcije probe u tkivu. Kinetike redukcije spinskih proba dobijene u *in vitro* i *ex vivo* eksperimentima su podešene monoeksponencijalnom funkcijom pretpostavljajući prvog reda. proces pseu

Oslikavanje magnetnom rezonancijom

Za eksperimente oslikavanja magnetnom rezonancijom (MRI) is3korišćen preALS i 3 ALS pacova, dok su kao kontrole upotrebljena 3 NTg pacova koji su po starosti odgovarali ALS životinjama. Životinje su anestezirane injekcijom mešavine ketamina (0,06 ml/100 g t.m.), ma u repnu venu životinja je uvođena braunila kontrastnog agensa. Duboka anestezija je potvrđivana odsustvom korealnog refleksa i refleksa povlačenja nakon nadražaja. Životinje su postavljane u položaj od stiropora tako da leže na stomaku, i sta kliničkom 1,5 T Avanto MRI ure T1-n aglašeni snimci glave životinja su napravljeni pomo vremenom ponavljanja od 400 ms, eho vremenom od 23 ms, debljinom preseka od 1,5 mm, i dimenzijama voksela 1,5 x 0,2 x 0,3 mm. Nakon prve serije snimanja, životinjama je preko braunile ubrizgavan rastvor gadolinijumskog kontrastnog agensa Dotarema (Guerbet u, Vilpent, Francuska) u mmol/kg t.m., i nakon 2 minuta su napravljeni post-kontrastni T1-naglašeni snim glave životinje su u istim podešavanjima kao za prv snimanja životinje su zagrevane i posmatra anestezije. Obrada MRI snimaka je urađena (Siemens, Minhen, Nemačka). Oduzimanjem T1-naglašenih slika pre kontrastnog agensa od post-kontrastnih slika dobijene su diferencijalne slike na kojima mesta hiperintenziteta MRI signala predstavljaju mesta ulaska kontrasta u tkivo mozga, što ukazuje na poremećaj permeabilnosti krvnog

S t a t i s t i ļ k a a n a l i z a

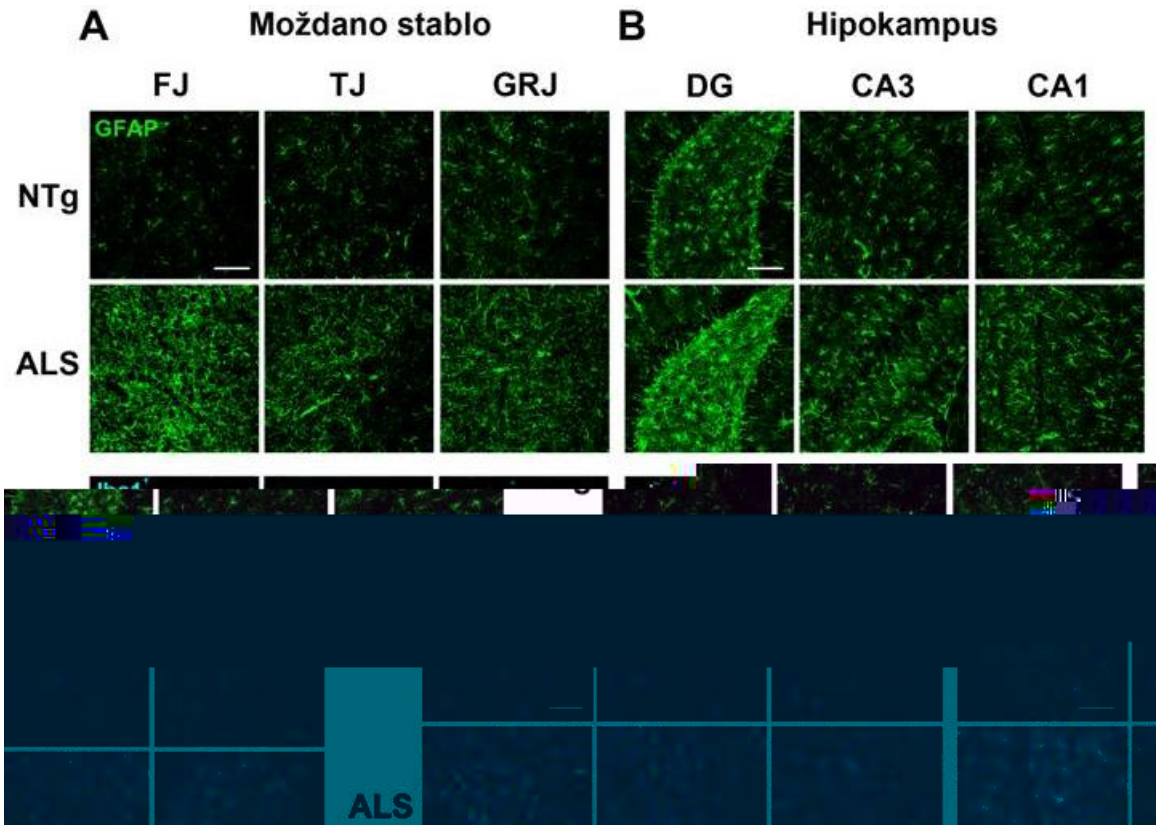
S t a t i s t i ļ k e a n a l i z e s u r a Ľ e n e u p r o g r a m
A n a l y t i c s , N Y , S A D) . S t a t i s t i ļ k a z n a ļ a j n o s t
jednofaktorskom analizom varijanse sa Bonferroni *post hoc* t e s t o m . U s l u ļ a j e v i
podaci nis u p r o l a z i l i n o r m a l n u r a s p o d e l u k o r i ġ Í e
analize varijanse sa Dunn-Bonfferoni *post-hoc* t e s t o m . Z a p r o v e r a v a n j
z n a ļ a j n o s t i r a z l i k a i z m e Ľ u d v e g r u p e k o r i
v r e d n o s = 0 i m a Ŭ p < 0 . 0 5 s u s m a t r a n e k a o s t a
r e z u l t a t a j e u r a Ğ e n u p r o g r a m S i g m a P l o t v e r z i j a 1 1 (S y s t a t S o f t w a r e , B a n g a l o r e ,
Indija).

Rezultati

I s p i t i v a n j e h i s t o l o ģ k i h p r e s i m p t o m a t s k i h i s i m p t o m a t s k i h ģ d a n o m hSOD1 G93A pacova

I m u n o h i s t o h e m i j s k a a n a l i z a g l i j a l n i h m a r k e r

Kako bi se ispitalo prisustvo aktivacije i proliferacije astrocita i mikroglijalnih Í e l i j a u r a z l i č i t i m d e l o v i m a m o ģ d a n o g p r e s NTg i ALS ģivotinja su imunohistohemijski odnosno Iba1. Imunohistohemija je pokazala facijalnom, trigeminalnom i gigantocelularnom retikula r n o m j e d r u m o ģ d a n o g

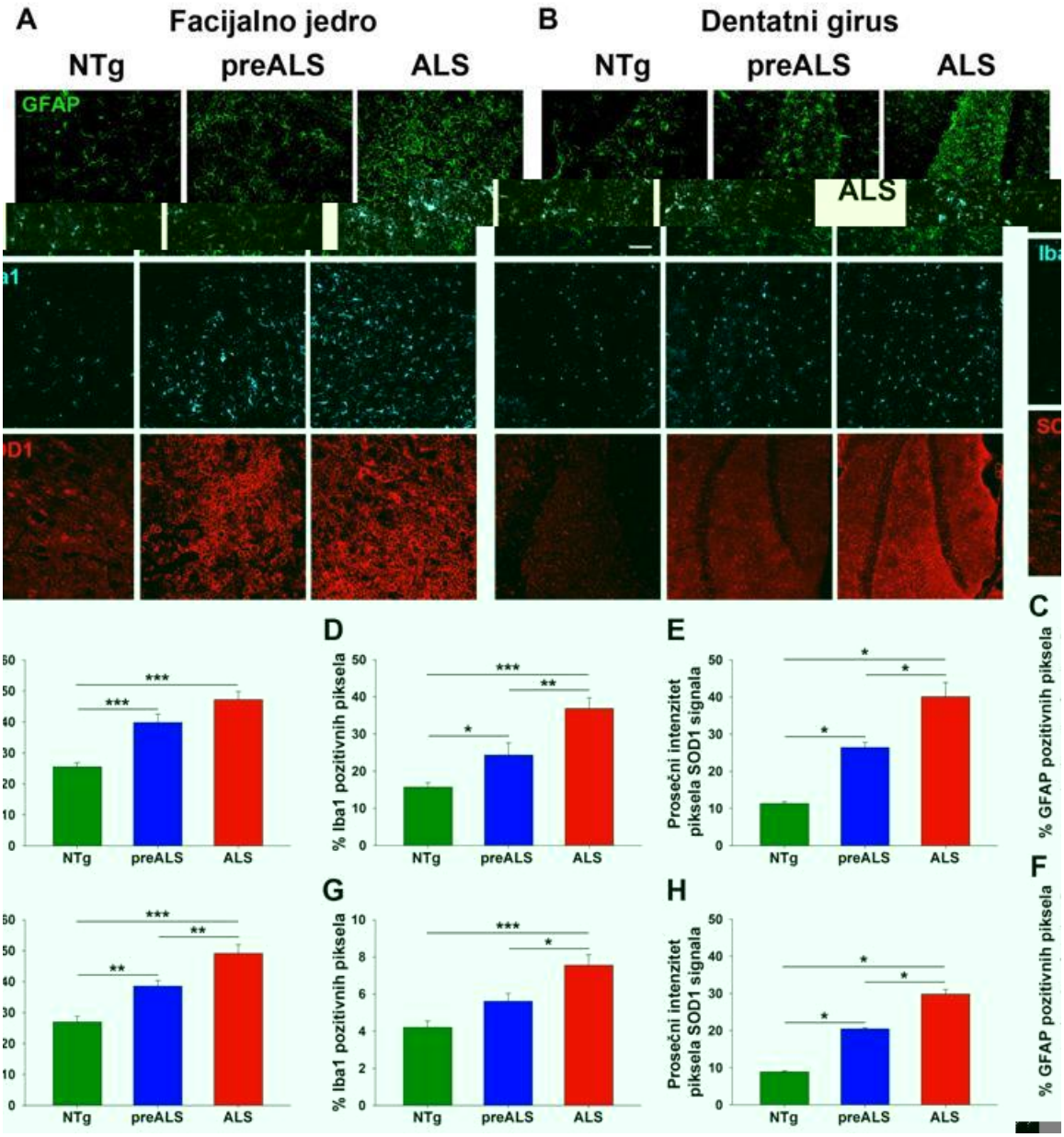


Slika 12. P r o l i f e r a c i j a a s t r o c i t a i m i k r o g l h i p o k a m p u s a u K o n f i s a l n e s l i k e i m u n o f l u o r e s c e n t n o g bojenja na GFAP kao m a r k e r a s t r o c i t a i I b a 1 k a o m a r k e r m i k hipokampusa (B) N T g i A L S ģ i v o t i n j a . F J ï facijalno jedro, TJ ï trigeminalno jedro, GRJ ï gigantocelularno retikularno jedro, DG ï dentatni girus, CA3 ï *Cornus Ammonis* region 3 hipokampusa, CA1 - *Cornus Ammonis* region 1 hipokampusa.

kao i u CA3 i CA1 regionima i dentatnom gi
(Slika 12). Međutim, uočljivo je povećanje u bojenju
facijalnom jedru (lat. *nucleus facialis*) i dentatnom girusu (lat. *gyrus dentatus*), koji su izabrani kao regioni od interesa za dalje eksperimente.

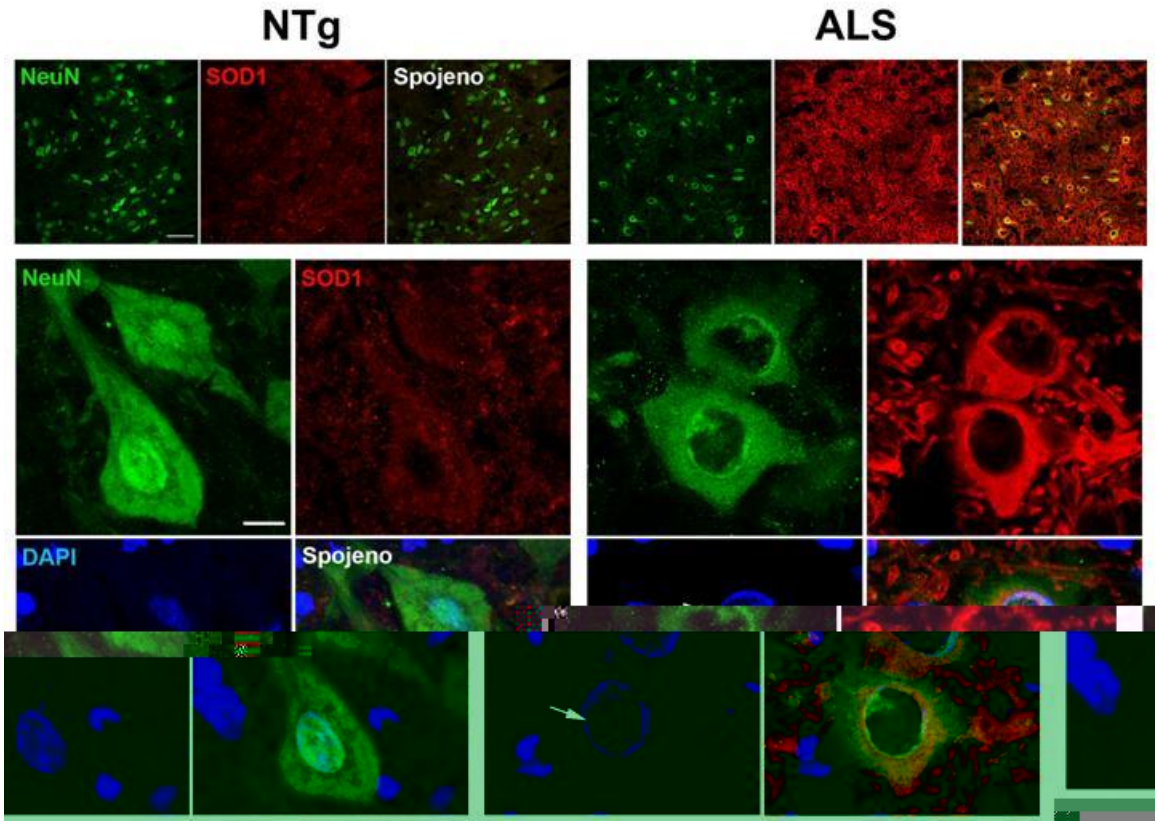
Da bi se istražili i rani znaci aktivaci
jedru i dentatnom girusu, moždani preseci
NTg, presimptomatskih (preALS) i simptomatskih (ALS) životi
imhunohistohemijski obeleženi na GFAP i Ib
distribucija SOD1 proteina u tkivu, moždani preseci su ako
se vezuju za ovaj enzim. Imunohistohemijsko bojenje i analiza procenta GFAP i Iba1
pozitivnih piksela na konfokalnim slikama s
ove markere i u facijalnom jedru (Slika 13A, B,
C, D, F, G), što je ukazalo na aktivaciju glijalni
ovoj ranoj fazi bolesti. Kao što je bilo o
izražena u simptomatskoj fazi bolesti u kičmenoj moždini
i prisustvo neuroinflamacije. Imunohistohem
SOD1 protein u oba regiona mozga u preALS
simptomatskoj fazi analizom srednje vrednosti intenziteta piksela
SOD1 signala na konfokalnim slikama (Slika 13A, B, E, H). Međutim, uočen
razlikovati obrasci akumulacije SOD1 protein
izražena fokalna akumulacija SOD1 proteina
određenim tipovima ćelija (Slika 13A, donji red). Ova
pojava je bila znatno manje izražena u dent
proteina u tkivu pokazivala (Slika 13B, donji red).

Za dalje ispitivanje specifične ćelijske
proteina, preseci moždanog tkiva simptomatskih ALS
su obojeni na SOD1, NeuN kao marker neurona, i DAPI kao marker jedarnog materijala. Analiza obeleženih preseka je
moždanom stablu ALS životinja, što je ukaz
14, gornji red).

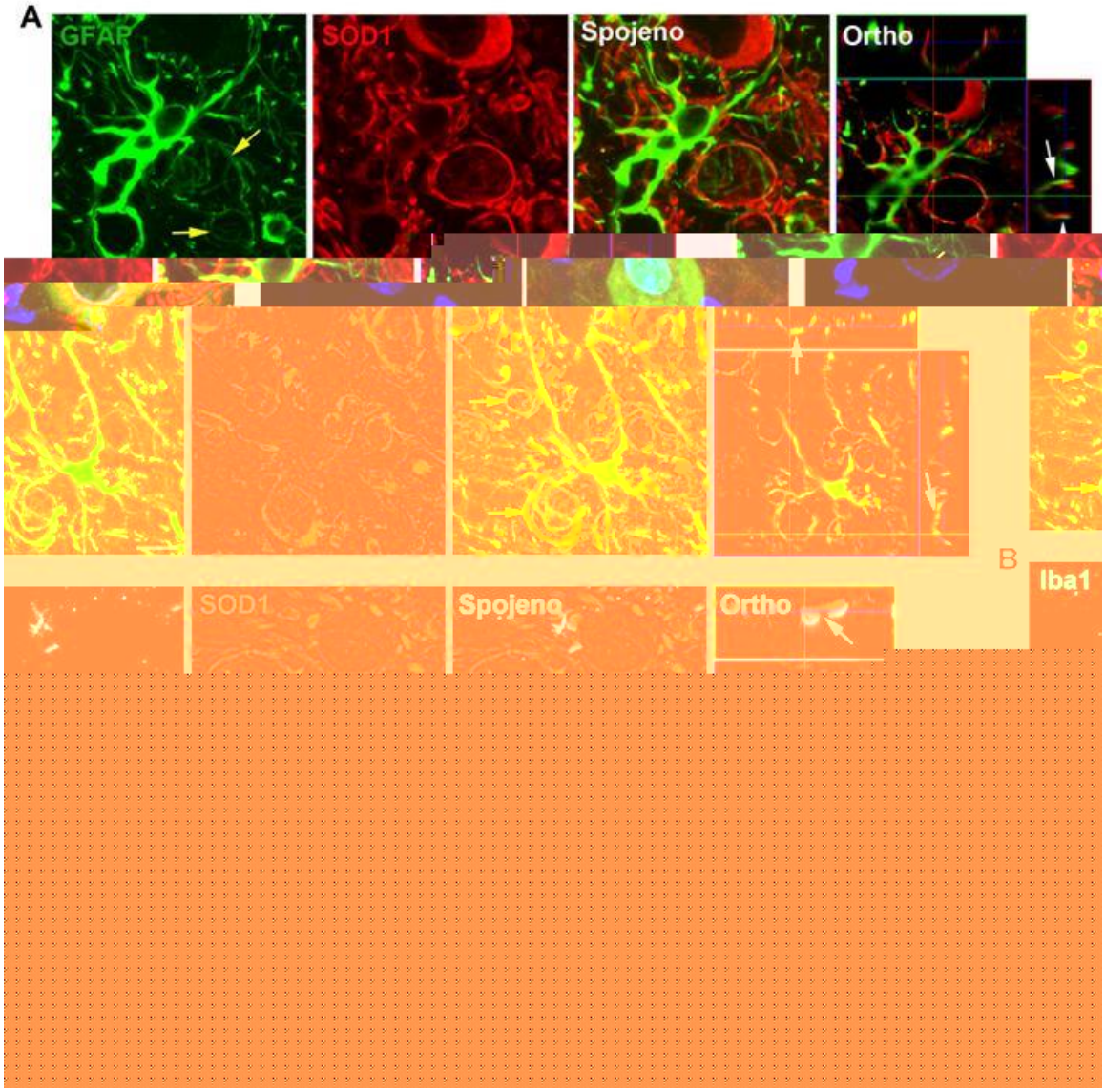


Slika 13. Proliferacija astrocita i mikroglije, i akumulacija SOD1 proteina u tkivu mozga preALS i simptomatskih - ALS pacova. Konfokalne slike imunohistohemijskog bojenja na GFAP kao marker astrocita, Iba1 kao marker mikroglije i SOD1 na presecima facijalnog jedra (A) i dentatnog girusa (B) preALS i simptomatskih (ALS) životinja. Uvećanje 100 µm. Grafici prikaziju kvantifikaciju procenta GFAP pozitivnih (C i F) ili Iba1 pozitivnih (D i G) piksela, odnosno srednju vrednost intenziteta piksela SOD1 signala (E i H) na konfokalnim slikama facijanog jedra (C, D i E) i dentatnog girusa (F, G i H). Podaci su predstavljeni kao n = 16 ili 20 slika po grupi. Jednofaktorska analiza varijanse sa Bonferroni *post-hoc* testom (C, D, F i G), ili Kruskal Wallis analiza varijanse na rankovima sa Dunn-Bonferroni *post-hoc* testom (E i H). * p< 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Snimci napravljeni konfokalnim mikroskopom pokazali su prisustvo citoplazmatske akumulacije SOD1 proteina u citoplazmi neurona kičmenog stuba ALS životinja (slika 14, srednji i donji red, strelice). Međutim, uočene promene nisu bile isključivo intraneuronalne, već su bile prisutne i van neurona u vidu ekstracelularne akumulacije SOD1 proteina (nije prikazano).



Slika 14. Unutarćelijska akumulacija SOD1 proteina u moždanom stablu simptomatskih ALS životinja. Konfokalne slike dvostrukog imunohistohemijskog bojenja na SOD1 protein i NeuN kao marker neurona, kao i na jedarni materijal DAPI bojom u poprečnim presecima facijalnog nukleusa ALS (G93A) životinja. Skala iznosi 100 μm (gornji red slika). Na slikama se mogu uočiti akumulacija SOD1 proteina u citoplazmi, kao i degeneracija jedarnog materijala (bele strelice) u neuronima moždanog



Slika 15. Interakcije između glijalnih molekula kod ALS-a. Konfokalne slike dvostukog imunohistohemijskog bojenja na SOD1 protein i GFAP kao marker astrocita (A) ili Iba1 kao marker mikroglije (B) u poprečnim facijalnog nojgedra kvrnogAdLaSizmeđu 10 i 11 mjeseca starosti. Na slikama specifične strukture ćelijskih nastavaka strelicama), kao i bliske interakcije nakupinama (obeleženoi obojenim projekcije tridimenzionalnih konfokalnih snimaka.

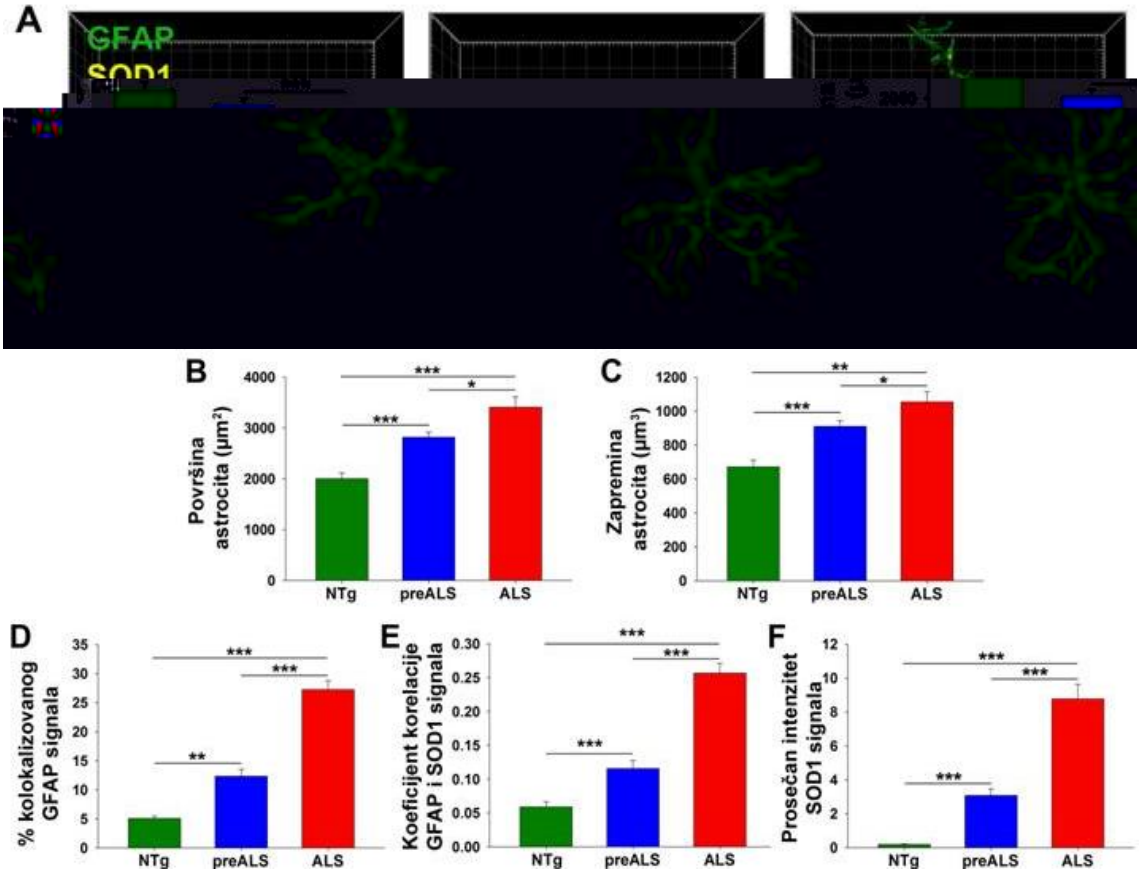
Kako bi se ispitalo da li su astrociti unutarćelijsku akumulaciju SOD1 proteina, životinja su imunohistohemijski obojeni na otkrilo prisustvo hipetrofiranih astrocita u facijalnim korpastim strukturama (Slika 15A, gde su ćelijski nastavci vidljivo zadebljali i

fazi (Slika 17B). Promena u ćelijskoj zapremini nije u
je ovaj parametar bio značajno (Slika 17C). Ćenen k
Za razliku od astrocita, mikroglija u fac
akumulaciju SOD1 proteina. Umesto toga, ko
bila malo, ali, u manjoj meri, ćenana u preALS u poređenj
izrazitim smanjenjem kod simptomatskih - ALS pacova (Slika 17D, E).

Obrazac unutarćelijske distribucije SOD1 proteina je
NTg i preALS životinja, sa ravnomernim ras
nastavcima (Slika 17A, ćut). Sa druge strane, mikroglija iz simptomatskih ALS
životinja je pokazala potpuno izmenjen ob
proteina koji je u ovim ćelijama bio locir
(Slika 17A, ćut). Značajno smanjen intenzitet kolokalizovanog SOD
mikrogliji iz preALS i ALS životinja u odnosu na kontrolne grupe, ali i
životinja (Slika 17F). Takođe, intenzitet kolokalizovanog
manji u mikrogliji iz astrocitima iz istog regiona dentatnog girusa u
mođanog (upoređenja Slike 16F i 17F). Ovi rezultati su ukazali na odsustvo
akumulacije SOD1 proteina u ovom tipu glija

Analiza konfokalnih 3D slika pojedinačnih glijalnih ćeli

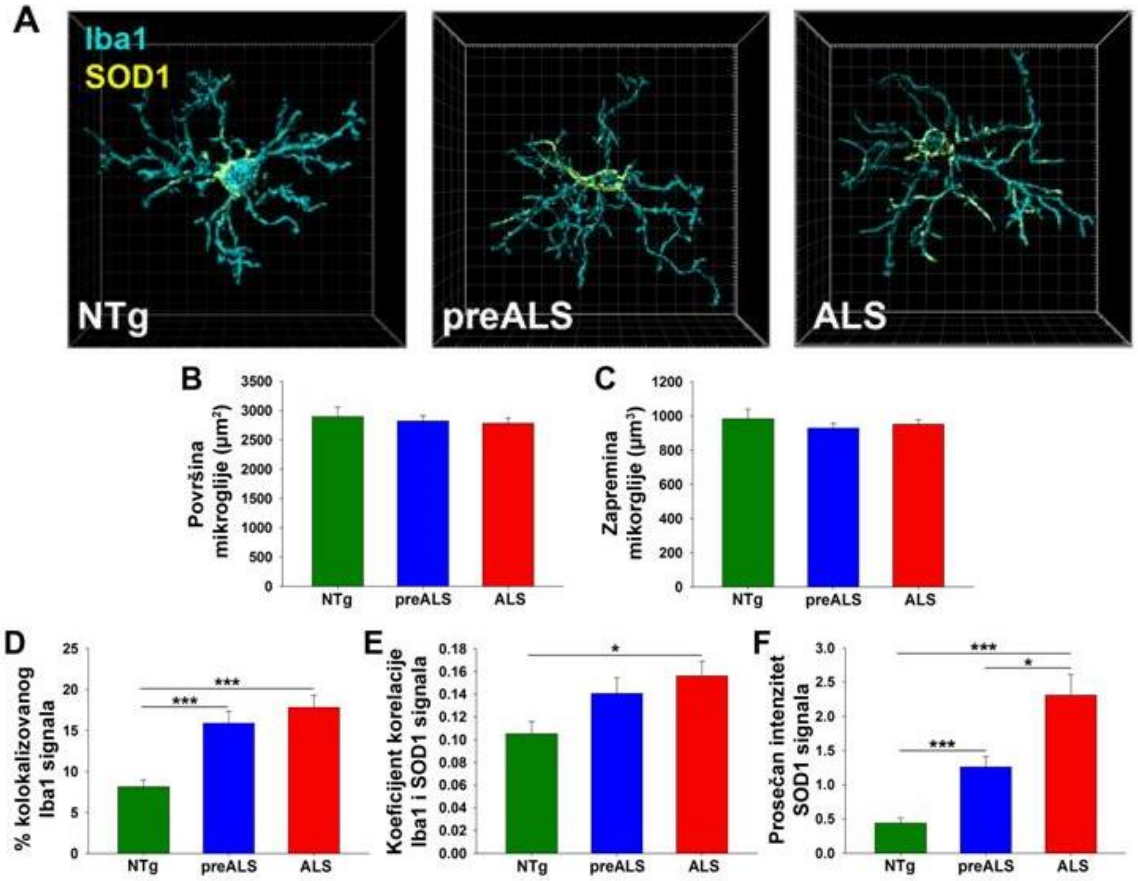
Analiza 3D rekonstrukcija GFAP signala sa konfokalnih snimaka dentatnog
girusa je pokazala skoro identičan obrazac
onaj uočenom u prethodnim (Slike 16 i 18). Naime, u dentatnom girusu
astrociti su pokazali progresivno povećanje
nastavaka u preALS (Slika 18A, zeleni signal), što je potvrđeno
porastom ćelijske površine i zapremine (Slika 18B, C). Ove promene u ov
Slične promene su uočene i za procenat kolo
Pirsonov koeficijent korelacije i intenzit
signala, sa progresivnim povećanjem ovih parametara
pacovima (Slika 18D, E, F).



Slika 18. Aktivacija astrocita i akumulacija unutarĆelijskog SOD1 proteina napravljena trodimenzionalne rekonstrukcije astrocita i snimaka dvostrukog imunohistohemijskog bojenja na SOD1 protein i GFAP kao marker astrocita u poprečnim presecima mozga nontransgenih i simptomatskih ALS gġivotinja (A). Grafici prikazuju (B) površinu pojedinačnih astrocita, prosečnu procenat SOD1 pozitivnim pikselima (D), prosečnu SOD1 i GFAP signala (E), kao i prosečan intenzitet SOD1 piksela. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD po grupi. Kruskal Wallis analiza varijanse na rangovima sa Dunn-Bonferroni *post-hoc* testom. * p< 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Treba istaĆi da je intenzitet unutarĆelijskog SOD1 proteina u poreĽenju sa ovim parametrom (uporediti Slike 16F i 18F), ġto je u saglasnosti sa histolońkim rezultatima bojenje na SOD1 protein u hipokampusu (Slika 13B, E, H). S druge strane, promene u unutarĆelijskoj distribuciji SOD1 proteina (neravnomernom distribucijom u astrocitima, naime umesto uniformnom gġivotinja

distribucijom u preALS životinjama, i fokusirana na proksimalnim nastavcima u simptomatskim ALS životinjama (Slika 18A, a i g1).



Slika 19. Odsustvo aktivacije mikroglije u dentatnom girusu pre ALS i simptomatskih - ALS životinja. Tridimenzionalne rekonstrukcije mikroglije napravljene u IMARIS programu na osnovu konfokalnih snimaka dvostrukog imunohistohemijskog bojenja na SOD1 protein i Iba1 marker mikroglije dentatnog girusa moždanog tkiva NTg, preALS i ALS životinja (A). Grafici prikazuju srednju vrednost površine mikroglijalnih ćelija (B), prosečnu zapreminu mikroglijalnih ćelija (C), prosečni procenat Iba1 pozitivnih piksela (D), prosečnu vrednost Pirsonovog koeficijenta korelacije (E) i prosečni intenzitet signala SOD1 (F). Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± SEM sa 4 životinje po grupi. Jednofaktorska analiza varijanse sa Bonferroni *post-hoc* testom (D i E), ili Kruskal Wallis analiza varijanse na rankovima sa Dunn-Bonferroni *post-hoc* testom (B, C i F). * p< 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

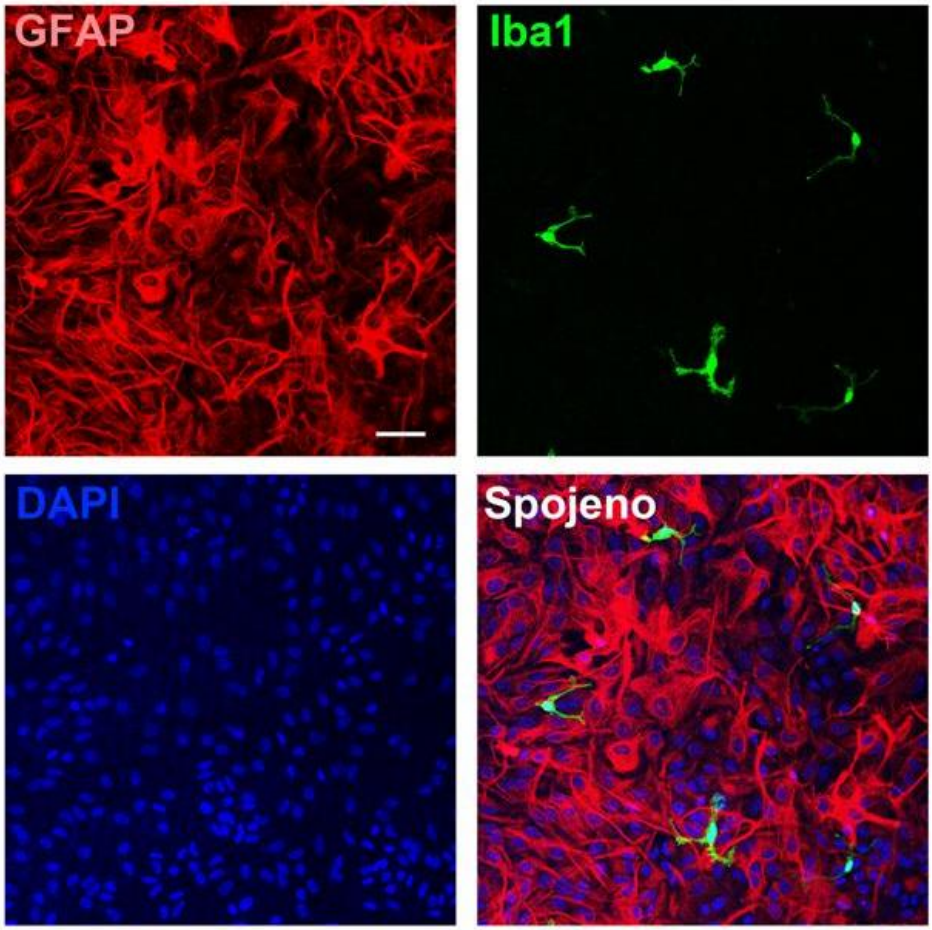
Iako je u ovoj studiji uočeno povećano bojenje na Iba1 u preALS i ALS životinja (Slika 13B, C), analiza 3D rekonstrukcija Iba1 signala iz tkivnih preseka dentatnog girusa je pokazala istu neaktiviranu razgranatu morfologiju mikroglijalnih ćelija u NTg, preALS i ALS životinja (Slika 19A, plavi signal). Sličan

razlika u ćelijskoj povrģini i zapremini (Slika 19B, C). Procenat kolokalizovanih piksela SOD1 i Iba1 signala, kao i njihov Pirsonov koeficijent korelacije su pokazali izmenjen obrazac promena u odnosu na mikrogliju iz facijalnog jedra (uporediti Slike 17D i 19D), sa niģim vrednostima od NTg ģivotinjama kod kojih se povećanje javlja već u pre-ALS i Unutarćelijska distribucija SOD1 u mikrogliji je skoro identična u svetlosnom (Slika 19A, ekspresija signala) i unutarćelijskog SOD1 signala je bio značajno niži u regiona hipokampusa (uporediti Slike 18F i 19F) i mikroglijom iz facijalnog jedra (uporediti Slike 17F i 19F), ali je ipak pokazao progresivno ģivotinja.

Ispitivanje unutarćelijske funkcionalne karakteristike astrocita izolovanih iz ALS pacova

Potvrda čistoće kulture kortikalnih astrocita

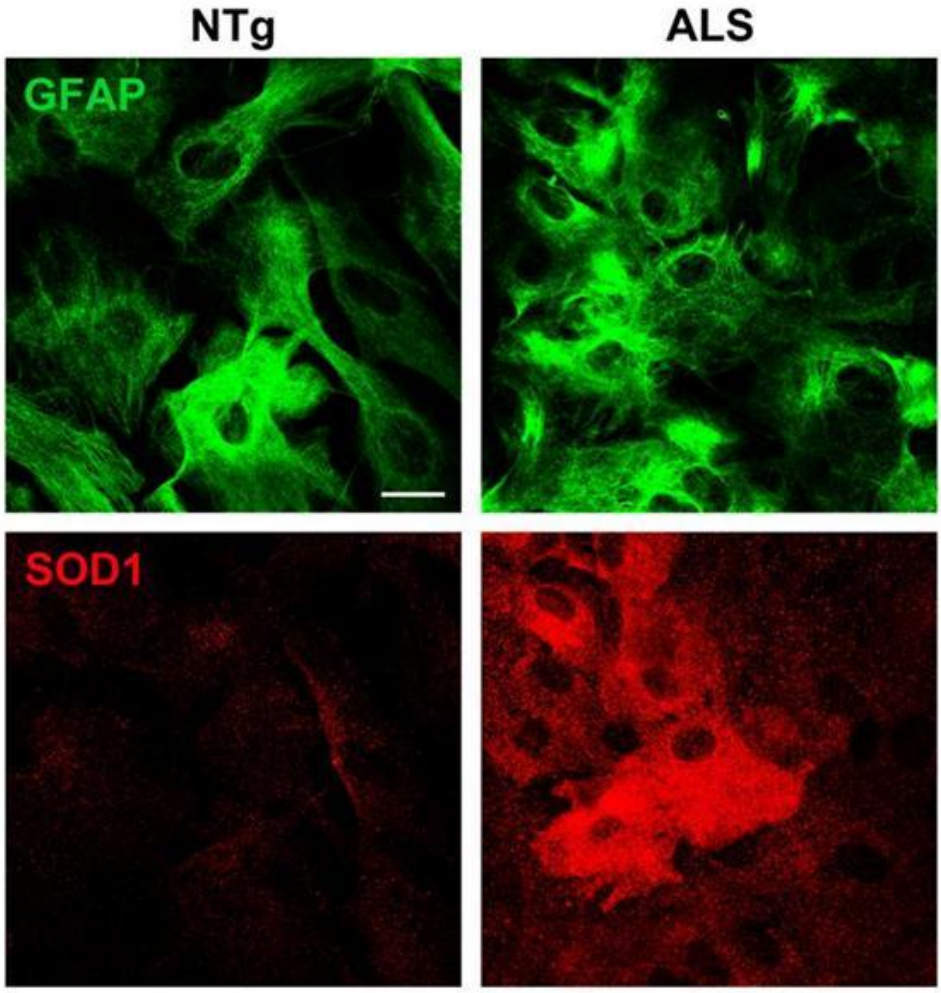
Kako bi se ispitala čistoća primarne kulture na mikroskopska stakla su imunocitohemijski obojena na GFAP kao marker astrocita i Iba1 kao marker mikroglije, dok je jedarni ćelijski marker obojen DAPI. Snimljene na konfokalnom laserskom skeneru slike su pokazale visoku čistoću izolovane kulture od 95 ï 97% (Slika 20).



Slika 20. Potvrda kulture astrocita. Konfokalni snimak primarne kulture kortikalnih astrocita izolovanih iz NTg životinje markere i jedarni materijal sa DAPI bojom. Skala iznosi 50 μm.

Ispitivanje ekspresije SOD1 proteina u astrocitima u kulturi

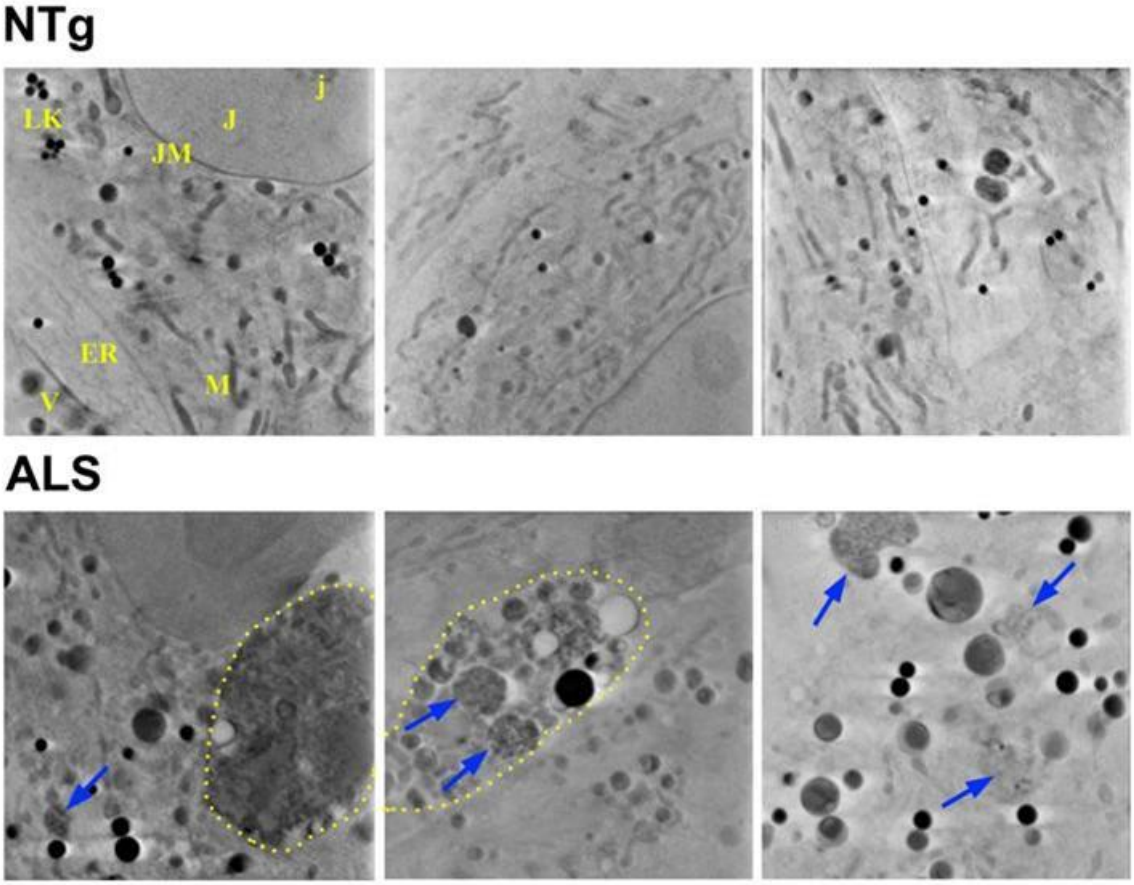
Pošto je analiza imunohistohemijskog boj akumulaciju SOD1 proteina u astrocitima u tkivu facijalnog jedra i dentatnog girusa preALS i simptomatskih ALS Ekspresija ovog proteina, ura Le u primarnim kulturama astrocita izolovanim Za sejane ćelije imunocitohemijski obojene na GFAP kao marker astrocita i SOD1 protein, i potom snimljene na konfokalnom laserskom skenirajućem Konfokalni snimci su pokazali intenzivnije bojenje na SOD1 protein u astrocitima izolovanim iz ALS životinja, pri čemu povećana homogena ve ina populacija astrocita ima jasno izraženo (videti sliku 21). Le enim



Slika 21. Povećana ekspresija SOD1 proteina u kortikalnim astrocitima primarne kulture kortikalnih astrocita izolovanih iz NTg i simptomatskih ALS miševa imunocitohemijski obojene na GFAP i SOD1 protein. Skala iznosi 20 μm. Na slikama se jasno uočava povećana ekspresija mutiranog SOD1 proteina.

Ispitivanje unutarćelijske strukture astrocita

Uočena akumulacija SOD1 proteina u astrocitnoj kulturi je ukazala na potencijalno formiranje agregata koji mogu da dovedu do značajnih promena unutarćelijske strukture astrocita. Ćelije iz primarnih kultura izolovanih iz NTg i simptomatskih ALS miševa su analizirane pomoću mikroskopske metode zasnovane na detekciji zračenja koje je apsorbovano u uzorcima. Ova metoda kontrastu ugljenikovih jedinjenja dala slike unutarćelijske strukture astrocita, slične snimanih astrocita (Slika 22).



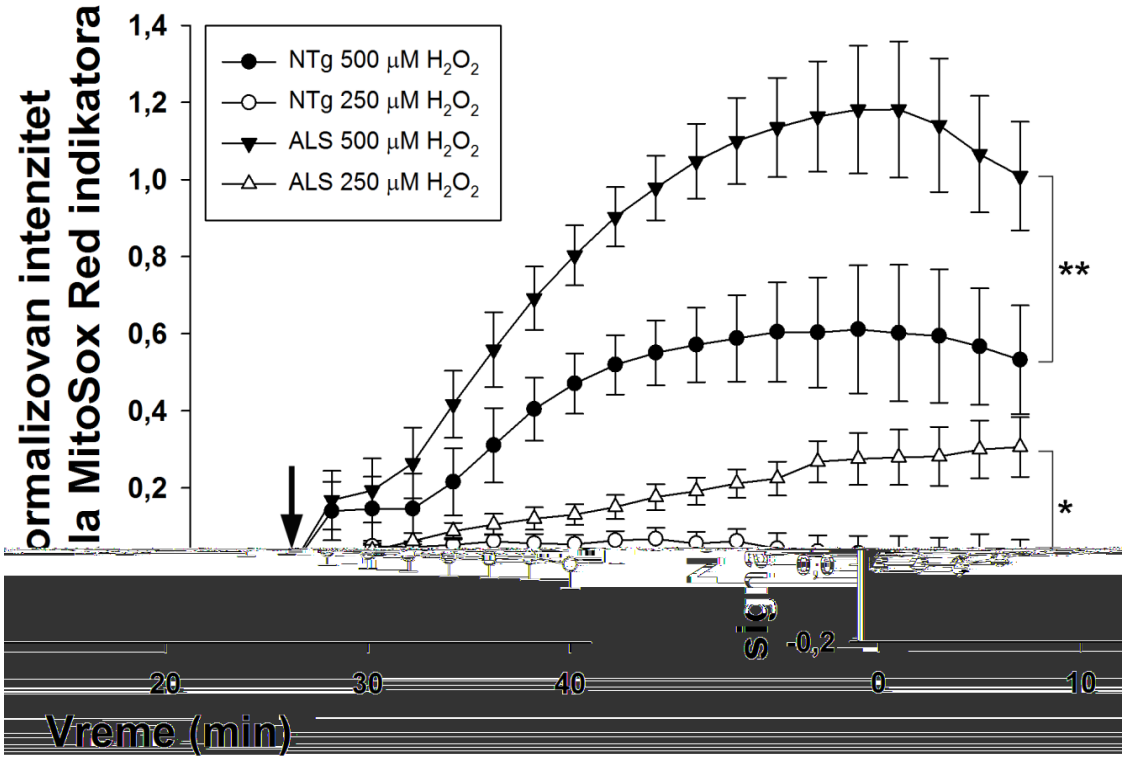
Slika 22. Izmenjena unutarĆelijska struktura citoplazme astrocita u kulturi izolovanih iz NTg (gornji red) i ALS (donji red) transgenih miševa. Slike su rekonstrukcije tomograma, snimljenih mikroskopijom Rentgenskim zracima meke energije, E = 520 eV. Plave strelice ukazuju na nakupine filamenata u astrocitima iz ALS životinja koje ukazuju na isprekidane gute linije obeležavaju slabo definisanu neposrednu blizinu jedra ovih ĆelijaĆ. Jedro, J; jedarna membrana, JM; mitohondrije, M; vezikule, V; lipidne kapi, LK; endoplazmatski retikulum, ER. Dimenzije slika su 10 x 10 µm.

Slike su pokazale deo sloge citoplazme astrocita iz NTg životinja neposredno uz Ćelijsko jedro u kojoj su mitohondrije, endoplazmatski retikulum i lipidne kapi (Slika 22, gornji red). Astrociti izolovani iz ALS životinja, pak, pokazali su izmenjenu unutarĆelijsku strukturu koja se ogleda u prisustvu vezikula proširenog promera, specifičnih nepravilnog oblika (Slika 22, donji red, plave strelice) koje su ukazivale na mogućnost formiranja agregata SOD1 proteina, kao i u blizini jedra (Slika 22, donji red, oivičenom isprekidanom linijom).

su se sastojale iz vezikula različitog tipa materijala.

Ispitivanje proizvodnje superoksidnog radikala u kulturi astrocita izolovanih iz ALS životinja

Pošto su prethodni eksperimenti pokazali da astrocita izolovanih iz ALS životinja, bilo strukturnih promena ove ćelije pokazuju poremećaje i odnosno kako one odgovoraju na prooksidativne stimuluse.

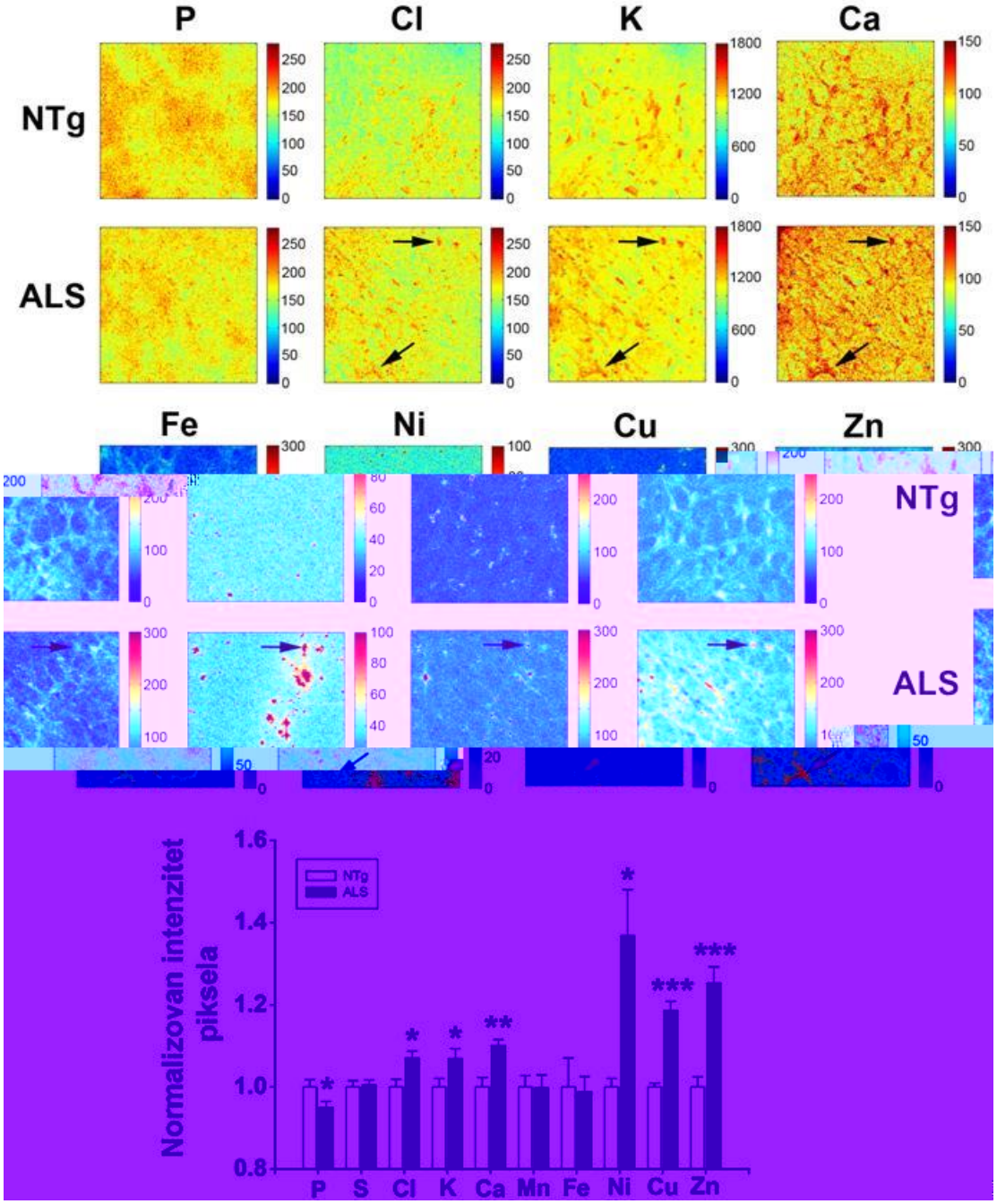


Slika 23. Povećana proizvodnja superoksida u astrocitima ALS životinja. Prikaz dinamike promene fluorescencije MitoSox Red indikatora proizvodnje superoksidnog radikala u astrocitima u kulturi izolovanim iz NTg i simptomatskih ALS životinja (krugovi odnosno trouglovi) nakon stimulacije sa vodonik-peroksidom (250 i 500 μM, prazni odnosno puni simboli). Strelica na grafiku označava dodavanje vodonik-peroksida. n = 9 (snimci po grupi; po 3 snimka iz 3 različite grupu). Tačke na grafiku predstavljaju srednje vrednosti ± SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Iz tog razloga analizirana je proizvodnja superoksidnog radikala u astrocitima u kulturi izolovanim iz NTg i simptomatskih ALS životinja fluorescencije MitoSox Red indikatora u vremenu nakon tretmana peroksidom na konfokalnom laserskom skeneru serija je pokazala povećanu proizvodnju izolovanim iz ALS u odnosu na astrocite izolovane iz NTg životinja nakon se dve koncentracije vodonik-peroksida (250 i 500 μM). Dinamika proizvodnje ovog radikala se razlikovala u zavisnosti od primenjene koncentracije vodonik-peroksida (Slika 23). Takođe, stimulacija sa vodonik-peroksidom (250 μM) koncentracije nije dovela do značajnog odgovora kod astrocita iz NTg miševa, dok astrociti iz ALS životinja pokazali su povećanu proizvodnju radikala.

Ispitivanje koncentracije hemijskih elementata u tkivu facijalnog jedra i dentatnog girusa simptomatskih hSOD1 G93A pacova

Kako unutarćelijski jonski sastav ima ulogu u fiziologiji ćelije, ali i na mogućnost agregaciju proteina ukoliko su Cu i Zn prisutni u njegovom sastavu, koncentraciju ovih kao i drugih fiziološki važnih elemenata, kao i Ni. Pored toga, promene u koncentracijama ovih elemenata u tkivu mogu da budu odraz patoloških procesa. Stoga, tkivni preseci facijalnog jedra i dentatnog girusa NTg i ALS životinja su podvrgnuti analizi pomoću fluorescentne mikroskopije zračenjem X (XRF). Analiza srednje vrednosti intenziteta signala na XRF slikama, koja odgovara količini merenog elementa u tkivu koncentraciji za P (5,0 ± 2,0 %), i povećanje koncentracija za Cl (3,0 %), Ca (10,0 ± 2,6 %), Ni (36,8 ± 13,6 %), Cu (18,7 ± 2,6 %) i Zn (25,3 ± 4,6 %) u facijalnom jedru (Slika 24). ALS životinja



Slika 24. Promene u distribuciji i količini simptomatskih - ALS gi vSlike distribucije P, Cl, K, Ca, Fe, Ni, Cu i Zn dobijene su pomoću fluorescentne mikroskopije na Rentgenskim zrače x 200 µm) na tkivnim presecima facijalnog Boje ong skala odgovaraju koncentracijama elemenata jedinicama za svaku sliku. Na slikama se mogu uočiti foka strelicama) u tkivu facijalnog jedra nim populacija prikazuje srednja vrednost intenziteta piksela za svaki elemenat normalizovanu u odnosu na selapna soslicama NTg odgovarajući elemenat. Podaci su predst slika po grupi. Studentov t test. * p< 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Analiza srednje vrednosti intenziteta signala na XRF slikama tkiva dentatnog girusa je, kao i u moždanom stablu, pokazal Cl (10,4 Ñ 4,6 %), Ni (43,1 Ñ 17,4 %) i Cu koncentracija Zn bila smanjena (-22,4 ± 7,4 %; Slika 25). Takođe, promen koncentracijama za određene elemente su po moždana regiona ALS grupe u odnosu na kontrolnu grupu. Slika 24 i Slika 25 ukaz specifičnim položajem ćelija (crnim strel

Slika 25. Promene u distribuciji i količini simptomatskih - ALS grupe u odnosu na kontrolnu grupu. Slike distribucije Cl, Ni, Cu i Zn dobijene su pomo fluorescentne mikroskopije Rentgenskim zračenjem (1 µm) na poprečnim presecima dentatnog girusa. Boje na skalama odgovaraju koncentracijama elemenata u opsegu izraženom za svaku sliku. Na slikama se mogu uo strelicama) u tkivu dentatnog girusa. Grafikon prikazuje srednju vrednost intenziteta piksela za svaki elemenat normalizovanu u odnosu na pikela na slikama NTg životinja za odgovarajuću vrednost ± standardne greške. Studentov t-test: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.